

Логинова

Мария Максимовна

**РОЛЬ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КИНАЗ В АДАПТАЦИИ ЦНС К
ВОЗДЕЙСТВИЮ ФАКТОРОВ ИШЕМИИ**

1.5.5 – физиология человека и животных

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2022

Работа выполнена на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского"

Научный руководитель **Митрошина Елена Владимировна**, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры нейротехнологий института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО "Национального исследовательского Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского".

Официальные оппоненты **Павлова Галина Валериевна**, доктор биологических наук, профессор РАН, зав. лабораторией нейрогенетики и генетики развития ФГБУН Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН;

Ильчибаева Татьяна Витальевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории нейрогеномики поведения ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН».

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва».

Защита диссертации состоится «2» марта 2023 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.2.340.06 при Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского" по адресу: 603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского и на сайте: <https://diss.unn.ru/files/2022/1317/diss-Loginova-1317.pdf>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Акинчиц Елена Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Киназы – это ферменты, катализирующие перенос фосфатной группы от молекулы АТФ на различные субстраты (He et al., 2019; Recabarren et al., 2019). Совокупность ферментов-киназ в клетке носит название «кином клетки» (Zhang et al., 2021). Они участвуют в разнообразных сигнальных каскадах, регулирующих такие процессы, как клеточная пролиферация, дифференцировка, регуляция активности генов выживания (Xin et al., 2020; Xie et al., 2019; Sun et al., 2015). Некоторые киназы способны активироваться в условиях недостатка питательных веществ, гипоксии и при энергетическом голодании (Jiang et al., 2018; Weiss et al., 2018). Нарушение регуляции их функций играет важную роль в развитии иммунологических, воспалительных, нейродегенеративных, метаболических, сердечно-сосудистых и инфекционных заболеваний (Wu et al., 2015).

В настоящее время киназы рассматриваются в качестве потенциальных нейропротекторных мишеней при действии различных стресс-факторов. Фактически каждый процесс передачи сигнала в клетке проходит через киназные каскады, тем самым киназы представляют собой множество «точек воздействия» для терапевтического вмешательства (Li et al., 2021; Zhang et al., 2020; Weiss et al., 2019).

Церебральная ишемия – широко распространенное состояние, заключающееся в снижении снабжения тканей мозга кислородом и энергетическими субстратами, что может приводить к острой и хронической дисфункции и гибели нейронов (Pluta et al., 2018; Jiang et al., 2018). Повреждение тканей головного мозга, находящихся в области первичного ишемического ядра, чаще всего уже необратимо, однако вторичное повреждение головного мозга в области, так называемой, пенумбры может длиться несколько дней, и именно этот промежуток времени позволяет реализовать различные подходы к коррекции повреждений, чтобы предотвратить развитие гибели клеток в этой зоне (Li et al., 2020). Несмотря на то, что в последние годы активно разрабатываются подходы к коррекции последствий церебральной ишемии, эффективных методов, которые бы доказали свою высокую нейропротекторную эффективность при минимальных побочных эффектах до сих пор нет (Shi et al., 2017; Cheon et al., 2018).

Киназы могут являться молекулярными мишенями для коррекции последствий ишемического инсульта и нормализации активности нейронных сетей головного мозга. Однако роль многих киназ в адаптации нервных клеток к воздействию ишемии еще недостаточно изучена, что делает данное направление исследований чрезвычайно актуальным (Shen et al., 2018; Ferguson et al., 2018).

Цель и задачи исследования

Целью работы являлось выявление представителей нейронального кинома, участвующих в адаптации нервных клеток к действию факторов ишемии, модуляция активности которых вызывает нейропротекторные эффекты.

Исходя из поставленной цели решались следующие задачи:

1. Выявить роль ключевых киназ в поддержании жизнеспособности клеток первичных культур нервных клеток головного мозга мыши в физиологических условиях;

2. Изучить нейропротекторные свойства нейрональных киназ при моделировании острой глюкозной депривации (ГД) и гипоксии *in vitro* на клетках первичных культур коры больших полушарий мозга мыши;

3. Изучить влияние киназ, блокада которых оказывает нейропротекторный эффект на функциональную активность нейронных сетей клеток первичных культур гиппокампа мозга мыши *in vitro*;

4. Исследовать влияние киназ, блокада которых оказывает нейропротекторный эффект на устойчивость лабораторных животных к воздействию гипоксического и ишемического факторов *in vivo*.

Научная новизна

Впервые было проведено комплексное исследование представителей нейронального киназома для выявления киназ с ранее неописанными нейропротекторными свойствами. На первичных культурах нервных клеток коры мозга мыши был проведен фармакологический скрининг 85 ингибиторов киназ в физиологических условиях и при моделировании ГД и гипоксии.

Впервые были выявлены киназы, блокада которых оказывала нейропротекторный эффект при ГД и гипоксии: FLT4, SRC, IKK β , eEF2K и RIPK1.

Впервые выполнен анализ коллективной кальциевой динамики нервных клеток при моделировании факторов ишемии на фоне блокады киназ SRC, IKK β , eEF2K, FLT4 и RIPK1. Показано, что блокада киназ SRC, IKK β и RIPK1 позволяет частично сохранить параметры кальциевой активности нейронглиальных сетей первичных культур клеток гиппокампа мыши.

Для киназ SRC, IKK β и RIPK1 впервые проведено исследование влияния их блокады на биоэлектрическую активность нейрональных сетей с помощью мультиэлектродных матриц. Показано, что только блокада киназы RIPK1 частично сохраняет биоэлектрическую нейросетевую активность первичных культур в постгипоксическом периоде.

Научно-практическая значимость исследования

Исследование киназ в качестве новых потенциальных молекулярных мишеней, оказывающих нейропротекторное действие, является многообещающим направлением для поиска новых мишеней терапии ишемического повреждения головного мозга. Изучение новых подходов и возможностей предотвращения гибели нервных клеток в головном мозге при моделировании факторов ишемии позволит в будущем разработать лекарства, которые смогут показать высокую эффективность с минимальными побочными эффектами.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. В результате проведенного скрининга выявлены нейрональные киназы, блокада которых повышает устойчивость нервных клеток к действию ишемических факторов.

2. Блокада RIPK1 киназы позволяет не только сохранить жизнеспособность нервных клеток на протяжении 7 суток после моделирования повреждающих

факторов, но и поддерживать нейросетевую активность, о чем свидетельствует сохранение доли клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность, а также поддержание биоэлектрической активности в постгипоксическом периоде.

3. Ингибирование RIPK1 киназы приводит к повышению устойчивости животных к гипоксическому повреждению, а также поддерживает их когнитивные способности.

Достоверность научных результатов

Достоверность исследования обусловлена применением надежных верифицированных методов, широко используемых в научном сообществе, и воспроизводимостью полученных результатов. Полученные данные согласуются с опубликованными работами независимых исследований других авторов.

Апробация работы

Результаты работы представлены на 11 всероссийских и международных мероприятиях: 22-ой Международной Пуцинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018); XV Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2019); VI Съезде биофизиков России (Сочи, 2019); XXI Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Репино, 2020); VII Молодёжной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2020); 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2020); XV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease (Online, 2021); VII Съезде физиологов СНГ (Сочи, 2022) и др.

Публикации

По теме кандидатской диссертации было опубликовано 22 научные работы: 6 статей в реферируемых журналах, входящих в перечень ВАК (из них 4 публикации в журналах категории Q1 и 1 публикация категории Q2, входящих в базы Scopus и WoS), 15 тезисов в сборниках всероссийских и международных конференций и 1 учебно-методическое пособие.

Благодарности

Автор выражает благодарность за предоставленную библиотеку ингибиторов киназ д.б.н., проф. Тарабыкину Виктору Степановичу (Charite, Германия) и д.м.н. Риме Аль-Авар (OICR, Канада). За разработку оригинального алгоритма анализа сетевых характеристик кальциевой активности в программе AstroLab сотрудникам кафедры прикладной математики ИИТММ Кривоносову Михаилу Игоревичу и д.ф.-м.н. Иванченко Михаилу Васильевичу (ННГУ им. Н.И. Лобачевского). За разработку оригинального алгоритма анализа биоэлектрической активности клеточных культур к.б.н. Пимашкину Алексею Сергеевичу.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектом исследований *in vitro* являлись первичные культуры коры больших полушарий и гиппокампа, полученные из головного мозга эмбрионов мышей линии C57BL/6 (E18). Ткань коры больших полушарий и гиппокампов

подвергалась механической и последующей ферментативной диссоциации с применением 0,25 % раствора трипсина (ThermoFisher, США) в течение 20 минут в CO₂ инкубаторе. Клетки культивировались на культуральных планшетах (определение жизнеспособности), чашках со стеклянным дном (SPL Life Sciences, Корея) (кальциевый имиджинг) или мультиэлектродных матрицах (Multichannel system, Германия) в культуральной среде Neurobasal medium (ThermoFisher, США) с добавлением 0,4 % сыворотки эмбриональной телячьей крови (Biosera, Франция), 1% биоактивной добавки B27 (ThermoFisher, США) и 0,5 % L-глутамина (ThermoFisher, США) в CO₂ инкубаторе при 35,5°C.

Моделирование факторов ишемии in vitro. Для моделирования ГД стандартную культуральную среду в течение 1 часа заменяли на нейробазальную среду, не содержащую в своем составе глюкозу, лактат и пируват (ПанЭко, Россия). Для моделирования гипоксии использовали среду Neurobasal medium (ThermoFisher, США) с низким содержанием кислорода (0,37 мл/л), полученную путем вытеснения кислорода аргоном в герметичной камере. После 10 мин инкубации гипоксическую среду заменяли стандартной культуральной средой.

