Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

На правах рукописи

ЛОГИНОВА МАРИЯ МАКСИМОВНА

РОЛЬ НЕЙРОНАЛЬНЫХ КИНАЗ В АДАПТАЦИИ ЦНС К ВОЗДЕЙСТВИЮ ФАКТОРОВ ИШЕМИИ

1.5.5 – физиология человека и животных

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

кандидат биологических наук Елена Владимировна Митрошина

Нижний Новгород – 2022

Введение	
1. Обзор литературы	9
1.1. Ишемия	9
1.1.1 Ишемический каскад	
1.1.2 Роль киназ в ишемическом каскаде	
1.2 Киназы	
1.2.1 Рецепторные киназы	
1.2.2 Цитоплазматические киназы	
1.3 Первичные культуры нейронов мозга мыши как модель для исследов	зания роли
киназ	
2. Материалы и методы	
2.1 Объект исследования	
2.2 Выделение и культивирование первичных культур нервных клеток	головного
мозга мыши	
2.3 Моделирование глюкозной депривации in vitro	
2.4 Моделирование гипоксии in vitro	
2.5 Фармакологическое ингибирование внутриклеточных киназ in vitro	
2.6 Оценка жизнеспособности первичных культур	
2.7 Иммуноцитохимический анализ	
2.8 Кальциевый имиджинг	
2.9 Анализ сетевых характеристик кальциевой активности первичны	ах культур
гиппокампа мыши	
2.10 Анализ спонтанной биоэлектрической активности первичных ней	рональных
культур	
2.11 Фармакологическое ингибирование внутриклеточных киназ in vivo.	
2.12 Моделирование острой гипобарической гипоксии <i>in vivo</i>	
2.13 Моделирование ишемического повреждения головного мозга in viv	<i>o</i> 46
2.14 Тест «Открытое поле»	

2.15 Тест «Водный лабиринт Морриса»
2.16 Статистический анализ
3. Результаты и их обсуждение
3.1 Оценка жизнеспособности первичных культур нервных клеток при блокаде
киназ в физиологических условиях и при моделировании ГД
3.2 Влияние ключевых киназ на устойчивость нервных клеток к повреждающему
действию гипоксии <i>in vitro</i>
3.3 Влияние ключевых киназ на спонтанную кальциевую активность
культивируемых нейрональных клеток при моделировании факторов ишемии 60
3.4 Оценка влияния ключевых киназ на параметры нейросетевой кальциевой
активности
3.5 Оценка влияния ключевых киназ на спонтанную биоэлектрическую
активность первичных нейрональных культур при моделировании гипоксии 766
3.6 Оценка нейропротекторного эффекта применения блокаторов киназ RIPK1,
IKKb и SRC при экспериментальном моделировании гипоксии <i>in vivo</i>
3.7 Тестирование ориентировочно-двигательной активности и когнитивных
способностей животных после моделирования ОГБГ
3.8 Оценка устойчивости лабораторных животных к ишемическому повреждению
при введении ингибиторов киназ RIPK1, SRC и IKKb
3.9 Обсуждение результатов
Заключение
Выводы
Список сокращений
Список литературы 1099
Приложение

Введение

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). Киназы обнаружены в большинстве тканей млекопитающих, включая мозг. 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). функций Нарушение регуляции ИХ играет важную роль В развитии иммунологических, воспалительных, дегенеративных, метаболических, сердечнососудистых 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 распространенное ишемия широко состояние, снабжения тканей заключающееся В снижении мозга кислородом И энергетическими субстратами, что может приводить к острой и хронической дисфункции и смерти 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, рассматриваемые в качестве молекулярных мишеней при ишемическом инсульте, могут являться перспективными нейропротекторами. Однако большинство киназ и их роль в адаптации нервных клеток к воздействию ишемии еще недостаточно изучены, 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 кинома 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, IKKb, eEF2K и RIPK1.

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

Для киназ SRC, IKKb 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:

 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 поддержать 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 Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 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 PAH (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 категории Q1 и 1 категории Q2 входящих в базы Scopus и WoS), 15 тезисов в сборниках всероссийских и международных конференций и 1 учебнометодическое пособие.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, списка сокращений, списка литературы и приложения. Научная работа представлена на 152 страницах, содержит 48 рисунков, 2 таблицы и 234 источника литературы.

Благодарности

благодарность предоставленную библиотеку Автор выражает за 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). 3a разработку оригинального алгоритма анализа биоэлектрической активности клеточных культур к.б.н. Пимашкину Алексею Сергеевичу.

1. Обзор литературы

1.1. Ишемия

По данным ВОЗ на 2019 год второй по распространенности причиной смерти является инсульт, на него приходится приблизительно 11% от общего числа смертей в мире (Рисунок 1) (WHO Global Health Estimates).



Рисунок 1. Ведущие причины смерти в мире (WHO Global Health Estimates)

При инсульте происходит нарушение кровоснабжения головного мозга. (Severino et al., 2020; Gagno et al., 2020; Shin et al., 2020). В результате системного и полного прекращения кровотока во всей паренхиме в мозг перестают попадать кислород и метаболические питательные вещества, что приводит к глобальной ишемии мозга (Kirdajova et al., 2020). Человеческому мозгу, несмотря на то, что он составляет всего 2-3% от общей массы тела, в состоянии покоя необходимо около 20% кислорода от общего потребляемого количества. Учитывая высокое

потребление энергии и отсутствие значимых внутриклеточных запасов энергии, ишемия головного мозга может вызвать серьезные необратимые повреждения, ведущие к инвалидности или смерти (Smith et al., 2017).

1.1.1 Ишемический каскад

Ишемический нейрохимических каскал ЭТО ряд процессов, запускающихся при церебральной ишемии, представленный серией событий, развивающихся во времени и пространстве (Au ey al., 2018; Endres et al., 2009). Поскольку одно событие в каскаде может вызывать множество других событий, а клетки головного мозга, страдающие от нехватки кислорода на разных стадиях ишемического каскада, могут проходить через различные химические процессы, данный каскад считается весьма неоднородным явлением (Moral et al., 2019). Ишемический представлен клеточной биоэнергетической каскад недостаточностью, которая приводит к эксайтотоксичности, окислительному стрессу, повреждению гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и сосудов и постишемическому воспалению, что в конечном итоге ведет к некрозу, апоптозу нейронов, глиальных и эндотелиальных клеток (Majdi et al., 2016).

Ишемический каскад обычно продолжается часами, но может длиться несколько дней даже после восстановления кровообращения. Он начинается с тяжелой очаговой гипоперфузии. Размер необратимого повреждения будет зависеть от двух факторов: степени (компенсированная, когда изменения еще обратимы; субкомпенсированная, когда симптомы болезни становятся более выраженными, или декомпенсированная, когда возможности восстановления головного мозга исчерпаны) и продолжительности ишемии (Li et al., 2021; Sveinsson et al., 2014). Области мозга с сильно нарушенным кровотоком быстро и необратимо повреждаются и имеют название – ишемическое ядро. Клетки в ишемическом ядре быстро погибают в результате липолиза, протеолиза, дезагрегации микротрубочек, полного биоэнергетического сбоя и нарушения ионного гомеостаза (Pamenter et al., 2012; Demyanenko et al., 2020) (Pucyhok 2).



Рисунок 2. Ишемия головного мозга

Область функционально нарушенной, но структурно неповрежденной ткани, находящейся между ишемическим ядром и нормальным мозгом, называется ишемической полутенью или пенумброй. Пенумбра – это область ограниченного кровотока с частично сохраненным энергетическим обменом (Ferrer et al., 2003). Здесь запускается ишемический каскад с несколькими разрушающимися механизмами, что приводит к продолжающемуся клеточному повреждению и прогрессированию инфаркта. В конечном итоге ишемическая полутень поглощается этими прогрессирующими поражениями, сливаясь с ядром инфаркта в течение нескольких часов после начала инсульта. Однако, клетки в ишемической полутени можно спасти, улучшив кровоток или вмешавшись в ишемический каскад. Тем самым, данная область является мишенью для лечения острого инсульта (Håberg et al., 2006; Liu et al., 2016).

Клеточная биоэнергетическая недостаточность и эксайтотоксичность

Для воспроизведения энергии тканям мозга необходимо достаточное количество кислорода и глюкозы, которое зависит от окислительного фосфорилирования. При нарушении доставки главных компонентов в головной мозг и сбоя выработки источника энергии – молекулы аденозинтрифосфата (АТФ), происходит очаговая гипоперфузия.

Недостаточное количество энергии в митохондриях приводит к нарушению окислительного фосфорилирования, что приводит к накоплению в клетке лактата. Параллельно с этим возрастает уровень углекислоты в головном мозге и происходит смещение pH в кислую сторону, в результате наступает лактатацидоз (Liu et al., 2020). Энергетический дефицит нарастает, осуществляется переход на анаэробный гликолиз, возрастает количество неиспользованной в цикле Кребса альфа-кетоглутаровой кислоты, из которой синтезируется глутамат. Обратный захват глутамата становится невозможным из-за нарастающего лактатацидоза. В нервных клетках наблюдается нарушение электролитного баланса, а именно, ионы K^+ выходят во внеклеточное пространство из клетки, а ионы Na^+ , Cl^- и Ca^{2+} из внеклеточного пространства внутрь клетки. Данный процесс приводит к подавлению возбудимости нервных клеток, и их способность к проведению нервных импульсов снижается (Taoufik et al., 2008; Radak et al., 2017; Choi, 2020).

Возбуждающие нейротрансмиттеры, особенно глутамат, накапливаются во внеклеточном пространстве. Что приводит к чрезмерной стимуляции рецепторов глутамата α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол пропионовой кислоты (AMPA), каината и N-метил-d-аспарагиновой кислоты (NMDA) на нейронах, что ведет к раскрытию ионных каналов и дополнительному притоку Ca²⁺ из межклеточного пространства (Burd et al., 2016).