Использованные в работе ингибиторы киназ, представляющие собой ароматические углеводороды, были выбраны из библиотеки ингибиторов, предоставленной Институтом онкологических исследований Онтарио (OICR) (д.б.н. Р. Аль-Авар) и Медицинским университетом Берлина Шарите (Medizinuniversität Charité Berlin) (д.б.н. В.С. Тарабыкиным). Все соединения использовались в виде 100% растворов в ДМСО. Апликация ингибиторов киназ *in vitro* проводилась на 14 день культивирования первичных культур нервных клеток в итоговой концентрации 1 μ M за 20 минут до моделирования факторов ишемии, во время и после замены культуральной среды на нормоксическую.

Оценка жизнеспособности первичных культур нервных клеток. Анализ жизнеспособности первичных культур нервных клеток осуществлялся с помощью красителей йодида пропидия (Merck KGaA, Германия), который окрашивал ядра мертвых клеток, и бисбензимида (Merck KGaA, Германия), который окрашивал ядра всех клеток в культуре. Жизнеспособность нервных клеток рассчитывалась как отношение количества ядер, маркированных только бисбензимидом к общему количеству клеточных ядер. Визуализация осуществлялась с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа ZEISS Observer A1 (Carl Zeiss, Германия) с объективом 20 \times /0,2 (Carl Zeiss, Германия).

Оценка кальциевой активности первичных культур нервных клеток (кальциевый имиджинг). Динамическая визуализация концентрации ионов кальция в нейрон-глиальных культурах проводилась с помощью флуоресцентного кальций-чувствительного красителя Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB-1, Invitrogen, США). Регистрация кальциевой активности осуществлялась на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 800 (Carl Zeiss, Германия) с объективом Plan-Apochromat 20x/0.8 M27. Временные серии изображений регистрировались с частотой дискретизации 2 кадра в секунду. Длительность записей составляла 10 минут.

Для изучения изменений коллективной кальциевой динамики нейрон-глиальных сетей был использован оригинальный алгоритм анализа сетевых характеристик кальциевой активности, реализованный в программе AstroLab. Алгоритм был разработан коллегами из Института информационных технологий, математики и механики (ИИТММ ННГУ им. Н.И. Лобачевского) (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021612870 от 25.02.2021). Для анализа кальциевых событий в отдельных клетках сети используется сегментация изображения с помощью алгоритма watershed. Исходные найденные события разделяются по областям отдельных клеток. Дальнейшие вычисления выполняются на найденных событиях в каждой клетке. Оценивались такие параметры, как: средний уровень корреляции кальциевой активности во всех и в соседних (контактирующих друг с другом) клетках культуры, среднее количество функциональных связей на одну клетку и процент связей от максимально возможных.

Исследование биоэлектрической активности нейронных сетей. Для исследования особенностей спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей на фоне применения ингибиторов киназ использовалась методика неинвазивной долговременной регистрации внеклеточных потенциалов с применением мультиэлектродной системы USB-MEA120-2-InVBC-System-E-Standard (Multichannel Systems, Германия). Спонтанная биоэлектрическая активность регистрировалась непосредственно перед моделированием гипоксии, во время гипоксии, после замены среды на нормоксическую и далее ежедневно в течение 7 последующих дней. Оценивалось количество сетевых пачек в записи, количество спайков в пачке, а также особенности реорганизации функциональной структуры нейросетевого ответа посредством построения паттернов активации.

Исследования *in vivo* были проведены на 146 самцах мышей линии C57BL/6. Эксперименты проводились на самцах для исключения влияния фаз гормонального цикла на результаты экспериментов. Для исключения влияния циркадных ритмов поведенческие эксперименты проводились в одно и то же время суток. Режим освещения вивария 12/12 часов, у животных имелся свободный круглосуточный доступ к пище и воде. Условия содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали «Правилам для проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Россия, 2010) и «Международным рекомендациям (этическому кодексу) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012). Также строго соблюдались этические нормативы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). Исследование одобрено комиссией ННГУ им. Лобачевского по биоэтике (протокол № 42 от 15.10.2020 г.)

Моделирование острой гипобарической гипоксии (ОГБГ). Мышей помещали в герметичную барокамеру, после чего в ней создавали пониженное давление (220-240 мм рт. ст.), соответствующее высоте 10 000 м над уровнем моря. Скорость подъема на «высоту» составляла 183 м/с, время подъема длилось 1 минуту. Проводилась оценка следующих параметров: время потери позы животным, время

жизни на высоте, время восстановления позы, а также выживаемость и степень устойчивости животных к гипоксии.

Моделирование ишемического повреждения головного мозга. Выполнялась односторонняя окклюзия левой сонной артерии. Животные наркотизировались при помощи ингаляционного наркоза изофлураном (Karizoo, Испания). Выполнялась перевязка левой общей сонной артерии с помощью нерассасывающейся лигатурной нити (МедМарт, Россия). Затем рану зашивали и посыпали бактериостатическим порошком Стрептоцида (Мелиген, Россия).

В экспериментах *in vivo* применялись следующие блокаторы, аналогичные по химическому составу используемым в экспериментах *in vitro*: Necrostatin-1 (блокатор RIP киназы, Sigma-aldrich, Германия), Dasatinib (блокатор киназы SRC, Sigma-aldrich, Германия) и CAS 873225-46-8 (блокатор Ikk киназы, Sigma-aldrich, Германия). Введение блокаторов выполнялось интравентрикулярно в дозах 10 мкг/кг (Necrostatin-1), 2 мг/кг (Dasatinib) и 1 мг/кг (CAS 873225-46-8).

Тест «Открытое поле». Исследование локомоторной активности, ориентировочно-исследовательского поведения и тревожности животных проводилась с помощью теста «Открытое поле». Тестирование выполнялось через сутки после моделирования ОГБГ и ишемии в установке IR Actimeter (PanLab, Испания). Установка представлена инфракрасным монитором активности с двухмерной рамой (45x45 см) и системой инфракрасных лучей. Все параметры регистрировались и анализировались при помощи программного обеспечения ActiTrack (PanLab, Spain). Оценивались общая пройденная дистанция, время, проведенное в центре поля, и вертикальная двигательная активность животных.

Тест «Водный лабиринт Морриса» проводили в круглом бассейне (d=90 см), заполненном водой, которая, для достижения непрозрачности, была подкрашена сухим молоком. Неподвижную платформу (d=10 см) помещали в определенное место бассейна на 1-2 см ниже поверхности воды. В течение 5 суток после моделирования повреждающего фактора проводили обучение животных в три сессии длительностью по 60 секунд каждая. Через 48 часов после обучения оценивали реконсолидацию долговременной памяти животного. Для этого платформу удаляли из бассейна, и в течение 1 мин оценивали длительность пребывания животного в зоне, где раньше находилась платформа.

Статистический анализ был выполнен в программе GraphPad Prism (v.9.0). Количественные результаты представлены как среднее значение со стандартной ошибкой среднего ($M \pm SEM$) или как медианное значение с 25 и 75 перцентилем распределения ($Me [Q1; Q3]$). Все эксперименты *in vitro* были повторены независимо друг от друга не менее трех раз. Проверка нормальности распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Так как данные не прошли проверку на нормальность распределения, то для статистической оценки независимых выборок использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Для статистической оценки связанных выборок применялся непараметрический T-критерий Уилкоксона. Для нивелирования эффекта множественных сравнений использовался метод Бенджамини-Иекутели. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Оценка жизнеспособности первичных культур нервных клеток при блокаде киназ в физиологических условиях и при моделировании глюкозной депривации

На первом этапе работы проведено скрининговое исследование воздействия ингибиторов 85 внутриклеточных киназ на жизнеспособность первичных культур клеток коры больших полушарий мозга мыши в физиологических условиях и при моделировании ГД. Исследуемые киназы входят в различные внутриклеточные сигнальные пути: сигнальные пути MAPK, сигнальный путь PI3K / AKT / mTOR, сигнальный путь JAK / STAT и сигнальный путь NF- κ B и другие (Рисунок 1).

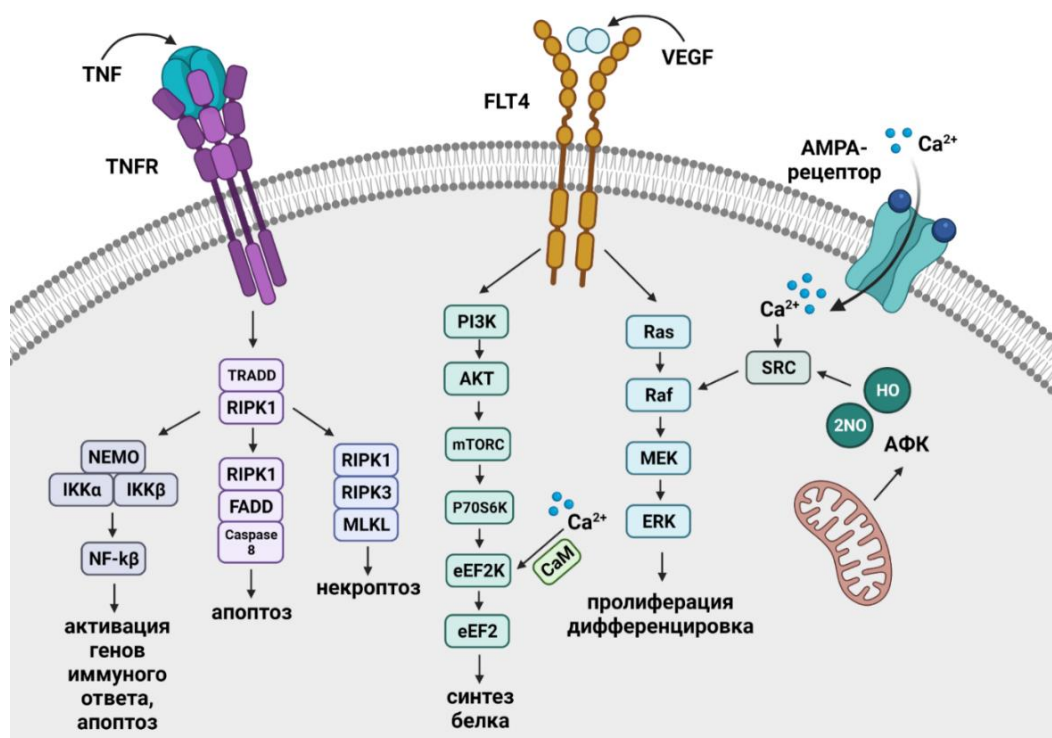


Рисунок 1. Киназные сигнальные пути

Результаты исследования влияния блокады нейрональных киназ на устойчивость нервных клеток к действию ГД представлены в Таблице 1. ГД приводила к достоверному снижению доли жизнеспособных клеток ($73,96 \pm 2,9 \%$) по сравнению с интактными культурами ($96,05 \pm 2,29 \%$). Анализ жизнеспособности нервных клеток позволил разделить исследуемые киназы на несколько групп, различающихся по своему функциональному воздействию на устойчивость нервных клеток к глюкозной депривации:

1) Киназы, блокада которых достоверно снижает жизнеспособность первичных культур нервных клеток в физиологических условиях. К таким киназам относятся: LRRK2, Eгk2, p38 MAPK, TNF- α . При этом при дефиците энергетических субстратов блокада данных киназ не оказывала влияния на жизнеспособность клеток.

2) Блокада киназ второй группы оказывает негативный эффект как в физиологических условиях, так и при энергетическом голодании: киназы p70S6K, DYRK1A, GSK3B, PI3K, TRKA, PAK4.

3) Киназы, ингибирование которых вызывает умеренное снижение числа живых клеток в первичных культурах в условиях нормы, и оказывающих нейропротекторный эффект при моделировании глюкозной депривации: FMS, SRC, каскад BCR, LYN, ABL1, FYN, PEK, FLT4, каскад JAK2, CDK2/Cyclin A, CDK2/Cyclin E, FLT3.

4) Киназы, блокада которых не влияет на жизнеспособность клеток коры больших полушарий головного мозга мыши при нормальных условиях. При этом их блокада оказывает выраженный негативный эффект при энергетическом голодании: MAP3K5 и DAGK.

5) К пятой группе относятся киназы, ингибирование, которых в условиях глюкозной депривации поддерживает жизнеспособность нервных клеток, при этом в нормальных физиологических условиях их ингибирование не влияет на жизнеспособность: CK2a1, BRAF, PKCt, ILK, IRE1, IKKb, KIT, PDGFRb, FGFR3, JAK2, IRAK4, CDK4/Cyclin D1, CDK6/Cyclin D3, PIM1, ErbB2, eEF2K, RIPK1.

Таблица 1.

Жизнеспособность клеток первичных культур при блокаде различных участников киназа

Ингибируемые киназы	Жизнеспособные клетки, %		Ингибируемые киназы	Жизнеспособные клетки, %	
	Физиологические условия	ГД		Физиологические условия	ГД
1			2		
Контроль	96,05±2,29	73,96±2,9*	Цитоплазматические киназы		
Рецепторные киназы			Киназы, входящие в сигнальные пути MAPK		
Tyrosine kinase	94,57±1,03	80,02±1,45*	BRAF, RAF1	88,37±1,65	68,48±3,14*
RET	99,67±0,56	74,43±3,62*	BRAF	99,73±1,37	96,98±1,86#
TRKA	85,19±4,67*	42,96±0,73*#	MAP2K1, MAP2K2	91,7±0,97	78,77±1,09*
IGF1R	98,49±1,22	71,65±1,05*	Erk1, Erk2	96,66±1,2	74,52±1,26*
PDGFRa, PDGFRb	91,73±1,18	77,52±1,6*	Erk2 (Compound 10)	83,56±2,03*	74,91±1,44*
FLT4 (SAR-131675)	84,28±1,5*	86,31±0,76*#	Erk2 (Compound 70)	85,37±1,44*	75,53±1,58*
FLT4 (MAZ-51)	54,07±3,41*	63,7±3,27*#	Ras-NET, Tubulin polymerization	97,83±0,88	75,69±2,78*
FGFR1/2/3/4	94,34±0,63	79,62±2,87*	MAP3K5	94,33±5,29	39,39±3,64*#
EGFR, ErbB2	97,66±1,13	75,5±0,99*	p38 MAPK, TNF-a	81,64±2,87*	81,89±1,54*
ErbB2	99,67±0,28	84,93±2,15*#	p38a, p38b	96,71±0,65	79,24±2,89*
KIT, PDGFRb, FGFR3 (Mubritinib)	92,19±0,29	77,22±1,25*	p38a	92,8±3,46	71,12±3,42*
KIT, PDGFRb, FGFR3 (AB-1010)	99,34±0,3	94,81±0,79#	JNK3	88,96±1,59	76,87±0,79*
ALK	98,13±1,41	75,6±1,14*	Erk5	98,56±1,14	72,12±0,97*
ALK2, BMPR1A	94,41±0,57	73,42±3,46*	MAPKAPK2	94,13±1,17	75,83±3,21*
TGFbR1	99,99±0,34	70,24±3,52*	MAPKAPK5	98,65±0,68	69,09±3,64*
TGFbR1, TGFbR2	98,26±0,38	65,16±4,99*	Сигнальный путь PI3K / АКТ		
MER	92,76±2,22	75,54±1,32*	PI3K	45,7±7,08*	47,65±7,41*#
FMS	85,96±3,53*	85,11±1,69*#	PI3Kgamma	92,21±1,67	76,27±1,92*

Ингибируемые киназы	Жизнеспособные клетки, %	
	Физиологические условия	ГД
1		
<i>Сигнальный путь PI3K / AKT</i>		
PI3K	45,7±7,08*	47,65±7,41*#
PI3Kgamma	92,21±1,67	76,27±1,92*
PDK1	98,49±0,78	69,14±4,66*
AKT1, AKT2, AKT3	89,33±1,28	74,06±1,96*
FRAP	91,99±0,77	74,12±0,75*
mTORC1/2	93,49±3,37	76,06±1,01*
p70S6K (S6K-18)	87,97±0,76*	69,71±2,89*#
p70S6K PF-(4708671)	96,81±0,74	75,26±1,03*
RSK1, RSK2	97,86±0,68	76,59±2,02*
JAK1, JAK2	98,13±1,3	75,48±1,71*
JAK2 (NVP-BSK805)	97,71±0,65	76,85±1,86*
JAK2 (LY-2784544)	95,1±0,61	91,14±0,85#
JAK2, CDK2/Cyclin A, CDK2/Cyclin E, FLT3	87,41±3,63*	83,64±1,3*#
<i>Сигнальные пути, активирующие NF-kB</i>		
NIK	93,44±1,16	73,57±2,53*
IKKb (ACHP)	89,4±1,49*	90,94±1,2#
IKKb (PS1145)	94,72±1,29	80,99±1,39*#
<i>Прочие киназы</i>		
SRC	85,94±0,69*	89,25±1,79#
BCR, LYN, ABL1, FYN	82,09±1,5*	78,51±2,34*#
FAK	90,05±2,13	78,56±0,53*
eEF2K	92,19±1,12	79,18±1,16*#
RIPK1	90,98±1,87	83,57±1,49*#
AMPK	93,65±0,58	75,18±4,07*
PIM1	97,88±2,24	75,79±1,67*
GSK3 (A-1070722)	99,76±0,69	80,57±1,96*
GSK3 (CT-98014)	88,62±4,69	64,11±22,29*

Ингибируемые киназы	Жизнеспособные клетки, %	
	Физиологические условия	ГД
2		
<i>Прочие киназы</i>		
GSK3B	64,75±6,47*	58,31±5,92*#
CK2a1 (TTP 22)	96,4±1,07	84,37±1,72*#
CK2a1 (Quinalzarin)	99,05±1,14	72,50±1,38*
ROCK1/2	96,81±0,59	74,86±3,75*
DAPK1/3	95,11±0,71	78,39±1,08*
LRRK2	84,76±0,54*	81,54±2,49*
smMLCK	93,74±0,5	68,91±2,29*
PKCt	92,96±1,28	81,55±1,18*#
ATM	99,7±0,93	74,11±0,84*
ATR	95,56±1,38	70,01±2,67*
CHK1	97,46±0,71	75,09±0,94*
CHK2	91,88±2,96	81,22±1,38*
Histone Deacetylase SIRT1	95,49±0,65	73,48±1,7*
CDK4, CDK6, PIM1	90,85±3,7	86,09±1,16*#
PNK	95,12±1,31	79,66±1,22*
Pan kinase	95,95±1,37	74,86±0,95*
PEK	81,49±2,75*	90,39±2,15#
ILK	98,3±1,42	86,08±0,98*#
IRE1	99,19±0,99	86,04±1,55*#
IRAK1	98,79±1,16	78,59±1,33*
IRAK4	97,98±0,78	89,71±0,89*#
TBK1	98,51±0,91	72,62±1,12*
DAGK	97,25±1,15	65,19±4,46*#
SGK1, SGK2	99,33±0,3	70,69±3,42*
PAK4	72,99±4,44*	65,08±1,34*#
CLK1, CLK4	92,02±1,64	71,67±3,4*
DYRK1A	58,23±2,41*	46,99±2,62*#

Зеленый фон – киназы, блокада которых вызывала выраженный нейропротекторный эффект при моделировании ГД; красный фон – киназы, блокада которых вызывала выраженный негативный эффект при моделировании ГД. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой клеток; # – статистически значимая разница по сравнению с группой «ГД», $p < 0,05$, (U-критерий Манна-Уитни)

Наиболее перспективными для дальнейшего исследования явились киназы из 3 и 5 группы, так как их блокада оказала защитное действие при ГД. Данные ингибиторы киназ были исследованы при моделировании другого ключевого ишемического стресс-фактора – гипоксического повреждения (процент жизнеспособных клеток составил $77,94 \pm 1,75$ %).