Также из-за воды, пассивно следующей за притоком ионов, возникает цитотоксический отек. Увеличение внутри клетки ионов Ca²⁺ инициирует образование свободных радикалов и активирует ферменты липазы, протеазы, эндонуклеазы и фосфолипазы. Активированные ферменты приводят к разрушению фосфолипидных комплексов в мембранах митохондрий, белков цитоскелета и внеклеточного матрикса, а также приводят к глобальным клеточным повреждениям и образованию свободных радикалов (Brouns et al., 2009) (Рисунок 3).



Рисунок 3. Эксайтотоксичность: в следствии лактатацидоза через транспортеры блокируется обратный захват глутамата. Происходит накопление глутамата в межклеточном пространстве, приводящее к чрезмерной стимуляции и открытию ионных каналов рецепторов. Ионы К⁺ выходят во внеклеточное пространство из клетки, а ионы Na⁺, Cl⁻ и Ca2⁺ из внеклеточного пространства. Подавляется возбудимость нервных клеток и снижается их способность к проведению нервных импульсов

Окислительный стресс

Окислительный стресс возникает, когда производство свободных радикалов превосходит клеточную способность к противодействующей системе антиоксидантной защиты. Существует множество доказательств того, что реактивные молекулы кислорода и азота являются важными медиаторами повреждения тканей при остром ишемическом инсульте (Rodrigo et al., 2013; Li et al., 2018; Ya et al., 2018; Cui et al., 2019; Liu et al., 2019).

Супероксид (O₂⁻) – это первичный радикал, из которого образуется перекись водорода (H₂O₂). Из H₂O₂ образуется гидроксильный радикал (OH), который

является сильным окислителем липидов и белков (Рисунок 4). Опасным окислителем считается только гидроксильный радикал, но из-за образования его из супероксида и перекиси водорода, все эти соеденения носят название – активные формы кислорода (АФК) (Cobley et al., 2018).



Рисунок 4. Химические реакции образования перекиси водорода и гидроксильного радикала

Оксид азота (NO) – свободный радикал, синтезируемый из L-аргинина тремя типами синтаз оксида азота (NOS) (Рисунок 5) (Yang et al., 2019).



Рисунок 5. Химическая реакция образования оксида азота

Полагают, что цитотоксическое действие оксида азота обусловлено его реакцией с супероксидом, в результате которой образуется пероксинитрит, который может разлагаться образованием гидроксильного с радикала. Образование пероксинитрита гидроксильного И радикала приводит к повреждению клеток (Рисунок 6) (Love, 1999; Доровских и др., 2007).



Рисунок 6. Химические реакции образования пероксинитрита и гидроксильного радикала

Свободные радикалы негативно воздействуют на мембрану митохондрий и процессы окисления белков, происходит дисфункция митохондрий, ведущая к клеточной гибели (Blomgren et al., 2005; Kong et al., 2016).

Дисфункция ГЭБ

Помимо повреждения нервных клеток головного мозга, окислительный стресс способен угнетать эндотелиальные клетки и активировать матриксные металлопротеиназы (MMP), в частности MMP-9, что приводит к увеличению проницаемости ГЭБ (Abdullahi et al., 2018).

Растворение эндотелия начинается уже через 2 часа после начала ишемии. В течение 24-72 часов после инфаркта наступает усиленное повреждение тканей изза инфильтрации лейкоцитов и ММР-9 в головной мозг (Jiang et al., 2017; Cai et al., 2017). Попадание высокомолекулярных молекул и воды в мозг, вследствие осмоса, инициирует вазогенный отек, что также вызывает повреждение ГЭБ. Поврежденный ГЭБ способствует постишемической воспалительной реакции, облегчая трансмиграцию воспалительных клеток (Hu et al., 2017).

Микроваскулярное повреждение, вызванное ишемией

Ишемия поражает капилляры, способствуя повреждению церебральной ткани за счет увеличения проницаемости эндотелиальных клеток, деградации матрикса и потери цереброваскулярной ауторегуляции (Zoppo et al., 2007; Lv et al., 2016).

При артериального цереброваскулярная изменениях давления ауторегуляция служит для поддержки постоянной перфузии (прохождение потоков крови через мозг). Если происходит снижение давления церебральной перфузии, то артериолы расширяются, тем самым становится тяжелее поддерживать церебральный кровоток (Castro et al., 2017). Расширение сосудов различными метаболическими, может инициироваться миогенными И эндотелиальными механизмами, например, гипоксией, ацидозом, мышечным расслаблением. Также повреждение эндотелия снижает высвобождение оксида азота и простациклина и может вызвать выработку эндотелина-1, являющегося сильнодействующим вазоконстриктором (Cheng et al., 2019). При ишемии в плазме наблюдается рост уровня эндотелина-1, что связано с отеком головного мозга (Liu et al., 2014; Oliveira-Ferreira et al., 2020).

Постишемическое воспаление

В след за очаговой ишемией головного мозга следует сильная воспалительная реакция, которая запускает включение воспалительных клеток, молекул адгезии и регуляторов транскрипции (Jin et al., 2017).

В развитии постишемического воспаления участвуют несколько типов клеток. Прежде всего, это микроглия и астроциты, активирующие АФК. Астроциты способны секретировать воспалительные факторы, такие как цитокины и хемокины. Микроглия может трансформироваться в фагоциты, которые способны выделять цитотоксические или цитопротективные вещества (Morizawa et al., 2017; Zhao et al., 2017).

В течение 4-6 часов после ишемии лейкоциты могут крепиться к стенкам сосудов и мигрировать в головной мозг, высвобождая провоспалительные медиаторы и вызывая вторичное повреждение (Hung et al., 2020). Молекулы адгезии играют ключевую роль в инфильтрации лейкоцитов в паренхиму головного мозга. Взаимодействие между лейкоцитами и эндотелием сосудов опосредуется тремя основными группами молекул клеточной адгезии: селектинами, иммуноглобулинами и интегринами (Jordán et al., 2008).

Некроз и апоптоз, вызванные ишемией

Ишемическое повреждение вызывает некроз, молниеносную форму гибели клеток, связанную с повреждением плазматической мембраны и цитотоксическим отеком как самой клетки, так и внутренних органелл (Niquet et al., 2006). Параллельно с некрозом может запускаться генетически регулируемая программа – апоптотическая гибель клеток, которая приводит к смерти с минимальным возможным воспалением (Ueda et al., 2004).

Преобладающим механизмом клеточной гибели является некроз. Он возникает после острой долговременной окклюзии сосудов, апоптоз же инициируется при более легком повреждении, чаще в пределах области пенумбры (Wang et al., 2016). Также на тип клеточной гибели могут вляить такие факторы,

как степень ишемии, зрелость клеток, концентрация ионов Ca^{2+} и клеточное микроокружение (Fricker et al., 2018).

1.1.2 Роль киназ в ишемическом каскаде

В ответ на разные этапы ишемического каскада активируются внутриклеточные механизмы, направленные как на выживание клеток, так и на образование проапоптотических белков, ведущих к запуску апоптоза и клеточной гибели. Участниками данных механизмов являются ферменты – киназы (Su et al., 2022).

Например, при эксайтотоксичности и окислительном стрессе сигнальные каскады киназ инициируют экспрессию генов раннего ответа, таких как, *c-fos, c-jun, krox-20*, регулирующих клеточную выживаемость (Черешнев и др., 2015). При разрушении ГЭБ и постишемическом воспалении киназы могут запускать факторы транскрипции, участвующие в регуляции воспаления, такие как ядерный фактор kB (NF-kB) (Xie et al., 2019) и митоген-активируемые протеинкиназы (MAPK) (Wang et al., 2019). Следовательно, киназам отведена огромная роль при ишемическом повреждении.

1.2 Киназы

Протеинкиназы составляют почти 2% генома человека и контролируют протекание большого числа метаболических процессов, в том числе тех, которые регулируют жизнеспособность и функциональную активность клеток нервной системы путем запуска различных внутриклеточных сигнальных путей (Chen et al., 2014). Протеинкиназа – это фермент, который модифицирует другие белки путем химического добавления концевой фосфатной группы АТФ к остаткам аминокислот серина, треонина или тирозина, этот процесс известен, как фосфорилирование (Kannaiyan et al., 2018) (Рисунок 7).



Рисунок 7. Фосфорилирование: перенос протеинкиназой остатка фосфорной кислоты от молекулы АТФ с последующим превращением АТФ в АДФ и активацией протеинкиназы по сериновому остатку

Данные ферменты способны отвечать за каталитический перенос γ-фосфата АТФ на нижележащие субстраты, благодаря переключению из неактивного «выключенного» состояния в активное «включенное». Переключение между этими состояниями включает движения двух консервативных структурных мотивов – мотива аспартат-фенилаланин-глицин (DFG) и αС-спирали, называемой гидрофобным карманом (Lakkaniga et al., 2019).

Структурно киназа разделена на меньшую N-долю и большую C-долю, а на границе этих долей, как шарнир, находится карман для связывания АТФ. Внутри кармана связывания АТФ находится мотив DFG. Активация или ингибирование каталитической активности киназы часто опосредуются взаимодействием кармана связывания с другими доменами протеинкиназы, посттрансляционными модификациями и взаимодействиями с соседними белками (Leroux et al., 2020). В активном состоянии DFG принимает конформацию «in», а в неактивном состоянии DFG принимает конформацию (Nakae et al., 2021) (Рисунок 8).



Рисунок 8. Схематичное изображение перехода киназы из конформации «out» в конформацию «in»: в конформации «in» фенилаланин (Phe) направлен в полость, прилегающую к остаткам DFG, и в сторону αС-спирали; в конформации «out» фенилаланин направлен от αС-спирали

В конформации «out» открывается гидрофобный карман, который затем может занимать ингибитор. Существует распространенная группа ингибиторов киназ, содержащих гетероциклическую систему, которая образует одну или две водородные связи с шарнирным остатком киназы. Они также содержат гидрофобный фрагмент, который занимает карман, образованный сдвигом фенилаланина из мотива DFG (Garuti et al., 2010; Ung et al., 2018).