Влияние ключевых киназ на устойчивость нервных клеток к повреждающему действию гипоксии *in vitro*

По результатам оценки жизнеспособности наиболее выраженный защитный эффект продемонстрировали киназы SRC ($87,03 \pm 1,02$ %, $p < 0,05$), IKK β ($94,83 \pm 1,39$ %, $p < 0,001$), eEF2K ($84,54 \pm 2,01$ %, $p < 0,05$), FLT4 ($84,54 \pm 2,01$ %, $p < 0,05$) и RIPK1 ($86,09 \pm 4,61$ %, $p < 0,05$) (Рисунок 2 Б).

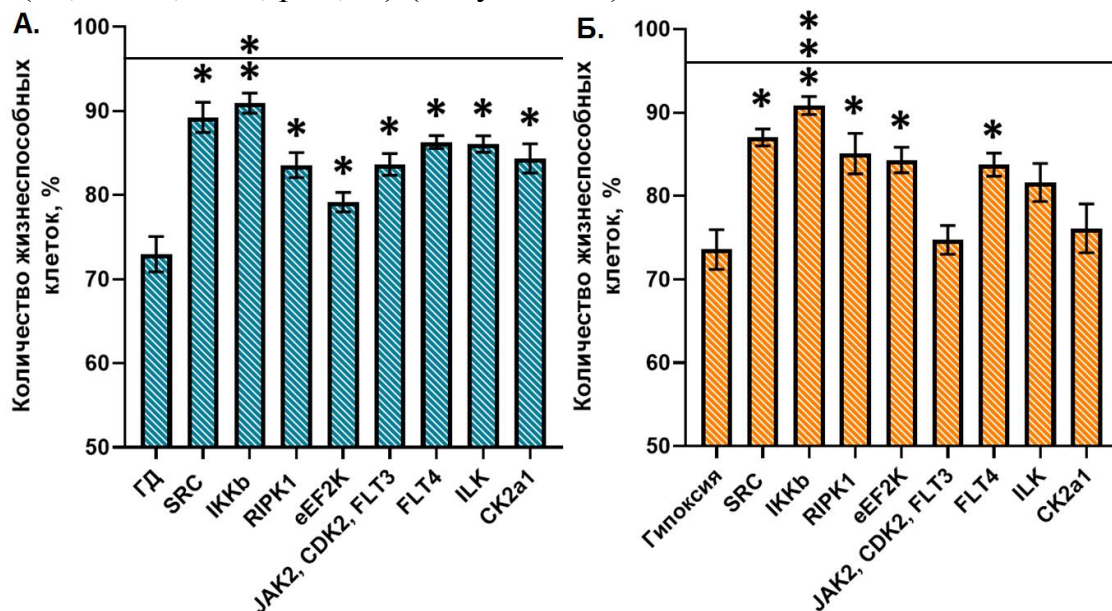


Рисунок 2. Жизнеспособность клеток первичных культур при блокаде ключевых киназ и моделировании факторов ишемии (линия – интактная культура). * – статистически значимая разница по сравнению с группой «ГД» и «Гипоксия», * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, (U-критерий Манна-Уитни)

Влияние ключевых киназ на спонтанную кальциевую активность культивируемых нейрональных клеток при моделировании факторов ишемии

Регистрация и анализ кальциевых сигналов между нейронами и астроцитами позволяет получить необходимую информацию о функциональных свойствах нейрон-глиальных сетей. Были изучены особенности функциональной кальциевой динамики в первичных культурах клеток гиппокампа при блокаде киназ-мишеней в физиологических условиях и при моделировании факторов ишемии с помощью кальциевого имиджинга.

Моделирование как гипоксического повреждения, так и ГД вызывает достоверное угнетение кальциевых событий. Доля активных клеток достоверно снижается с $60,64 \pm 3,68$ % до $47,71 \pm 4,99$ %, $p < 0,05$ при моделировании ГД и с $59,99 \pm 4,08$ % до $34,77 \pm 4,08$ %, $p < 0,001$ при гипоксии (Рисунок 3 Б, В), также при моделировании гипоксии наблюдается снижение частоты и увеличение длительности кальциевых осцилляций (Рисунок 3 В).

Блокада киназы eEF2K оказывала угнетающее действие на кальциевую активность, снижая процент осциллирующих клеток в физиологических условиях ($15,96 \pm 2,09$ %, $p < 0,001$), при моделировании ГД ($18,41 \pm 2,55$ %, $p < 0,001$) и при моделировании гипоксии ($10,45 \pm 2,31$ %, $p < 0,001$). При моделировании гипоксии ингибирование eEF2K достоверно повышало частоту кальциевых осцилляций ($1,16 \pm 0,22$ осц/мин, $p < 0,05$) (Рисунок 3 В). Таким образом, несмотря на сохранение

жизнеспособности клеток, блокада eEF2K негативно сказывается на метаболической кальциевой активности.

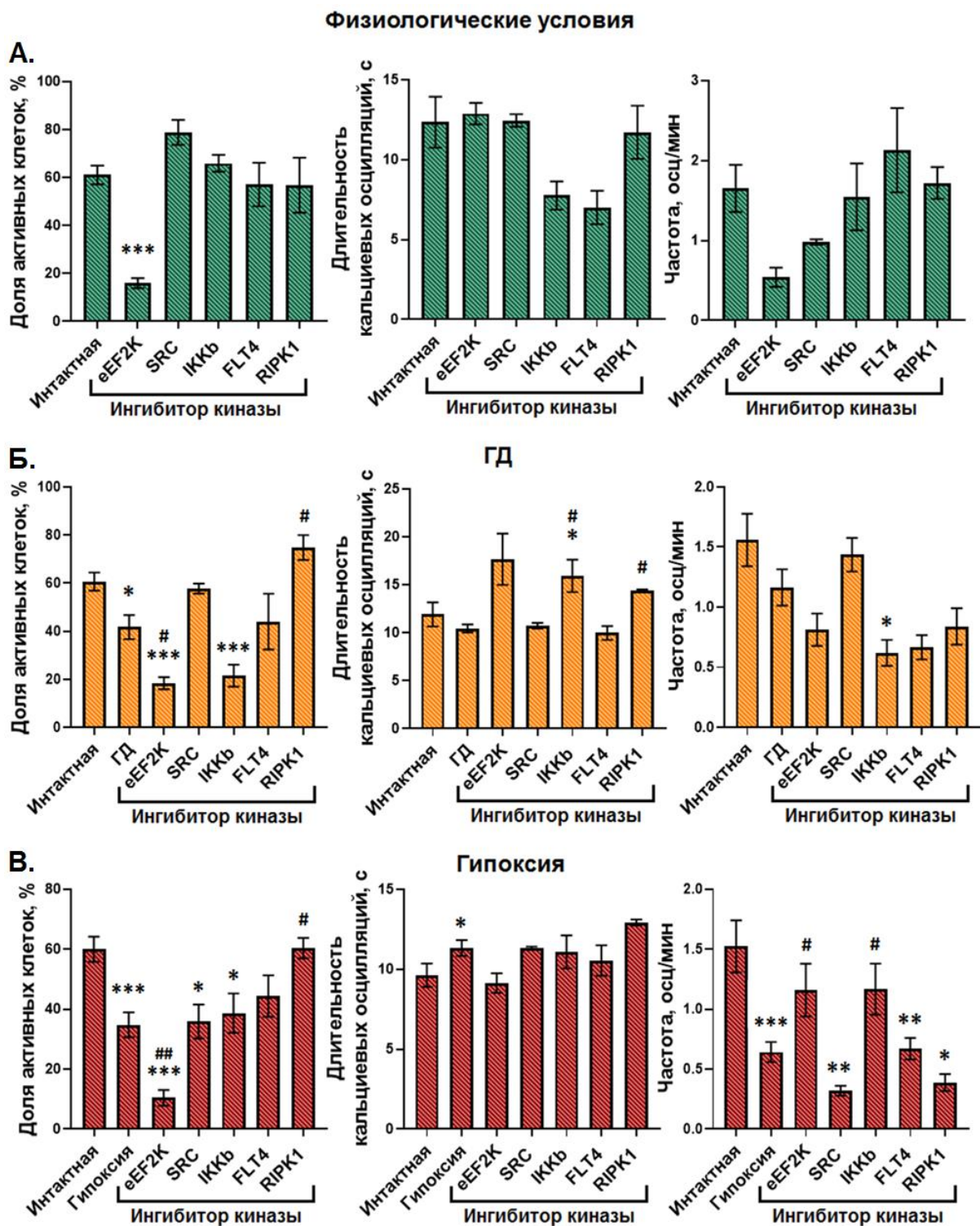


Рисунок 3. Основные параметры кальциевой активности нейрон-глиальных культур на 7 сутки после моделирования ГД и гипоксии. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой клеток; # – статистически значимая разница по сравнению с группой «ГД» и «Гипоксия», * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни)

Блокада киназы IKKb не оказывала влияние на число клеток, генерирующих кальциевые события, однако, при моделировании ГД длительность кальциевых

осцилляций достоверно повышалась ($15,93 \pm 1,69$ с, $p < 0,05$) (Рисунок 3 Б). Также достоверно увеличивалась частота кальциевых осцилляций при гипоксии ($1,17 \pm 0,21$ осц/мин, $p < 0,05$) (рисунок 3 В). Ингибирование SRC и FLT4 киназ также не оказывало влияние на число клеток, проявляющих функциональную кальциевую активность.

Следует отметить, что блокада RIPK1 поддерживает функциональную кальциевую активность нервных клеток при моделировании обоих стресс-факторов («Гипоксия + RIPK1» – $60,38 \pm 3,4$ %, $p < 0,05$; «ГД + RIPK1» – $74,81 \pm 5,15$ %, $p < 0,05$) (Рисунок 3 Б, В). Также блокада киназы RIPK1 повышает длительность кальциевых осцилляций при моделировании ГД ($14,38 \pm 0,13$ с, $p < 0,05$) (Рисунок 3 Б).