Эукариотические протеинкиназы классифицируют по фосфорилированию остатков аминокислот на тирозиновые (Tyr), серин-треониновые (Ser-Thr), и киназы с двойной специфичностью (Gao et al., 2019) и по месторасположению в клетке на рецепторные и цитоплазматические (O'Malley, 2020; Diallo et al., 2011; Roskoski, 2012)

1.2.1 Рецепторные киназы

Рецепторные тирозинкиназы обеспечивают связь между клетками и их внеклеточной средой. Они подразделяется на несколько подсемейств, включая рецепторы эпидермального фактора роста (ErbB), рецепторы фактора роста

эндотелия сосудов (VEGFR), рецепторы фактора роста фибробластов (FGFR), рецепторы тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), инсулин и рецепторы инсулиноподобного фактора роста (IR и IGFR), рецепторы фактора роста нервов (NGFR) и тропомиозиновые рецепторы (TRK) (Li et al., 2010).

Рецепторные тирозинкиназы специализируются на различных функциях, но все они представлены несколькими доменами: N-концевой внеклеточный домен (рецепторная функция); трансмембранный домен (функция заякоривания) и цитоплазматический домен (Lemmon et al., 2010).

За исключением подсемейства рецепторов инсулина (IR), все известные тирозинкиназы являются мономерами в клеточной мембране. Связывание лиганда вызывает димеризацию этих рецепторов, что приводит к аутофосфорилированию их цитоплазматических доменов (Schlessinger, 2000) (Рисунок 9).



Рисунок 9. Активация рецепторной тирозинкиназы: 1 – неактивная рецепторная тирозинкиназа TRKB; 2 – два рецептора TRKB, стимулированные BDNF, притягиваются друг к другу, и наступает процесс димеризации; 3 – аутофосфорилирование цитоплазматических доменов двух рецепторов по тирозиновым остаткам, инициирующее активацию TRKB; 4 – активация внутриклеточных субстратов фосфорилированной TRKB киназой

После активации тирозиновые киназы фосфорилируют внутриклеточные субстраты, вызывая мощный сигнал, управляющий важными клеточными функциями (Du et al., 2018).

Представителями подсемейства тирозин киназ, регулирующих развитие синаптической эффективности И пластичности В нервной системе млекопитающих, являются киназа А (TRKA), киназа В (TRKB) и киназа С рецептора тропомиозина (TRKC) (Artim et al., 2020). Через данные рецепторные киназы фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) и нейротрофин-3 (NT-3) способны оказывать нейропротекторное действие против эксайтотоксичности, вызванной ишемией. Однако, действия молекулярные механизмы рецепторов данных нейротрофинов, участвующих в нейрозащитных эффектах, еще полностью не выяснены (Bogetti et al., 2018).

Кроме вышеописанных тирозинкиназных рецепторов по литературным данным существует целый ряд киназ, которые учувствуют в процессах жизнедеятельности клеток на различных стадиях ишемического каскада.

Рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R) запускает проангиогенный сигнальный путь, что увеличивает перфузию церебральной крови за счет стимуляции ангиогенеза и ведет к облегчению гипоксического поражения в ишемической области (Zhang et al., 2019). Рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) и тромбоцитарный фактор роста (PDGF) в большом количестве экспрессируются в центральной нервной системе и оказывают плейотропное действие при дисфункции ГЭБ (Nguyen et al., 2021). Рецептор фактора некроза опухоли (TNFR) от TNF-а передает сигнал внутрь клетки, вызывающий микроглиальную регулирующую активность при ишемии, связанную как с повреждающими, так и с защитными функциями (Raffaele et al., 2020). Fms-связанная тирозинкиназа 4 (FLT4) / фактор роста эндотелия сосудов (VEGF3) при церебральной ишемии активирует макрофаги в лимфатическом узле, что способствует усилению воспалительной реакции, соответственно блокада данного рецептора позволит снизить активацию провоспалительных макрофагов и уменьшить инфаркт головного мозга (Esposito et al., 2019).

Есть данные о рецепторных киназах, которые, действуя совместно с факторами роста, отвечают за важные процессы в ЦНС, однако их действие при ишемическом поражении пока еще не исследовано.

Рецептор фактора роста фибробластов (FGFR) и рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) играют важную роль в эмбриональном развитии ЦНС и являются основными мишенями для лечения опухолей головного мозга (Bale, 2020; Eskilsson et al., 2018). Белковая тирозинкиназа (KIT) / рецептор фактора роста тучных и стволовых клеток (SCFR) со своим лигандом c-kit является ключевым контролирующим рецептором, присутствуя как на периферических, так и на центральных окончаниях, тем самым способствуя регуляции боли в спинном мозге (Pop et al., 2013). Киназа анапластической лимфомы (ALK) / рецептор трансформирующего фактора роста β (TGFβR) отвечает за развитие различных типов опухолей, ингибиторы данной киназы используются для предотвращения появления метастазов В головной мозг. Миелоидноэпителиально-репродуктивная тирозинкиназа (MER) является членом семейства рецепторных тирозинкиназ Tyro-Axl-Mer (TAM) и играет важную роль в периферических регуляции воспалительных реакций В макрофагах И (Wu et al., 2021). Рецептор клетках головного микроглиальных мозга колониестимулирующего фактора 1 (CSF-1R) / с-FMS также регулирует развитие большинства тканевых макрофагов и микроглии (Pyonteck et al., 2013), а еще является перспективной мишенью в терапии нейродегенеративных заболеваний (Olmos-Alonso et al., 2016).

1.2.2 Цитоплазматические киназы

Сигнальные пути МАРК

Множественные стимуляторы, такие как активация ионами Ca²⁺, факторы роста, цитокины, вирусы, лиганды рецепторов, связанных с G-белками, и

онкогены активируют пути МАРК. Каскады МАРК являются центральными сигнальными элементами, которые регулируют основные процессы, включая пролиферацию, дифференцировку, выживаемость и реакцию на стресс, в том числе и ишемический, в клетках (Zhou et al., 2020).

Определены четыре каскада МАРК: киназа 1/2, регулируемая внеклеточными сигналами (ERK1/2), p38MAPK, N-терминальная киназа с-Jun (JNK) и ERK5 (Guo et al., 2020). Известно, что фосфорилирование ERK 1/2 значительно увеличивается при реперфузии (Zhou et al., 2015), p-38MAPK активируется различными внеклеточными медиаторами воспаления, тогда как изоформы JNK сильно активируются во время различных реакций клеточного стресса (Xie et al., 2018).

Сигнальный каскад МАРК / Erk является наиболее тщательно изученным сигнальным путем, включающий в себя несколько киназ: белок 2, связанный с рецептором фактора роста (GRB2), фактор обмена гуаниновых нуклеотидов / Son of Sevenless (SOS), серин / треонин-специфические протеинкиназы rat sarcoma virus (RAS) и rapidly accelerated fibrosarcoma (RAF), MAPK 1/2 и ERK1/2 (Sun et al., 2015). Его конечной целью становятся фосфорилирование ядерных факторов транскрипции: белка, связывающего ответный элемент цАМФ (CREB), фактора Мус, белка 53 (р53), регулирующих экспрессию генов и отвечающих за регуляцию жизненноважных клеточных функций (Eriksson et al., 2007; Yang et al., 2020).

Сигнальные каскады p38MAPK и JNK, активированные киназой 1, (ASK1), способны фосфорилировать регулирующей сигнал апоптоза транскрипции, активирующий дополнительные факторы включая транскрипционный фактор 2 (ATF-2) и белок ETS Like-1 (ELK-1) (Remy et al., 2010). А субстратами сигнального каскада МАРК / ERK5 являются фактор миоцитов 2 (MEF2), коннексин 43 транскрипции усиления (Cx43) И апоптотический белок Bad (Nishimoto et al., 2006; Cargnello et al., 2011) (Рисунок 10).



Рисунок 10. Сигнальные пути МАРК. А – каскад ERK1/2: сигнал от BDNF через TRKB рецептор инициирует присоединение к рецептору белков GRB2 и SOS, образуя комплекс «рецептор-GRB2-SOS». Белок SOS, оказавшийся рядом с киназой Ras, активирует ее путем замены нуклеотида гуанозиндифосфата (ГДФ) на гуанозинтрифосфат (ГТФ). Активированная Ras связывается с нижестоящими мишенями, и в конечном итоге, фосфорилированная ERK перемещаются в ядро и регулирует активность различных факторов транскрипции. Б – каскад р38МАРК и В – каскад JNK: активированная киназа ASK1 запускает сигнальные пути р38МАРК и JNK, фосфорилирующие различные факторы транскрипции. Г – каскад ERK5: активированные внеклеточными стимулами MEKK2 или MEKK3 запускают путь ERK5

Сигнальный путь РІЗК / АКТ

Сигнальный путь PI3K / АКТ регулирует широкий спектр клеточных функций, включая выживаемость, пролиферацию, метаболизм и регуляцию апоптоза (Zhang et al., 2018), который, особенно, способен активироваться при церебральной ишемии и реперфузионном повреждении (Zhao et al., 2020).

Активация пути PI3K / АКТ может осуществляться с помощью различных факторов роста, включая глиальный нейротрофический фактор (GDNF), BDNF (Zhong et al., 2020), PDGF, инсулиноподобный фактор (IGF) (Tian et al., 2020), эпидермальный фактор роста (EGF) (Parra-Mercado et al., 2019), а также

нерецепторными протеинтирозинкиназами, например, семейством SRC киназ (Thamilselvan et al., 2007). Ключевыми киназами, участвующими в передачи сигнала в данном пути являются фосфоинозитид-3-киназа (PI3K), фосфоинозитид-зависимая киназа 1 (PDK1), протеинкиназа Вα (AKT), и мишень рапамицина у млекопитающих (mTOR) (Рисунок 11).



Рисунок 11. Сигнальный путь PI3K / АКТ: активированная GDNF, киназа PI3K, состоящая из регуляторной p85 и каталитической p110 субъединиц, фосфорилирует PIP-2 с образованием второго мессенджера PIP-3. Однако, негативный регулятор гомолог тензина (PTEN) способен ингибировать сигнальный путь PI3K / АКТ путем гидролиза фосфотидилинозитола (PIP-3) до

PIP-2, что может приводить к отсутствию нижестоящего фосфорилирования AKT. PIP-3 опосредует различные клеточные функции PI3K посредством специфического взаимодействия с PDK1, которая, в свою очередь, приводит к фосфорилированию AKT киназы. Активированная AKT киназа приводит к фосфорилированию членов семейства Bcl-2, регулирующих апоптоз, и киназы mTOR. mTORC фосфорилирует p70S6K и 4E-BP1, для которых целевыми субстратами являются рибосомные белки S6 и 4E, стимулирующие синтез белка

АКТ киназа, считающаяся центральным медиатором данного сигнального пути способствует активации членов семейства Bcl-2 и киназы mTOR.

Семейство Bcl-2 включает в себя антиапоптотические белки (Bcl-2, Bcl-xL), проапоптотические белки (Bax, Bak) и белки, выполняющую двойную функцию (Bad), соотношение которых играет важную роль в апоптозе. Взаимодействие между данными белками регулируется AKT (Simonyan et al., 2016). Дисбаланс в соотношении, например, Bax / Bcl-2, вызванный АФК, может привести к увеличению уровней цитохрома с в цитоплазме, что активирует ферменты каспазы-3 (Kucukler et al., 2020).

Киназа mTOR, состоящая из комплекса mTORC1 и mTORC2 играет ключевую роль в идентификации сигналов роста и пролиферации клеток (Losiewicz et al., 2020). mTORC фосфорилирует рибосомную протеинкиназу S6 бета-1 (р70S6K) и эукариотический фактор инициации трансляции 4E-связывающий белок 1 (4E-BP1) для стимуляции синтеза белка. Целевыми субстратами для р70S6K и 4E-BP1 являются рибосомные белки S6 и 4E (Li et al., 2012; Qin et al., 2016).

Сигнальный путь JAK / STAT

Путь передачи сигналов JAK / STAT представлен тремя основными компонентами: тирозинкиназным рецептором, янус киназой (JAK) и белком преобразователя сигнала и активатора транскрипции (STAT). Через данный киназный путь свои сигналы передают различные цитокины и факторы роста, включая EGF, интерлейкин 2 (IL-2), PDGF и интерфероны (IFN) (Heim, 1999; Horvath, 2004).

Путь JAK / STAT связан с различными функциями организма и участвует в важных биологических процессах: пролиферации, дифференцировки, регуляции апоптоза, иммунной регуляции и гематопоэзе (Silver-Morse et al., 2013). Играет важную роль в опосредованных цитокинами воспалительных реакциях в эндотелиальных клетках микрососудов и способен вызывать активацию астроцитов во время ишемического повреждения (Gong et al., 2019) (Рисунок 12).



Рисунок 12. Сигнальный путь JAK / STAT: сигнал от IL-2 вызывает димеризацию рецептора IL-2R, приводящую к сближению тирозинкиназ JAK, которые фосфорилируют друг друга остатками тирозина. STAT связывается с фосфорилированным рецептором IL-2R, а после фосфорилируются JAK. Активированный STAT диссоциирует от рецептора IL-2R и образует димер, который затем транспортируется в ядро клетки для регулирования экспрессии цитокинчувствительных генов

Сигнальные пути, активирующие NF-kB

NF-кВ способен играть важную роль в формировании церебральной ишемической толерантности, регулируя транскрипционную экспрессию геновмишеней и активность других путей, участвующих в церебральной ишемии, что может приводить к ишемической устойчивости к последующему гипоксическому повреждению (Liang et al., 2019).

Сигналы к NF-кВ могут поступать от рецептора фактора некроза опухоли (TNFR), толл-подобного рецептора (TLR) и рецептора интерлейкина (IL-1R) (Thoma et al., 2018; Brás et al., 2020). У млекопитающих сеть NF-кВ состоит из пяти белковых мономеров: p65 / RelA, RelB, cRel, p50 и p52. Они образуют гомодимеры или гетеродимеры, которые дифференциально связываются с

дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК) и регулируются двумя путями: каноническим (NEMO-зависимый путь) (Рисунок 13) и неканоническим (NEMO-независимый путь) (McNamara et al., 2020).



Рисунок 13. Сигнализация NF-kB через NEMO-зависимый путь: активированный комплекс киназ, состоящий из каркасного адапторного белка NEMO и двух киназ IKKα и IKKβ, связывается и фосфорилирует белки IkB, что приводит к убиквитинированию и последующей протеасомной деградации. Когда IkB разрушаются, свободный NFkB перемещается в ядро, где он связывается с сайтами кB на ДНК и активирует экспрессию генов

Прочие киназы

Большой группой представителей тирозиновых киназ, не являющихся рецепторами на клеточной мембране, является семейство SRC киназ. Киназы этого семейства (SRC, FYN, YES, LCK и LYN) высоко экспрессируются в центральной нервной системе (Park et al., 2013).

SRC киназа была первой описанной нерецепторной тирозинкиназой. По литературным данным известно, что при церебральной ишемии активированная SRC регулирует утечку апоптогенных факторов из митохондрий в цитозоль, что приводит к активации каспаз 3, 7 и 9 и последующей фрагментации ДНК и гибели клетки (Tian et al., 2009; Kratimenos et al., 2017). Киназа FYN может способствовать окислительному стрессу в клетке путем связывания C-конца – NADPH-оксидазы 4 и колокализации с ней в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и ядре. Киназа Lyn при клеточном повреждении включает остановку клеточного цикла, активацию репарации ДНК и запускает индукцию апоптоза (Bagnato et al., 2020). Гибридный белок BCR-ABL, также являющийся тирозинкиназой, взаимодействует с киназами SRC семейства, активируя их, что в следствие может вызывать активацию пути MAPK / ERK и фактора NF-kB (Li, 2007).

Цитоплазматические серин-треониновые протеинкиназы составляют многочисленную группу. В настоящее время описан ряд киназ, который способен усугублять разрушающее действие ишемии, и возможно их потенциальная блокада может оказывать нейропротекторное действие.

Рецептор-взаимодействующая протеинкиназа 1 (RIPK1), взаимодействуя с RIPK3 и киназой смешанного происхождения / mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL), запускает некроптоз, который считается провоспалительной формой гибели клеток (Newton et al., 2016). Также, к этой группе киназ можно отнести казеинкиназу 2 (СК2), приводящую к нарушению митохондриального гомеостаза (Baltan et al., 2018); Rho-ассоциированную протеинкиназу (ROCK), вызывающую повреждение миелина (Li et al., 2020; Zhang al., 2020); et связанную co смертью протеинкиназу (DAPK), способствующую округлению клеток и образованию аутофагических пузырьков (Kang et al., 2010; Williams et al., 2019); киназу 2 с высоким содержанием лейцина (LRRK2), усугубляющую воспалительные реакции (Bae et al., 2018); киназу

легкой цепи миозина (MLCK), индуцирующую ремоделирование клеточного скелета и разрушающую внутриклеточные плотные соединения, способствуя проницаемости эндотелия, что разрушает ГЭБ (Li et al., 2021); протеинкиназу С (PKC), снижающую обратный захват глутамата, вызывая астроцитарную дисфункцию (Liu et al., 2017).

Существует группа киназ которая на разных стадиях ишемического каскада способствует запуску внутриклеточных процессов, напротив, способствующих адаптации и защите нервных клеток от гибели: киназа фактора элонгации 2 эукариот (eEF2K), замедляющая скорость удлинения пептидной цепи при гипоксии, тем самым сохраняя уровни $AT\Phi$ в клетке (Moore et al., 2015; Horman et АМР-активированная опосредующая al., 2003); протеинкиназа (AMPK), адаптацию клеток к низким уровням энергии для восстановления клеточной поставки ATΦ (Dengler, 2020); протоонкогенная протеинкиназа (Pim1), предотвращающая апоптоз 3a счет активации аутофагии; киназа-3 гликогенсинтазы (GSK3), отвечающая за архитектуру и ремоделирование нейронов посредством модулирующих взаимодействий с микротрубочками (Zhu et al., 2018).

Также, можно выделить группу киназ, о действии которых в головном мозге при гипоксическом стрессе очень мало данных, к ним относятся: киназа, мутированная в результате атаксии-телеангиэктазии (АТМ), киназа, связанная с атаксией-телеангиэктазией и Rad3 (ATR) и их эффектор киназа контрольной точки (CHK), активирующиеся В ответ на разрывы цепей ДНК И фосфорилирующие p53 (Eymin et al., 2006; Lee et al., 2012); гистондеацетилаза сиртуин 1 (SIRT1), действующая как сенсорный регулятор в ответ на окислительный стресс и ослабляющая сосудистую дисфункцию (Meng et al., 2020); циклин зависимая киназа 4 (CDK4) и CDK6, регулирующие развитие клеточного цикла и являющиеся подтвержденными мишенями при лечении рака (Bronner et al., 2019); полинуклеотидкиназа (PNK), играющая роль в репарации разрывов ДНК (Nair et al., 2016; Shang et al., 2020); панкреатическая eIF-2 киназа (РЕК), снижающая инициацию трансляции, репрессируя глобальный синтез белка

(Kulalert et al., 2017); интегрин-связанная киназа (ILK), контролирующая динамику цитоскелета (Garcia-Marin et al., 2021); фермент 1, требующий инозитола (IRE1), являющийся основным медиатором развернутого белкового ответа во время стресса ЭПР (Doultsinos et al., 2021); IL-1R1-ассоциированная киназа (IRAK) и TANK-связывающая киназа 1 (TBK1), участвующие в регуляции множественных воспалительных сигнальных каскадов (Revach et al., 2020); диацилглицерин киназа (DAGK), выступающая в качестве переключателя сигналов между липидами (Liu et al., 2020); сывороточная и глюкокортикоид-индуцированная киназа 1 (SGK1), регулирующая широкий спектр каналов и транспортеров (Lang et al., 2012); p21-активированная киназа 4 (PAK4), играющая центральную роль в реорганизации цитоскелета (Won et al., 2019).