Оценка влияния ключевых киназ на параметры нейросетевой кальциевой активности

Нами впервые была исследована коллективная кальциевая динамика нейрон-глиальных сетей, что позволяет оценить степень связности сетевых элементов после воздействия ишемических факторов. На рисунке 4 представлены диаграммы рассеяния, на которых показана зависимость уровня корреляции динамики концентрации кальция от расстояния между парами клеток в культуре.

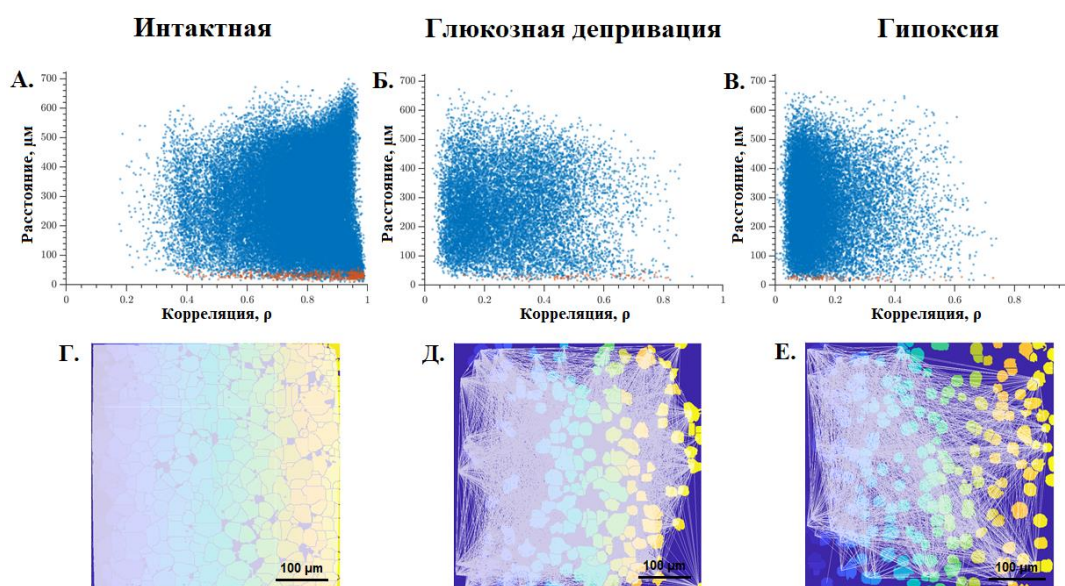


Рисунок 4. А-В: Корреляционная зависимость между спонтанными колебаниями Ca^{2+} и расстоянием между клетками (красные точки – пары соседних клеток, синие точки – пары удаленных клеток); Г-Е: репрезентативные графы корреляционной сети. Белыми линиями представлены функциональные связи между клетками с порогом корреляции $> 0,3$

Соседние пары клеток, сомы которых находятся в непосредственном контакте друг с другом, показаны красными точками, а удаленные клетки показаны синим цветом. В нижнем ряду представлены ориентированные графы, на которых белыми линиями показаны функционально значимые связи между клетками, для которых уровень корреляции более $0,3$.

В первичных культурах нервных клеток мозга мыши в физиологических условиях формируется развитая динамическая нейрон-глиальная сеть, которая характеризуется коррелированной кальциевой динамикой. Как соседние (0,63 [0,38; 0,82]), так и удаленные (0,46 [0,22; 0,68]) клетки имеют высокий уровень корреляции (Рисунок 5 А, Б). Число функциональных связей составляет 372 [93,87; 572], а процент связей от максимума 78,25 [30,01; 96,96] % (Рисунок 3 В, Г). Воздействие ишемических факторов приводит к значительной потере функциональных связей. Кислородное голодание оказывает более выраженное воздействие на нейрон-глиальные сети по сравнению с дефицитом энергетических субстратов. Корреляция кальциевой динамики составила 0,35 [0,2; 0,56], $p < 0,05$ между соседними клетками и 0,27 [0,15; 0,53], $p = 0,11$ между всеми клетками в группе «ГД» (Рисунок 5 А, Б) и 0,45 [0,22; 0,63], $p < 0,05$ и 0,24 [0,15; 0,45], $p < 0,01$ в группе «Гипоксия» (Рисунок 5 Д, Е). В группе «Гипоксия» также происходит снижение процента реальных функциональных связей от максимального числа возможных связей («Интактная» – 78,25 [30,01; 96,96] %, «Гипоксия» – 24,26 [3,39; 69,73] %, $p < 0,01$) (Рисунок 5 З). Это подтверждает снижение количества функциональных связей между нервными клетками в культуре.

Число функционально значимых связей на клетку также уменьшается при воздействии стресс-факторов: в интактных культурах – 372,08 [93,87; 572], при ГД – 39,38 [2,36; 210,24] (Рисунок 5 В), $p < 0,01$, при гипоксии – 147,47 [8,12; 334,33], $p < 0,01$ (Рисунок 5 Ж).

При моделировании ГД и блокаде исследуемых киназ только блокада FLT4 позволяет частично поддерживать степень корреляции кальциевой активности клеток. Уровень корреляции соседних клеток достоверно отличается от показателей группы «ГД» и составляет 0,73 [0,59; 0,82], $p < 0,05$, также как и число связей на клетку (394,82 [316,21; 399,69], $p < 0,01$) и процент связей от максимума (91,48 [82,35; 94,01], $p < 0,05$) (Рисунок 5 Б-Г). Следовательно, использование ингибитора FLT4 при моделировании ГД позволяет поддерживать количество функционально значимых связей между клетками на уровне интактных культур.

В основном, уровень корреляции активности между клетками в других экспериментальных группах не отличается от параметров группы «ГД» и был значительно ниже, чем в интактной группе.

Разрушение нейрон-глиальных сетей более существенно выражается при моделировании гипоксии. Нейропротекторного эффекта во время кислородного голодания и блокады киназ выявлено не было (Рисунок 5 Д-З).

Оценка влияния ключевых киназ на спонтанную биоэлектрическую активность первичных нейрональных культур при моделировании гипоксии

Применение мультиэлектродных матриц для регистрации внеклеточных потенциалов действия позволяет оценить функциональную целостность нейронных сетей, что в совокупности с данными кальциевого имиджинга позволило выполнить комплексную всестороннюю оценку функционального состояния нейронных сетей. В качестве стресс-фактора была выбрана модель гипоксии, поскольку она оказывала наиболее выраженное негативное воздействие на жизнеспособность и параметры кальциевой активности нервных клеток. В качестве киназ-мишеней были выбраны SRC, IKK β и RIPK1.

В интактной группе клеток с 14 по 21 день культивирования наблюдалось развитие функциональных связей нейрон-глиальной сети. Об этом свидетельствуют изменения показателей спонтанной биоэлектрической активности клеточных культур: среднее количество малых сетевых пачек изменялось с $14,41 \pm 1,04$ пачек/10 мин (14 день культивирования) до $36,12 \pm 4,27$ пачек/10 мин, $p < 0,05$ (21 день культивирования) (Рисунок 6 А), а среднее количество спайков в пачке с $18,45 \pm 1,57$ (14 день) до $90,22 \pm 12,32$, $p < 0,05$ (21 день) (Рисунок 6 Б).

Выявлено, что гипоксическое повреждение негативно влияет на развитие нейрон-глиальной сети. На 7 сутки после моделирования гипоксии параметры спонтанной биоэлектрической активности оставались на уровне развития 14 дневной культуры. Среднее количество малых сетевых пачек до моделирования гипоксии составляло $13,83 \pm 1,32$ пачек/10 мин, на 7 сутки после – $15,87 \pm 3,03$ пачек/10 мин, $p = 0,34$ (Рисунок 6 А); среднее количество спайков $14,78 \pm 0,55$ и $11,58 \pm 4,7$, $p = 0,42$, соответственно (Рисунок 6 Б).

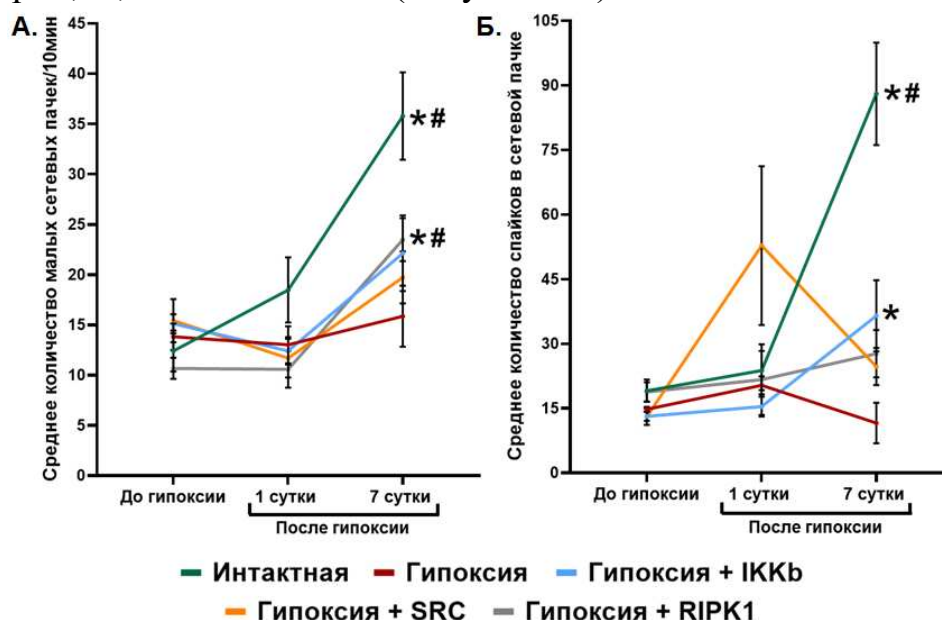


Рисунок 6. Основные параметры спонтанной биоэлектрической активности первичных нейрон-глиальных культур на фоне блокады киназ и моделировании гипоксии.