Наконец, редставителями киназ с двойной специфичностью являются Cdc2подобная киназа (CLK) и киназа 1А, регулируемая тирозин-фосфорилированием с двойной специфичностью (DYRK1A), осуществляющие фосфорилирование не только по серин/треонину, но и по тирозину (Dekel et al., 2020). Данные киназы участвуют в регуляции альтернативного сплайсинга пре-мРНК посредством фосфорилирования белков, богатых серин-аргинином. Нарушение регуляции этого процесса связано с прогрессированием рака и нейродегенеративными заболеваниями (Artarini et al., 2019; Tazarki et al., 2019).

Подводя итог выжеизложенного, можно сделать вывод о том, что в настоящее время изучение новых возможностей и механизмов предотвращения гибели нервных клеток головного мозга при церебральной ишемии с участием киназ, как потенциальных нейропротекторных мишений, является перспективным направлением.

1.3 Первичные культуры нейронов мозга мыши как модель для исследования роли киназ

Эксперименты *in vitro* являются отправной точкой для разработки потенциальных лекарств при различных патологиях (Falkenburger et al., 2016).

Первичные культуры нервных клеток идеально подходят для скрининга различных химических веществ и соединений на предмет возможных нейротоксичных эффектов (Tasca et al., 2015).

Эмбриональные культуры гиппокампа мозга мыши в отличие от культивирования нейронов взрослых животных, являются предпочтительными изопределенной популяции пирамидных клеток и относительно низкой за плотности глии. Нейроны гиппокампа обеспечивают монослой клеток, позволяя отлично визуализировать отдельные клетки, а также детально изучать конкретные молекулярные механизмы и клеточные события (Roppongi et al., 2017). Развивающиеся нейроны и астроциты следует рассматривать как динамически растущие сети, которые способны приобретать связи с соседними клетками (Gafarov, 2018). Сохранность нейрон-глиальных связей представляет собой показатель широкого спектра свойств нейронов при моделировании стрессфакторов, включая синаптическую связность, внутренние электрические свойства и интенсивность передачи сигналов (Sun et al., 2021).

Использование методов визуализации ионов Ca²⁺ в нейронах и астроцитах позволяет регистрировать функциональные свойства нейронных сетей, тем самым предоставляя информацию о химическом нарушении в работе клеток (Saavedra et al., 2021). С помощью мультиэлектродных матриц можно регистрировать потенциалы действия электрически активной ткани, выращенной на сетке электродов, что позволяет также дополнительно оценить функциональную целостность нейронных сетей, обеспечивая множество преимуществ для скрининговых анализов (Heidemann et al., 2014).

Исследования *in vitro* и *in vivo* позволяют предоставить целостную картину об эффективности соединений, используемых в качестве нейропротекторов при ишемическом повреждении.

2. Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Объектом исследований *in vitro* являлись первичные культуры коры больших полушарий и первичные культуры гиппокампа, полученные из головного мозга эмбрионов мышей линии C57BL/6 (E18). Первичные культуры коры использовались для анализа жизнеспособности во время скрининга киназ, а первичные культуры гиппокампа для оценки сохранения функциональной целостности нейрон-глиальной сети.

Исследования *in vivo* были проведены на 146 самцах мышей линии C57BL/6. Все исследования проводились на самцах, чтобы исключить влияние 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 был свободный доступ к пище и воде.

Условия содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали «Правилам проведения работ ДЛЯ с использованием (Россия, 2010) экспериментальных животных» И «Международным рекомендациям (этическому кодексу) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (CIOMS и ICLAS, 2012). Также соблюдались нормативы, Европейской строго этические установленные 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.)

2.2 Выделение и культивирование первичных культур нервных клеток головного мозга мыши

Эвтаназия беременных мышей осуществлялась путем дислокации шейных позвонков. Извлеченную матку с эмбрионами промывали стерильным раствором Хенкса (арт. Р020п, ПанЭко, Россия). Производилось извлечение эмбрионов, их также помещали в раствор Хенкса. Далее, под бинокуляром с помощью пинцета и скальпеля извлекался головной мозг, который помещали в фосфатный буферный солевой раствор (PBS) (арт. 10010023, Thermo Fisher, США). Затем с помощью другой пары скальпеля и пинцета из мозга эмбрионов мыши выделяли кору больших полушарий, которые также помещались в PBS.

Для скрининга влияния ингибиторов киназ на устойчивость нервных клеток к действию ГД использовались культуры коры больших полушарий. Для исследования нейросетевой активности были использованы культуры клеток гипокампа. Выделенную кору полушарий или гиппокампы, с целью разрушения клеточных пептидных связей, помещали в 0,25 % раствор трипсина (арт. 25050014, Thermo Fisher, США) и инкубировали в течение 20 минут. Затем клеточная суспензия подвергалась промывке раствором PBS и помещалась в питательную среду – Neurobasal medium 1 (NBM1). NBM1 состоит на 93 % из среды NBM (арт. 21103049, Thermo Fisher, США), на 6 % из сыворотки эмбриональной телячьей крови (арт. FB-1001S/100, Biosera, Франция), на 1 % из биоактивной добавки B27 (арт. 17504044, Thermo Fisher, США) и на 0,2 % из Lглутамина (арт. 25030081, Thermo Fisher, США).

Затем клетки в питательной среде NBM1 ресуспензировались с помощью дозатора и центрифугировались в течение 3 минут при относительном ускорении 184 g. Клеточную суспензию снова ресуспензировали и дозатором раскапывали на стекла, которые лежали в чашках Петри или клеточных планшетах. На стекла предварительно был нанесен раствор полиэтиленимина (арт. 181978-100G, Thermo Fisher, США), стекла с полиэтиленимином инкубировались в CO₂ инкубаторе около часа. Распределенная клеточная суспензия на стеклах

выдерживалась 50 минут в CO₂ инкубаторе, после чего лунки планшета и чашки Петри заливались культурной средой NBM1.

В последующие дни среда NBM1 частично менялась на NBM3 (98 % – среды NBM, 1 % – B27, 0,5 % – L-глутамина, 0,6 % – сыворотки эмбриональной телячьей крови). Частичная замена среды при культивировании проводилась 1 раз в 2 суток (Vedunova et al., 2016).

2.3 Моделирование глюкозной депривации in vitro

На 14 сутки развития первичных культур нервных клеток проводилось моделирование ГД. Нормоксическую культуральную среду NBM3 в течение 1 часа заменяли на нейробазальную среду (арт. Н333п-10, ПанЭко, Россия), не содержащую в своем составе глюкозу, лактат и пируват, с последующей обратной заменой на стандартную среду (Митрошина и др., 2017).

2.4 Моделирование гипоксии in vitro

Для моделирования гипоксии *in vitro* на 14 сутки развития первичных культур использовали среду NBM с низким содержанием кислорода (Vedunova et al., 2015). Данная культуральная среда была получена путем вытеснения (в течение 10 минут) кислорода аргоном в герметичной камере. Методом йодометрического титрования Винклера было установлено, что концентрация растворенного кислорода снижалась с 3,26 мл/л (физиологическая среда) до 0,37 мл/л (гипоксическая среда) (Vedunova et al., 2014). После 10 мин инкубации гипоксическую среду заменяли стандартной культуральной средой.

2.5 Фармакологическое ингибирование внутриклеточных киназ in vitro

Использованные в работе ингибиторы киназ были выбраны из библиотеки ингибиторов, предоставленной Институтом онкологических исследований

Онтарио (OICR) Медицинским Берлина Шарите И университетом (Medizinuniversität Charité Berlin). были синтезированы Соединения И протестированы в соответствии с процедурами, описанными в статьях и патентной литературе (данные размещены на сайте «PubChem»). Все соединения использовались в виде 100% растворов в диметилсульфоксиде (ДМСО). Ингибиторы киназ представляют собой ароматические углеводороды, структуры соединений показаны в Приложении 1.

Аппликация ингибиторов киназ проводилась на 14 день культивирования первичных культур нервных клеток в концентрации 1 µM за 20 минут до моделирования факторов ишемии, во время и после замены культуральной среды на нормоксическую (Рисунок 14).



Рисунок 14. Схема эксперимента in vitro

2.6 Оценка жизнеспособности первичных культур

Анализ оценки жизнеспособности первичных культур осуществлялся с применением красителей йодид пропидия (арт. P4170-25MG, Merck KGaA, Германия) и бисбензимида Н 33258 (арт. B1155-100MG, Merck KGaA, Германия). Йодид пропидия связывается с ДНК путем интеркаляции между основаниями. Он не проницаем для мембран живых клеток, что делает его универсальным маркером поврежденных клеток. Бисбензимид, в свою очередь, проникает через
мембраны клеток, связываясь с областями ДНК, богатыми аденин-тимином, тем самым окрашивая все ядра в клетках культуры.

Добавление йодид пропидия и бисбензимида происходило в концентрациях 5 мкг/мл и 1 мкг/мл за 30 мин до регистрации сигнала. Окрашенные культуры наблюдались с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа ZEISS Observer A1 (Carl Zeiss, Германия) с объективом 20 ×/0,2 (Carl Zeiss, Германия) (Рисунок 15).



Рисунок 15. Пример визуализации окрашивания для оценки жизнеспособности клеток первичных культур гиппокампа на 21 сутки развития: А – снимок в проходящем свете; Б – окрашивание бисбензимидом; В – окрашивание йодид пропидием

Для каждой клеточной культуры было проанализировано по 10 полей зрения. Жизнеспособность нервных клеток ($N_{\text{ж.}}$) рассчитывалась как отношение количества ядер живых клеток ($N_{\text{общ.}}-N_{\text{м.}}$) к общему количеству клеток ($N_{\text{общ.}}$):

*N*ж. =
$$\frac{(Nобщ. -Nм.)}{Nобщ.} \times 100\%$$

2.7 Иммуноцитохимический анализ

Для проверки клеточного состава первичных нейрон-глиальных культур было проведено иммуноцитохимическое окрашивание на 21 день развития культуры. В течение 15 минут клеточные культуры подвергались фиксации 4% забуференным параформальдегидом (ПФА) (арт. UN2213, RanReac AppliChem, Испания), затем в течение часа их инкубировали в трисглициновом буфере,

состоящим из 0,1 М глицина (арт. Ф1326, ПанЭко, Россия), 1 М триса (Ат-0497-0.5, Helicon, США) для выведения из клеточных культур остатков ПФА. После, еще час, инкубировали в блокирующем буфере, состоящим из 5 % козьей сыворотки (арт. 16210064, Thermo Fisher Scientific, США), 0,5 % тритона X-100 (Am-0694-0.1, Helicon, США), 0,1 % твина 20 (Р9416, Sigma-Aldrich, Германия) в растворе PBS для эффективной пермеабилизации клеток.

Затем культуры инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов с первичными антителами. Астроциты маркировались поликлональными мышиными анти-GFAP (глиальный фибриллярный кислотный белок, арт. ab279289, Abcam, Великобритания, разведение 1:500) антителами, а нейроны – поликлональными кроличьими анти-МАР2 (арт. ab32454, Abcam, Великобритания, разведение 1:500).

Далее клеточные культуры промывались блокирующим буфером, а затем подвергались в течение часа инкубации в темноте в смеси вторичных антител: козьи анти-мышиные Alexa Fluor 647 (арт. 2119153, Thermo Fisher Scientific, США, разведение 1:800) и куриные анти-кроличьи антитела Alexa Fluor 488 (арт. 2087707, Thermo Fisher Scientific, США, разведение 1:800).

После окрашивания клеточные культуры помещались в монтирующую среду с 4',6-диамидин-2-фенилиндолом (DAPI) (арт. 2260869, Thermo Fisher Scientific, США) для окраски всех ядер и защиты от выцветания во время визуализации. Окрашенные культуры клеток наблюдали с применением конфокального лазерного сканирующего микроскопа – Zeiss LSM 800 (Carl Zeiss, Германия) с использованием объектива Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 (Carl Zeiss, Германия).

Для подсчета соотношения нейронов и астроцитов было проанализировано по 10 полей зрения с каждой клеточной культуры. Процентное содержание нейронов и астроцитов ($N_{\rm H.}$ % и $N_{\rm a.}$ %) рассчитывалось как отношение нейронов ($N_{\rm H.}-N_{\rm oбщ.}$) / астроцитов ($N_{\rm a.}-N_{\rm oбщ.}$) к общему количеству клеток ($N_{\rm oбщ.}$):

$$N_{\text{H.}}\% = rac{(N_{\text{H.}} - Noбщ.)}{Noбщ.} \times 100\% \times (-1);$$
 $N_{\text{a.}}\% = rac{(N_{\text{a.}} - Noбщ.)}{Noбщ.} \times 100\% \times (-1).$

2.8 Кальциевый имиджинг

Визуализация функциональной динамики ионов Ca^{2+} в нейрон-глиальных культурах осуществлялась с применением флуоресцентного кальцийчувствительного красителя Oregon Green 488 ВАРТА-1 АМ (OGB-1, арт. O6807, Invitrogen, США). 0,4 мкМ OGB-1 растворяли в ДМСО (арт. 67-68-5, Merck KGaA, Германия) с использованием плюроновой кислоты F-127 (арт. P6867, Thermo Fisher Scientific, США) для повышения проницаемости мембраны и добавляли в исследуемые культуры за 30 минут до регистрации кальциевого сигнала. Кальциевую активность регистрировали на Zeiss LSM 800 с объективом Plan-Apochromat 20x/0.8 M27.

Длина волны возбуждения флуоресценции OGB1 была установлена на 488 нм, эмиссия регистрировалась с использованием фильтра 500-530 нм. Для оценки динамики изменения концентрации внутриклеточного кальция регистрировался временной ряд конфокальных изображений. Используемая скорость регистрации составляла два кадра в секунду. Спонтанная кальциевая активность первичных культур гиппокампа регистрировалась на 7 сутки после моделирования ГД и гипоксии.

Были проанализированы следующие основные параметры: длительность кальциевых событий (период времени от начала до конца колебания, с); частота кальциевых колебаний (среднее количество колебаний в минуту, осц/мин) и процент активных клеток (количество клеток с зарегистрированными колебаниями, деленное на общее количество клеток, %) (Vedunova et al., 2015).

2.9 Анализ сетевых характеристик кальциевой активности первичных культур гиппокампа мыши

Для изучения особенностей перестройки кальциевой динамики нейронглиальных сетей, связанной с блокадой киназ и моделированием факторов ишемии, был использован оригинальный алгоритм анализа сетевых характеристик кальциевой активности в программе AstroLab, разработанный 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).

Алгоритм рассматривает всю плоскость изображения как единое целое и идентифицирует события, как пространственно-временные связные области с значимой активностью. 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 (Kustikova et al., 2018; Mitroshina et al., 2020; Savyuk et al., 2020).

Простая динамическая нейронно-астроцитарная сеть представляется в виде неориентированного графа G = (V, E), множество вершин V которого соответствует множеству клеток, множество ребер E – наличию корреляций между клетками:

$$V = \overline{1, n}, \qquad E = \{(i, j) : i, j \in V, \qquad \rho_{ij} > \rho_{thr}\},\$$

где ρ_{ij} – коэффициент корреляции Пирсона между парами клеток $i, j \in V$:

$$\rho_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^{n} \breve{x}_{k}^{i} \cdot \breve{x}_{k}^{j}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n} (\breve{x}_{k}^{i})^{2} \cdot \sum_{i=1}^{n} (\breve{x}_{k}^{j})^{2}}},$$
$$\breve{x}_{k}^{i} = x_{k}^{i} - \langle x_{s}^{i} \rangle_{k-w,k}$$

 x_k^i – характеристика і-ой клетки в момент времени k,

 \breve{x}_{k}^{i} – характеристика за вычетом скользящего среднего с окном W.

Отдельная клетка характеризуется динамическими изменениями концентрации внутриклеточного кальция C_k^i , а также динамикой размера события в клетке A_k^i – количество активных пикселей. На основе этих двух характеристик вычисляется коэффициент корреляции. Для каждой пары клеток вычисляется корреляционная функция между двумя характеристиками клеток, из которых вычитается скользящее среднее.

Визуальное представление результатов метода построения функциональной сети выполнено с применением трех видов графиков (Рисунок 16). уровень интенсивности кальция в клетке от времени, граф попарных взаимодействий, связь расстояния между клетками с уровнем корреляции.



Рисунок 16. Пример визуализации результатов обработки кальциевой активности нейрон-астроцитарной сети: А – интенсивность кальциевой активности для трех выбранных клеток (зеленый – 1 клетка, синий – 2 клетка, красный – 3 клетка) из разбиения плоскости на отдельные области, которое представлено справа; Б – разбиение плоскости на отдельные области, соответствующие клеткам (цвет клеток выбран для контрастности), белые отрезки между клетками указывают наличие корреляции во времени между их интенсивностями; В – зависимость расстояния между клетками и уровнем корреляции интенсивностей кальция во времени для всех пар клеток, оранжевые точки соответствуют соседним парам клеток, синие

точки – отдаленным парам клеток

Первый график (Рисунок 16 А) демонстрирует паттерны кальциевой активности индивидуальной клетки, возникающие во времени. Второй график (Рисунок 16 Б) демонстрирует функциональные взаимосвязи между клетками, определяемые как наличие уровня корреляции выше 0.3 между обработанными интенсивностями кальция для пары клеток, соединенных ребром на рисунке. На третьем графике (Рисунок 16 В) для каждой пары клеток отмечена точка, характеризующая связь между уровнем корреляции обработанных интенсивностей кальциевой активности для этой пары клеток и расстоянием между ними. Корреляция между интенсивностями кальциевой активности клеток вычислялась с задержкой сигналов друг относительно друга от 0 до 5 секунд. В качестве результирующего уровня корреляции между сигналами выбиралось максимальное значение корреляции, достигнутое при некоторой задержке.

В результате данного метода было рассмотрено несколько характеристик: средний уровень корреляции сети, средний уровень корреляции соседних клеток, среднее количество связей одной клетки и количество функциональных связей между парами клеток.

2.10 Анализ спонтанной биоэлектрической активности первичных нейрональных культур

Для исследования особенностей спонтанной биоэлектрической активности нейронных сетей на фоне применения ингибиторов киназ применялась методика неинвазивной долговременной регистрации внеклеточных потенциалов с использованием мультиэлектродной системы USB-MEA120-2-InVBC-System-E-Standard (Multichannel Systems, Германия). При распространении сигнала по нейронной сети мультиэлектродные системы позволяют преобразовать ионные потоки в потоки, переносимые электронами (электрический ток), тем самым с максимальной точностью регистрировать даже единичные электрические события – внеклеточные потенциалы действия (спайки). Для получения данных

использовался набор программного обеспечения MC RackTM (Multichannel Systems, Германия).