* – статистически значимая разница по сравнению с клеточной культурой до добавления ингибиторов и моделирования гипоксии; # – статистически значимая разница по сравнению с клеточной культурой через 1 сутки после добавления ингибиторов и моделирования гипоксии, * $p < 0,05$ (Т-критерий Уилкоксона)

Показатели биоэлектрической активности на 7 сутки постгипоксического периода достоверно отличались от параметров интактных культур (число малых сетевых пачек в группе «Интактная» – $35,79 \pm 4,35$ пачек/10 мин, в группе «Гипоксия» – $15,87 \pm 3,03$ пачек/10 мин, $p < 0,05$; количество спайков в сетевой пачке в группе «Интактная» – $88,02 \pm 11,9$, в группе «Гипоксия» – $11,58 \pm 4,7$, $p < 0,05$) (Рисунок 7 А, Б).

Ингибирование IKK β и RIPK1 киназ при гипоксическом повреждении частично поддерживало спонтанную биоэлектрическую активность на 21 сутки культивирования, о чем свидетельствует увеличение среднего количества спайков в сетевой пачке ($36,49 \pm 8,24$, $p < 0,05$) при блокаде IKK β (Рисунок 7 Б) и увеличении среднего количества малых сетевых пачек ($23,49 \pm 2,14$ пачек/10 мин, $p < 0,05$) при блокаде RIPK1 (Рисунок 7 А).

Блокада киназы SRC не оказывала достоверного воздействия на биоэлектрическую активность при моделировании гипоксии.

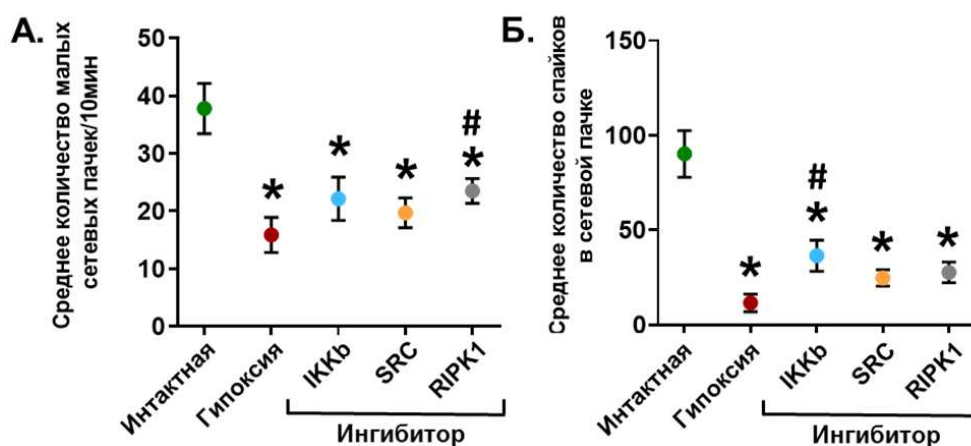


Рисунок 7. Основные параметры спонтанной биоэлектрической активности на 21 день развития первичных нейрон-глиальных культур на фоне блокады киназ и моделирования гипоксии. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой; # – статистически значимая разница по сравнению с группой «Гипоксия», * $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни)

При анализе паттернов активации также отмечается увеличение времени распространения импульсов между электродами после моделирования гипоксии. На 7 сутки постгипоксического периода в группе гипоксия происходит утрата практически всех функциональных нейронных ансамблей. Ингибирование киназ IKK β и SRC не приводит к сохранению структуры сетевой активности в отдаленном постгипоксическом периоде, блокада киназы RIPK1 позволяет ее частично сохранить (Рисунок 8).

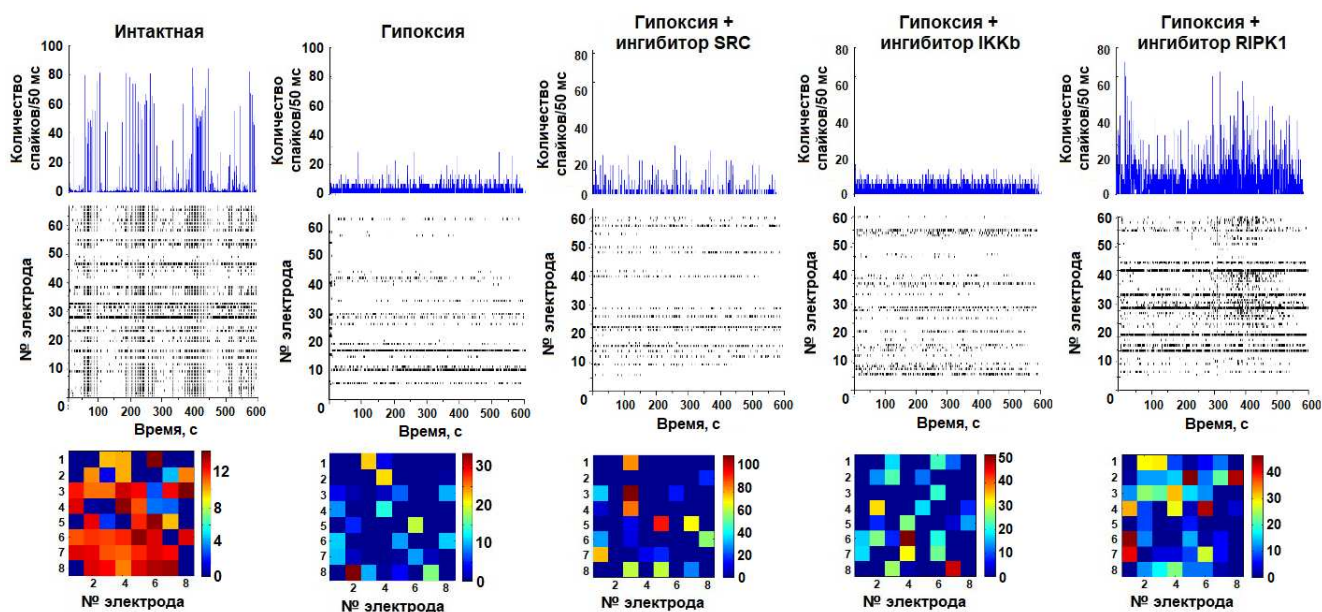


Рисунок 8. Количество спайков за 50 мс и характерные примеры растровых диаграмм спонтанной биоэлектрической активности первичных нейрон-глиальных культур (вверху) и репрезентативные примеры паттернов спонтанной биоэлектрической активности первичных нейрональных культур (внизу) на 7 сутки после гипоксии. Цветовая диаграмма – время возникновения спайков в сетевой пачке, регистрируемых с электродов, мс

Оценка нейропротекторного эффекта применения блокаторов киназ RIPK1, IKKb и SRC при экспериментальном моделировании гипоксии in vivo

Следующим этапом работы явилось исследование влияния блокаторов киназ RIPK, IKKb и SRC на устойчивость животных к ОГБГ (Таблица 2).

Таблица 2.

Основные показатели устойчивости животных к острой гипобарической гипоксии

Группа	Время жизни на высоте, мин	Выживаемость, %	Время потери позы, с	Время восстановления позы, с
Контроль (PBS) (n=18)	3,8±0,71	33,3%	76,83±2,56	674,8±53,13
Ингибитор SRC (n=18)	6,68±0,39*	33,3%	76,00±2,26	738±19,43
Ингибитор IKKb (n=36)	5,12±0,68	16,7%	77±2,44	619±36,5
Ингибитор RIPK (n=22)	7,65±0,41*	55,6%	79,4±3,38	796,2±64,36

* – статистически значимая разница по сравнению с контролем, * p<0,05 (U-критерий Манна-Уитни)

Выживаемость животных в контрольной группе (интравентрикулярное введение PBS) составила 33,3%. Блокада RIPK1 киназы повышала выживаемость животных до 54,5%, блокада SRC киназы не влияла на выживаемость, а ингибирование киназы IKKb снижало ее до 16,7%.

Важно отметить, что ингибирование как RIPK1, так и SRC достоверно повышает время жизни животных на высоте по сравнению с контролем (контроль – 3,8 ± 0,71 мин., ингибитор RIPK1 – 7,65 ± 0,41 мин., p<0,05, ингибитор SRC – 6,68 ± 0,39 мин., p<0,05). Также блокада этих двух киназ достоверно повышала долю высокоустойчивых животных (контроль – 8,3%, ингибитор RIPK1 – 33,3 %, p<0,05, ингибитор SRC 55,5 %, p<0,05) (Рисунок 9).

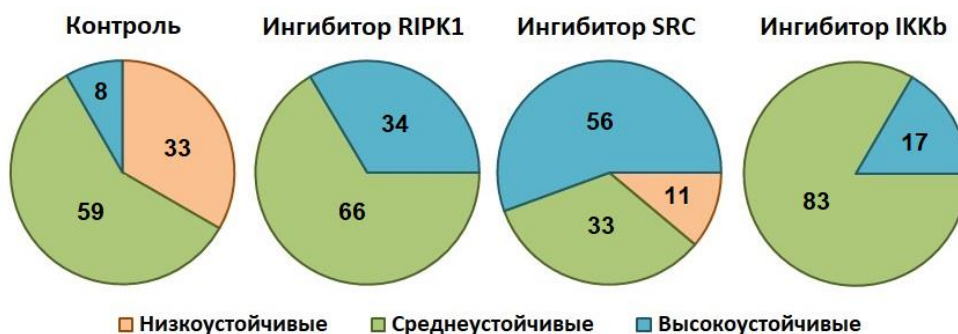


Рисунок 9. Влияние блокады исследуемых киназ на распределение животных по степени устойчивости к гипоксии, %

Тестирование ориентировочно-двигательной активности и мнестических способностей животных после моделирования ОГБГ

Через сутки после моделирования ОГБГ двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных оценивалась в тесте «Открытое поле». Показано, что общий уровень локомоторной активности у животных не изменялся, однако животные группы «Контроль», перенесшие ОГБГ, достоверно больше времени проводили в центральной области поля (интактная группа – $27,32 \pm 4,63$ с, контроль – $91,85 \pm 22,4$ с, $p < 0,05$) (Рисунок 10 Б), что свидетельствует о изменении уровня тревожности животных, так как для норных грызунов является нормой избегание ярко освещенных участков в центре открытого пространства. Применение ингибитора RIPK1 киназы достоверно нормализовало уровень тревожности животных (ОГБГ + ингибитор RIPK1 – $24,92 \pm 8,78$ с, $p < 0,05$). При блокаде киназы IKKb наблюдалась тенденция к нормализации уровня тревожности (ОГБГ + ингибитор IKKb – $32,7 \pm 10,18$ с, $p = 0,057$) (Рисунок 10 Б).