Культивирование первичных нейрональных культур осуществлялось на мультиэлектродных матрицах MEA60 (Multichannel systems, Германия) согласно ранее разработанному протоколу (Mishchenko et al., 2019) (Рисунок 17). Моделирование гипоксии проводили на 14 день культивирования согласно вышеописанной методике. Спонтанную биоэлектрическую активность оценивали до моделирования гипоксии, во время и после обратной замены среды с низким содержанием кислорода на нормоксическую культуральную среду в течение 7 последующих дней. Зарегистрированные электрофизиологические данные с мультиэлектродных матриц подвергались обработке с применением алгоритмов MEAMAN в программе MATLAB (v. 7.11) (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2012611190).



Рисунок 17. Культивирование первичных культур нервных клеток головного мозга мыши на мультиэлектродной матрице MEA60

Оценивалось количество малых сетевых пачек, которые распознавались возникновением спайков с максимальным интервалом в 100 мс на четырех или более различных электродах. В каждой сетевой пачке регистрировалось количество спайков. Также были исследованы особенности реорганизации функциональной структуры нейросетевого ответа посредством построения паттернов активации, определяемых по времени возникновения последовательности спайков внутри сетевой пачки импульсов (Pimashkin et al., 2011).

2.11 Фармакологическое ингибирование внутриклеточных киназ in vivo

В экспериментах in применялись коммерческие блокаторы, vivo аналогичные используемым в экспериментах *in vitro*: Necrostatin-1 (блокатор RIPK1, арт. 4311-88-0, Sigma-Aldrich, Германия), Dasatinib (блокатор киназы SRC, арт. 302962-49-8, Sigma-Aldrich, Германия) и САЅ 873225-46-8 (блокатор IKKb киназы, арт. 873225-46-8, Sigma-Aldrich, Германия). Введение данных блокаторов выполнялось мышам линии C57BL/6 интравентрикулярно в дозах 10 мкг/кг (Necrostatin-1), 2 мг/кг (Dasatinib) и 1 мг/кг (CAS 873225-46-8) (Ho et al., 2015; Deng et al., 2019). Экспериментальные животные анестезировались при помощи изофлурана. Операционное поле выбривалось и дезинфицировалось. В коже головы скальпелем выполнялся срединный сагиттальный разрез. Далее при помощи хирургической дрели просверливалось два трепанационных отверстия в костях черепа. Инъекцию выполняли стереотаксически в каждое полушарие мозга, согласно координатам, соответствующим локализации левого и правого желудочков (AP – 0,5 мм, ML – 1,4/-1,4 мм, DV – 3,5 мм) по атласу головного мозга мыши Паксиноса и Франклина (Paxinos and Franklin, 2001). Для инъекции использовали шприц Hamilton на 5 мкл со скошенной иглой размера 6S (арт. НА-84850, Hamilton Bonaduz AG, Швейцария). Скорость введения препарата составляла 0,2 мкл/мин, объем – 1,5 мкл. Мыши возвращались в свои клетки после полного восстановления двигательной активности.

Через сутки после моделирования ОГБГ и ишемии проводилось тестирование выживших животных в тесте «Открытое поле», затем этих же животных тестировали в «Водном лабиринте Морриса» (Рисунок 18). Количество экспериментальных животных распределялось следующим образом: «Интактные» – n=10, «Контроль ОГБГ» – n=6, «ОГБГ + ингибитор IKKb» – n=6, «ОГБГ + ингибитор SRC» – n=6, «ОГБГ + ингибитор RIPK1» – n=12, «Контроль ишемия» – n=8, «Ишемия + ингибитор IKKb» – n=8, «Ишемия + ингибитор SRC» – n=8, «Ишемия + ингибитор SRC» – n=8,



Рисунок 18. Схема эксперимента in vivo

2.12 Моделирование острой гипобарической гипоксии in vivo

Для моделирования острой гипобарической гипоксии (ОГБГ) мышей помещали в герметичную барокамеру, после чего в ней создавали пониженное давление (220-240 мм рт. ст.), равное высоте 10 000 м над уровнем моря. Скорость подъема на «высоту» составляла 183 м/с, время подъема длилось 1 минуту. Моделирование гипоксии для каждого животного осуществлялось до второго агонального вздоха и не более 10 минут. Время с момента подъёма на необходимую высоту до агонального вздоха, остановки дыхания животного, или по прошествии 10 минут нахождения на «высоте», оценивалось как время жизни.

Оценивались следующие параметры: время потери позы животным, время жизни на высоте, время восстановления позы, а также выживаемость и степень устойчивости животных к гипоксическому повреждению. Если время жизни животных составляло менее 3 минут, то их относили к группе низкоустойчивых; если от 3 до 7 минут – к среднеустойчивым, и более 7 минут – к высокоустойчивым.

Экспериментальные животные были случайным образом разделены на следующие группы: «Контроль» – n=18, «ОГБГ + ингибитор IKKb» – n=36, «ОГБГ + ингибитор SRC» – n=18, «ОГБГ + ингибитор RIPK1» – n=22.

2.13 Моделирование ишемического повреждения головного мозга in vivo

моделирования Для ишемического повреждения головного мозга выполнялась односторонняя окклюзия левой сонной артерии. Животные наркотизировались при помощи ингаляционного наркоза изофлураном (арт. 47642, Karizoo, Испания), затем в бласти шеи делался надрез мягких тканей. В операционном поле обнаруживалась левая общая сонная артерия, которая затем перевязывалсь нерассасывающейся лигатурной нитью (МедМарт, Россия). После зашивания раны ее обрабатывали порошком Стрептоцида (арт. 2000042662, Мелиген, Россия), который обладает бактериостатическим действием. После проведения всех операционных действий, занимавших 10-15 минут, каждое животное помещалось в отдельную клетку со свободным доступом к пище и воде (Митрошина и др., 2017).

Экспериментальные животные были случайным образом разделены на следующие группы: «Контроль» – n=10, «Ишемия + ингибитор IKKb» – n=12, «Ишемия + ингибитор SRC» – n=10, «Ишемия + ингибитор RIPK1» – n=10.

2.14 Тест «Открытое поле»

Исследование локомоторной активности, ориентировочноисследовательского поведения и тревожности животных проводилось 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 (45х45 см) и системой инфракрасных лучей. IR Actimeter позволяет регистрировать число и продолжительность эпизодов вставания на задние лапы животного и его двигательную активность в условиях дневного и ночного освещения. 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.

2.15 Тест «Водный лабиринт Морриса»

Тест «Водный лабиринт Морриса» проводили в круглом бассейне (d=90 см), наполненным 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. Опуская животное в бассейн с разных сторон, их обучали находить платформу по внешнему визуальному ориентиру. Если животное до конца времени не находило платформу, то его помещали на платформу принудительно.

Через 48 часов после обучения оценивали реконсолидацию долговременной памяти животного. Для этого платформу извлекали из бассейна, и в течение 1 минуты оценивали время пребывания животного в зоне, где раньше находилась платформа.

2.16 Статистический анализ

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 процентилем 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 проверку на нормальность данные не прошли распределения, то для статистической оценки независимых выборок использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Для статистической оценки связных выборок применялся непараметрический Т-критерий Уилкоксона. Для нивелирования множественных сравненений использовался метод Бенджаминиэффекта Иекутели. Различия между группами считались статистически значимыми при p<0.05.

3. Результаты и их обсуждение

3.1 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 (Рисунок 19). Исследуемые киназы формируют различные внутриклеточные сигнальные пути: сигнальные пути МАРК, сигнальный путь PI3K / AKT / mTOR, сигнальный путь JAK / STAT и сигнальный путь NF-kB. Также были исследованы рецепторные киназы и киназы, не входящие в основные регуляторные пути.



Рисунок 19. Жизнеспособность клеток первичной культуры при блокаде различных участников кинома в физиологических условиях и при моделировании ГД

Результаты исследования влияния блокады нейрональных киназ на устойчивость нервных клеток к ГД представлены в Таблице 1. Показано, что в физиологических условиях доля живых клеток в культуре составляет – 96,05 ± 2,29 %. Мозг является самым энергозатратным органом и испытывает большую

потребность в глюкозе. Недостаток глюкозы, поступающей с током крови, способен инициировать разобщение окислительного фосфорилирования, что, в свою очередь, приводит к повреждению головного мозга и гибели клеток (Joerger-Messerli et al., 2018). В эксперименте *in vitro* ГД приводила к достоверному снижению числа жизнеспособных клеток (73,96 ± 2,9 %) по сравнению с интактной группой.

Таблица 1.

Жизнеспособность клеток первичных культур при блокаде различных участников

Группа, ингибитор	Ингибируемые киназы	Жизнеспособные клетки, нормальные условия, M ± SEM %	Жизнеспособные клетки, ГД, M ± SEM %			
Контроль		$96,05 \pm 2,29$	73,96 ± 2,9*			
	Рецепторные киназы					
ST638, ST-6385	Tyrosine kinase inhibitor	$94,57 \pm 1,03$	80,02 ± 1,45*			
RET Inhibitor Example 8 (Free base)	RET	$99,67 \pm 0,56$	74,43 ± 3,62*			
K-252a, K-2151	TRKA (TRK)	85,19 ± 4,67*	$42,96 \pm 0,73*\#$			
OSI-906, Linsitinib	IGF1R (JTK13, IGFIR)	98,49 ± 1,22	71,65 ± 1,05*			
Crenolanib, ARO-002, CP-868596	PDGFRa (PDGFR2), PDGFRb (PDGFR, PDGFR1)	91,73 ± 1,18	77,52 ± 1,6*			
SAR-131675	FLT4 (VEGFR3)	84,28 ± 1,5*	86,31 ± 0,76*#			
MAZ51, MAZ-51	FLT4 (VEGFR3)	54,07 ± 3,41*	63,7 ± 3,27*#			
BGJ-398, NVP-BGJ- 398, NVP-BGJ398	FGFR1 (FLT2), FGFR2, FGFR3, FGFR4	$94,34 \pm 0,63$	79,62 ± 2,87*			
Neratinib, HKI-272, CPD-820	EGFR (ERBB1, HER1), ErbB2 (TRK1, HER2, NEU)	97,66 ± 1,13	75,5±0,99*			
Mubritinib, TAK-165, D04025	ERBB2 (TKR1, HER2, NEU)	99,67 ± 0,28	84,93 ± 2,15*#			
Masitinib, AB-1010, AB1010, Masiviera	KIT (c-KIT), PDGFRb (PDGFR, PDGFR1), FGFR3	92,19 ± 0,29	77,22 ± 1,25*			
Masitinib mesylate, AB1010, AB-1010	KIT (c-KIT), PDGFRb (PDGFR, PDGFR1), FGFR3	99,34 ± 0,3	94,81 ± 0,79#			
CH5424802, AF-802, CH-5424802	ALK	98,13 ± 1,41	75,6±1,14*			