Также моделирование ОГБГ приводило к достоверному уменьшению количества вертикальных стоек (интактная группа – $37,5 \pm 5,72$ шт., контроль – $18 \pm 1,4$ шт., $p < 0,05$), что говорит о снижении ориентировочно-исследовательской активности животных (Рисунок 10 В). В группах с введением блокаторов данный параметр не отличается от показателей интактных животных и контрольной группы.

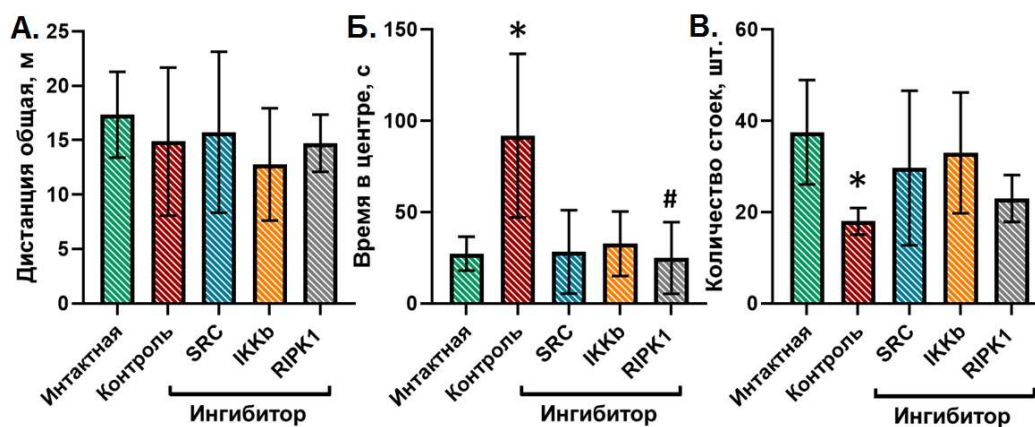


Рисунок 10. Основные параметры двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных через сутки после моделирования ОГБГ на фоне интравентрикулярного введения ингибиторов киназ. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой клеток; # – статистически значимая разница по сравнению с контролем, * $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни)

Оценка когнитивных функций животных проводилась в тесте «Водный лабиринт Морриса». Выявлено, что в отдаленном постгипоксическом периоде в группе «Контроль» происходило достоверное изменение времени, проведенного животными в зоне, где ранее была установлена платформа, что говорит о снижении когнитивных функций мышей (интактная группа – $23,84 \pm 2,37$ с, контроль – $17,72 \pm 1,76$ с, $p < 0,05$) (Рисунок 11).

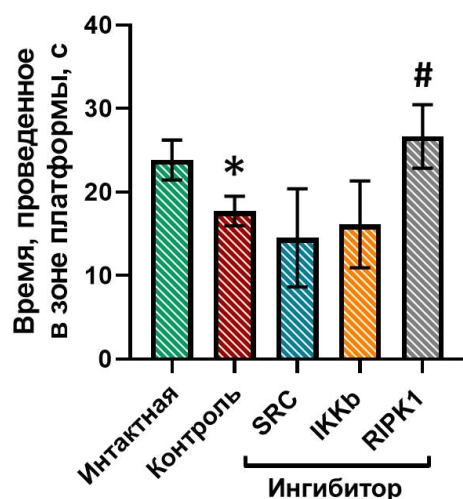


Рисунок 11. Оценка реконсолидации долговременной памяти животного через 48 часов после обучения на фоне ОГБГ и интравентрикулярного введения ингибиторов киназ. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой клеток; # – статистически значимая разница по сравнению с контролем, * $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни)

Применение ингибитора RIPK1 киназы достоверно увеличивало время ($26,64 \pm 3,8$ с, $p < 0,05$), проведенное мышами в зоне, где была установлена платформа, по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о положительном влиянии блокады RIPK1 на когнитивные функции животных в постгипоксическом периоде.

Оценка устойчивости лабораторных животных к ишемическому повреждению при введении ингибиторов киназ RIPK1, SRC и IKKb

Следующим этапом оценки нейропротекторного действия выбранных киназ стало исследование устойчивости лабораторных животных к ишемическому повреждению. Выживаемость контрольных животных составила 80%. Выживаемость животных при введении ингибитора RIPK1 и ингибитора SRC киназы не отличалась от контрольной группы. При блокаде киназы IKKb выживаемость составила 66,7%.

Показано, что ишемическое повреждение вызывает снижение уровня локомоторной активности у мышей (общая дистанция в интактной группе составила $15,92 \pm 0,21$ м, в контрольной – $11,78 \pm 1,01$ м, $p < 0,05$) (Рисунок 12 А). Также после моделирования ишемии изменялся уровень тревожности животных (время, проведенное животным в центральной зоне, в интактной группе составило $18,2 \pm 7,01$ с, в контрольной – $65,71 \pm 10,8$ с, $p < 0,05$) (Рисунок 12 Б). Снижение уровня ориентировочно-исследовательской активности в группе мышей с ишемическим повреждением не происходило (Рисунок 12 В).

В группе с введением блокаторов, такие параметры, как общая преодолённая дистанция, время в центре и количество стоек регистрировались на уровне контрольной группы. Тем самым применение ингибиторов SRC, IKKb и RIPK1 киназ не оказывает нейропротекторного эффекта на локомоторную и

ориентировочно-исследовательскую активность у мышей при моделировании ишемии.

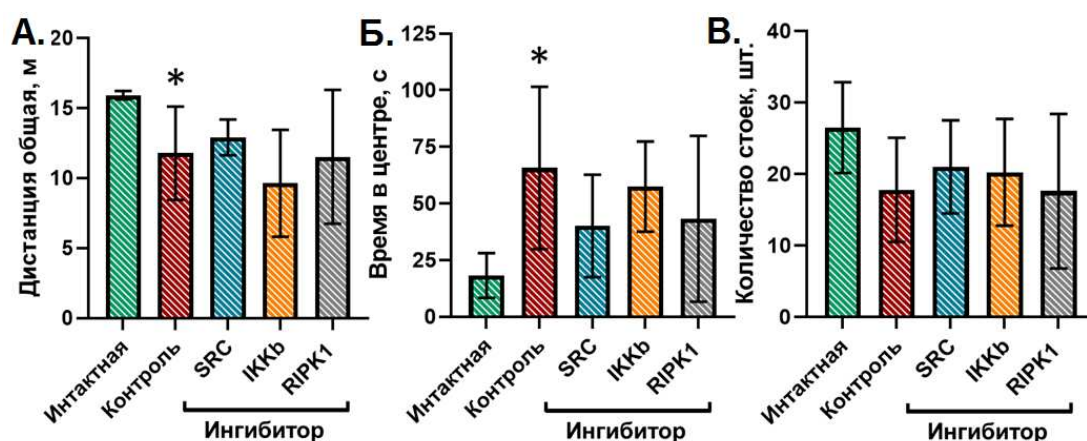


Рисунок 12. Основные параметры двигательной и ориентировочно-исследовательской активности животных через сутки после моделирования ишемии на фоне интравентрикулярного введения ингибиторов киназ. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой клеток, * $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни)

Тест «лабиринт Морриса» показал, что перенесенная ишемия приводит к нарушению памяти по сравнению с интактными животными (время в зоне, где была расположена платформа в интактной группе составило – $22,66 \pm 1,8$ с, в контрольной – $17,97 \pm 1,59$ с, $p < 0,05$) (Рисунок 13).

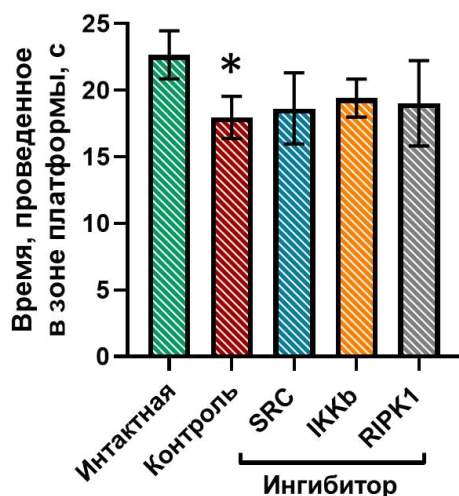


Рисунок 13. Оценка реконсолидации долговременной памяти животного через 48 часов после обучения на фоне ишемии и интравентрикулярного введения ингибиторов киназ. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой клеток, * $p < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни)

Блокада киназ SRC, IKKb и RIPK1 при ишемии не оказывала влияния на когнитивные способности мышей.

Таким образом, ингибирование RIPK1 и SRC киназ повышает устойчивость животных к воздействию ОГБГ и ишемическому повреждению. Наиболее выраженное нейропротекторное действие наблюдалось при использовании блокатора RIPK1 киназы во время ОГБГ, которое выражается в нормализации уровня тревожности и сохранении когнитивных способностей животных. При блокаде SRC такого эффекта не наблюдалась.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного скрининга с использованием 85 высокоселективных и низкоселективных ингибиторов, выделено 5 функциональных групп исследуемых киназ: (1) киназы, необходимые для поддержания жизнедеятельности нервных клеток, блокада которых снижает их жизнеспособность в физиологических условиях, (2) киназы, блокада которых оказывает негативный эффект как в физиологических условиях, так и при энергетическом голодании, (3) киназы, блокада которых вызывает умеренное снижение числа живых клеток в физиологических условиях и нейропротекторный эффект при моделировании ГД, (4) киназы, блокада которых не влияет на жизнеспособность клеток в физиологических условиях, но оказывает выраженный негативный эффект при энергетическом голодании, (5) киназы, блокада которых вызывает достоверное увеличение жизнеспособности в условиях ГД и не влияет на клетки в нормальных физиологических условиях.

Представители киназ из 3 и 5 группы были проанализированы на влияние на жизнеспособность клеточных культур другого стресс-фактора – гипоксии. Киназами, блокада которых оказала выраженный нейропротекторный эффект при моделировании и ГД, и гипоксии, явились SRC, IKK β , eEF2K, FLT4 и RIPK1. Данные киназы были выбраны для исследования влияния на сетевую кальциевую динамику. Выявлено, что ингибирование SRC, IKK β и RIPK1 киназ частично поддерживает кальциевую функциональную активность. Однако блокада киназ IKK β и SRC не оказала нейропротекторный эффект на сохранение биоэлектрической активности нейрон-глиальных сетей при гипоксическом повреждении.

В экспериментах *in vivo* были исследованы киназы SRC, IKK β и RIPK1. Показано, что применение ингибитора IKK β негативно влияет на выживаемость лабораторных животных при моделировании ОГБГ и ишемии. Блокада киназы SRC оказывает нейропротекторный эффект только при моделировании ишемии, а блокада RIPK1 положительно влияет на устойчивость животных как к гипоксическому, так и ишемическому повреждению.

Выводы:

1. Выявлено, что блокада киназ TRKA, FLT4, Erk2, p38 MAPK, TNF- α , PI3K, JAK2, CDK2/Cyclin A, CDK2/Cyclin E, FLT3, SRC, BCR, LYN, ABL1, FYN, LRRK2, PEK, PAK4 и DYRK1A приводит к снижению жизнеспособных клеток первичных культур коры больших полушарий мозга мыши в физиологических условиях.

2. Показано, что блокада киназ FLT4, SRC, IKK β , eEF2K и RIPK1 сохраняет жизнеспособность клеток в первичных культурах коры больших полушарий мозга мыши при моделировании острой ГД и гипоксии на протяжении 7 суток после воздействия повреждающего фактора.

3. Выявлено, что блокада киназы RIPK1 способствует сохранению доли клеток, проявляющих спонтанную кальциевую активность, а также сохраняет биоэлектрическую активность нейрон-глиальных сетей в постгипоксическом периоде. Также при гипоксическом воздействии частичное сохранение сетевых

характеристик кальциевой активности наблюдалось при ингибировании киназы IKK β .

4. Ингибирование RIPK1 и SRC киназ повышает устойчивость мышей линии C57Bl/6 к гипоксическому и ишемическому повреждению, а также поддерживает их когнитивные способности. Наиболее выражен нейропротекторный эффект при применении ингибитора RIPK1 киназы. Применение блокатора киназы IKK β , напротив, оказывало отрицательное влияние на выживаемость мышей при гипоксическом и ишемическом повреждении.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Mitroshina E.V., Mishchenko T.A., Shirokova O.M., Smirnova T.A. (Astrakhanova), **Loginova M.M.**, Epifanova E.A., Babaev A.A., Tarabykin V.S., Vedunova M.V. Intracellular Neuroprotective Mechanisms in Neuron-Glial Networks Mediated by Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. P. 1-15. doi: 10.1155/2019/1036907.

2. Mitroshina E.V., **Loginova M.M.**, Mishchenko T.A., Tarabykin V.S., Vedunova M.V. Identification of Kinome Representatives with Neuroprotective Activity // *Neurochemical Journal*. 2020. Т. 14, Вып. 4. С. 394-407. <https://doi.org/10.1134/S1819712420040133>.

3. Mitroshina E.V., **Loginova M.M.**, Savyuk M.O., Krivonosov M.I., Mishchenko T.A., Tarabykin V.S., Ivanchenko M.V., Vedunova M.V. Neuroprotective Effect of Kinase Inhibition in Ischemic Factor Modeling *In Vitro* // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22. № 4. P. 1885. doi: 10.3390/ijms22041885.

4. **Loginova M.**, Mishchenko T., Savyuk M., Guseva S., Gavrish M., Krivonosov M.I., Ivanchenko M.V., Fedotova YU.O., Vedunova M.V. Double-Edged Sword of Vitamin D3 Effects on Primary Neuronal Cultures in Hypoxic States // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. V. 22. № 11. P. 5417. doi: 10.3390/ijms22115417.

5. Mitroshina E.V., **Loginova M.M.**, Yarkov R.S., Urazov M.D., Novozhilova M.O., Krivonosov M.I., Vedunova M.V. Inhibition of Neuronal Necroptosis Mediated by RIPK1 Provides Neuroprotective Effects on Hypoxia and Ischemia *In Vitro* and *In Vivo* // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. V. 23. № 2. P. 735. doi: 10.3390/ijms23020735.

6. **Loginova Maria M.**, Novozhilova Maria O., Urazov Mark D., Yarkov Roman S., Krivonosov Mikhail I., Kravchenko Galina A., Mitroshina Elena V., Vedunova Maria V. Effects of SRC and IKK β Kinase Inhibition in Ischemic Factors Modeling *In Vitro* and *In Vivo* // *Applied Sciences*. 2022, V. 12, № 7, P. 3469. <https://doi.org/10.3390/app12073469>.

Материалы конференций:

1. **Логинова М.М.**, Шишкина Т.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Ведунова М.В. Роль ферментов-киназ в адаптации клеток первичной культуры гиппокампа к действию гипоксии *in vitro* // Сборник тезисов 71-й Всероссийской с

международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2018. С. 137.

2. **Логинова М.М.**, Шишкина Т.В., Мищенко Т.А., Митрошина Е.В., Ведунова М.В. Роль ферментов-киназ в адаптации клеток первичной культуры гиппокампа к действию гипоксии *in vitro* // Сборник тезисов 22-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». 2018. С. 354-355.

3. Mitroshina E.V., **Loginova M.M.**, Mishchenko T.A., Vedunova M.V. Possible kinases participation in adaptive processes in primary hippocampal cultures to hypoxic influence // Сборник тезисов *Glia*. 2019. 67(S1). P. E427-E428. <https://doi.org/10.1002/glia.23675>.

4. **Логинова М.М.**, Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Роль ферментов-киназ в реализации нейропротекторного действия GDNF при моделировании гипоксии в первичных культурах гиппокампа *in vitro* // Сборник тезисов XX-ой Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. 2019. С. 168-169.

5. Касаткина С.С., **Логинова М.М.**, Ярков Р.С., Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Мищенко Т.А. Изучение влияния нейротрофических факторов BDNF, GDNF на возможность восстановления функциональной активности нейронных сетей первичных культур гиппокампа после гипоксического воздействия // Сборник тезисов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2019. С. 108.

6. **Логинова М.М.**, Кузнецова А.И., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Исследование киназ-зависимых механизмов адаптации нервных клеток к глюкозной депривации *in vitro* // Сборник тезисов 72-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2019. С. 138.

7. **Логинова М.М.**, Кузнецова А.И., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Выявление внутриклеточных киназ, участвующих в адаптации нервных клеток к факторам ишемии // Сборник тезисов XV-го международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». 2019. С. 275-276.

8. **Логинова М.М.**, Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Роль киназ RAK4 и MAP3k5 в адаптации первичных культур нервных клеток к действию глюкозной депривации *in vitro* // Сборник тезисов VI-го Съезда биофизиков России. 2019. Т.1. С. 303.

9. **Логинова М.М.**, Ярков Р.С., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Исследование роли внутриклеточных киназ в адаптации нервных клеток к действию глюкозной депривации // Сборник тезисов XXI-ой Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии. 2020. С. 149-150.

10. **Логинова М.М.**, Ярков Р.С., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Влияние некоторых внутриклеточных киназ на спонтанную функциональную кальциевую активность нервных клеток при моделировании гипоксии *in vitro* // Сборник тезисов 73-й Всероссийской с международным участием школы-

конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2020. С. 117.

11. Савюк М.О., **Логинова М.М.**, Ярков Р.С., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Исследование функциональной активности первичных культур нервных клеток гиппокампа при ингибировании NIF пролилгидроксилазы в модели гипоксии *in vitro* // Сборник тезисов 73-й Всероссийской с международным участием школы-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление». 2020. С. 178.

12. **Логинова М.М.**, Ярков Р.С., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Роль киназ IKK β , SRC и RIPK в адаптации нервных клеток к воздействию гипоксии и глюкозной депривации *in vitro* // Сборник тезисов VII-ой Молодёжной школы-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН. 2020. С. 169.

13. **Логинова М.М.**, Ярков Р.С., Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Роль киназ IKK β , FLT4, eEF2K, SRC и RIPK1 в регуляции спонтанной кальциевой активности нервных клеток при моделировании факторов ишемии *in vitro* // Сборник тезисов VII Всероссийской конференции молодых ученых и студентов с международным участием "VOLGAMEDSCIENCE". 2021. С. 515-517.

14. **Loginova M.**, Mishchenko T, Vedunova M., Mitroshina E. The role of IKK β , SRC and RIPK kinases in the adaptation of neuron-glia networks to hypoxia *in vitro* // Сборник тезисов *Glia*. 2021. 69 (S1). P. E340. T10-001A. <https://doi.org/10.1002/glia.24036>

15. **Логинова М.М.**, Мищенко Т.А., Ведунова М.В., Митрошина Е.В. Роль киназ IKK β , SRC и RIPK в нейропротекторном эффекте GDNF и BDNF при моделировании гипоксии *in vitro* // Сборник тезисов VII-го Съезда физиологов СНГ. 2021. С. 59.

Учебно-методическое пособие:

1. **Логинова М.М.**, Митрошина Е.В., Мищенко Т.А., Ведунова М.В. Роль представителей нейронального киннома в регуляции жизнедеятельности клетки // Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2019. – 55 с.