кинома

Группа, ингибитор	Ингибируемые киназы	Жизнеспособные клетки, нормальные	Жизнеспособные клетки, ГД, M ± SEM %	
		условия, М ± SEM %		
LDN193189, LDN-	ALK2, BMPR1A	94,41 ± 0,57	73,42 ± 3,46*	
193189, DM-3189	(ALK 3)			
SJN 2511	TGFbR1 (ALKS)	$99,99 \pm 0,34$	70,24 ± 3,52*	
LY-2157299	TGFbR1 (ALK5), TGFbR2	$98,26 \pm 0,38$	65,16 ± 4,99*	
UNC-569A, UNC-569, Mer inhibitor	MER (MERTK, c- mer)	92,76 ± 2,22	75,54 ± 1,32*	
JNJ-28312141	FMS (c-FMS, CSF- 1R, CSF1R)	85,96 ± 3,53*	85,11 ± 1,69*#	
	Цитоплазмати	ческие киназы		
	Киназы, входящие в си	гнальные пути МАРК		
ТАК-632	BRAF (B-raf), RAF1 (c-Raf)	88,37 ± 1,65	68,48 ± 3,14*	
Encorafenib, LGX-818, NVP-LGX-818	BRAF (B-raf)	99,73 ± 1,37	96,98 ± 1,86#	
Binimetinib, ARRY- 162, ARRY-438162, MEK-162	MAP2K1 (MEK1), MAP2K2 (MEK2)	91,7 ± 0,97	78,77 ± 1,09*	
RG-7842, GDC-0994	ERK1, ERK2 (ERK)	$96,66 \pm 1,2$	$74,52 \pm 1,26*$	
Compound 10	ERK2 (ERK, p38)	83,56 ± 2,03*	$74,91 \pm 1,44*$	
Compound 70	ERK2 (ERK, p38)	85,37 ± 1,44*	75,53 ± 1,58*	
XRP44X, XRP-44X, WCH-44	Ras-NET (Elk3), Tubulin polimerization	$97,83 \pm 0,88$	$75,69 \pm 2,78*$	
S-99	MAP3K5 (ASK1)	94,33 ± 5,29	39,39 ± 3,64*#	
AMG 548, AMG-548	p38 MAPK, TNF- alpha Production Inhibitor	81,64 ± 2,87*	81,89 ± 1,54*	
LY2228820, LY- 2228820	p38a, p38b	96,71 ± 0,65	79,24 ± 2,89*	
Losmapimod, 856553, GSK-AHAB, GW- 856553, GW-856553X, SB-856553	p38a	92,8 ± 3,46	71,12 ± 3,42*	
SR-3576, SR 3576	JNK3	88,96 ± 1,59	$76,87 \pm 0,79*$	
XMD8-92, XMD-8-92	ERK5 (BMK1, PRKM7)	98,56 ± 1,14	72,12 ± 0,97*	
PF 3644022, PF- 3644022, MK2 inhibitor, compound 35	MAPKÁPK2 (MK2)	94,13 ± 1,17	75,83 ± 3,21*	
GLPG-0259, Compound A	MAPKAPK5 (PRAK)	$98,65 \pm 0,68$	69,09 ± 3,64*	
Сигнальный путь РІЗК / АКТ				
GDC-0941 bismesylate, RG-7321, Pictilisib	РІЗК	45,7 ± 7,08*	47,65 ± 7,41*#	
CZC 24832, CZC- 24832	Phosphatidylinositol 3- Kinase gamma Inhibitor	92,21 ± 1,67	76,27 ± 1,92*	

Группа, ингибитор	Ингибируемые киназы	Жизнеспособные	Жизнеспособные		
		условия,	клетки, ГД, М – SEM 9/		
		M±SEM %	$\mathbf{NI} \pm \mathbf{SENI}$ %		
GSK 2334470, GSK- 2334470	PDK1 (PDPK1)	$98,\!49 \pm 0,\!78$	69,14 ± 4,66*		
GDC-0068, RG-7440,	AKT1 (PKBa), AKT2	89,33 ± 1,28	74,06 ± 1,96*		
Ipatasertib	(PKBb), AKT3 (PKBg)				
Pp242, Torkinib	FRAP (MTOR, FRAP1)	$91,\!99 \pm 0,\!77$	$74,12 \pm 0,75*$		
AZD-2014	mTOR Complex 1 (mTORC1) Inhibitor, mTOR Complex 2 (mTORC2) Inhibitor	93,49 ± 3,37	76,06 ± 1,01*		
S6K-18	p70S6K (S6K, S6K1)	87,97 ± 0,76*	69,71 ± 2,89*#		
PF 4708671, PF- 4708671	p70S6K (S6K, S6K1)	$96,81 \pm 0,74$	75,26 ± 1,03*		
BIX-RSK2 Inhibitor	RSK1 (RSK, S6Ka, MAPKAPK1C), RSK2 (S6K-a3, p90-RSK2)	$97,86 \pm 0,68$	76,59 ± 2,02*		
	Сигнальный пу	ть JAK / STAT			
Filgotinib, G-146034, GLPG-0634	JAK1, JAK2	$98,13 \pm 1,3$	75,48 ± 1,71*		
NVP-BSK805	JAK2	$97,71 \pm 0,65$	$76,85 \pm 1,86*$		
LY2784544, LY- 2784544	JAK2	95,1 ± 0,61	91,14 ± 0,85#		
Pacritinib, ONX-0803, SB-1518	JAK2, CDK2/Cyclin A, CDK2/Cyclin E, FLT3 (STK1, FLK2)	87,41 ± 3,63*	83,64 ± 1,3*#		
	Сигнальные пути, ак	тивирующие NF-kB			
NIK Kinase Inhibitor	NIK	$93,44 \pm 1,16$	73,57 ± 2,53*		
ACHP	IKKb (IKK2)	89,4 ± 1,49*	$90,94 \pm 1,2 \#$		
PS1145	IKKb (IKK2)	$94,72 \pm 1,29$	80,99 ± 1,39*#		
Compound4	SRC (c-SRC)	85 94 ± 0 69*	89 25 ± 1 79#		
Bafetinib. CNS-9.	BCR. LYN. ABL1	$82.09 \pm 1.5^*$	$78.51 \pm 2.34*\#$		
INNO-406, NS-187	(ABL), FYN (p59fyn)	-))-			
PND-1186, VS-4718	FAK (FAK1)	$90,05 \pm 2,13$	$78,56 \pm 0,53*$		
Compound 34	eEF2K	$92,19 \pm 1,12$	79,18 ± 1,16*#		
Necrostatin-1	RIPK1 (RIP)	$90,98 \pm 1,87$	83,57 ± 1,49*#		
A 769662, A-769662	AMPK	$93,65 \pm 0,58$	$75,18 \pm 4,07*$		
OICR0000666A01	PIM1	$97,88 \pm 2,24$	75,79 ± 1,67*		
A 1070722, A-1070722	GSK3	$99,76 \pm 0,69$	80,57 ± 1,96*		
CHIR-98014 isomer, CT-98014	GSK3	88,62 ± 4,69	64,11 ± 22,29*		
2-Thio(3-iodobenzyl)- 5-(1-pyridyl)-[1,3,4]- oxadiazole	GSK3B	64,75 ± 6,47*	58,31 ± 5,92*#		

Группа, ингибитор	Ингибируемые киназы	Жизнеспособные клетки, нормальные условия, M ± SEM %	Жизнеспособные клетки, ГД, M ± SEM %
TTP 22	CK2a1 (CK2, CKII, Casein kinase 2)	96,4 ± 1,07	84,37 ± 1,72*#
Quinalizarin	CK2a1 (CK2, CKII, Casein kinase2)	$99,05 \pm 1,14$	72,50 ± 1,38*
Y-39983, RKI-983, SNI-1656	ROCK1, ROCK2	96,81 ± 0,59	$74,86 \pm 3,75*$
TC-DAPK 6	DAPK1, DAPK3 (ZIPK, ZIP)	95,11 ± 0,71	78,39 ± 1,08*
HG-10-102-01	LRRK2	84,76 ± 0,54*	81,54 ± 2,49*
W-7 hydrochloride	smMLCK (MLCK, myosin light chain kinase, MYLK)	$93,74 \pm 0,5$	68,91 ± 2,29*
PKC theta inhibitor	PKCt	92,96 ± 1,28	81,55 ± 1,18*#
KU-60019	ATM	$99,7 \pm 0,93$	$74,11 \pm 0,84*$
VE-821	ATR	$95,56 \pm 1,38$	$70,01 \pm 2,67*$
CHIR-124	CHK1	$97,46 \pm 0,71$	$75,09 \pm 0,94*$
Chk2 Inhibitor II, 339253	CHK2	$91,88 \pm 2,96$	81,22 ± 1,38*
OICR0000857A	Histone Deacetylase SIRT1 inhibitor	$95,\!49 \pm 0,\!65$	73,48 ± 1,7*
LY2835219, LY- 2835219	CDK4/Cyclin D1, CDK6/Cyclin D3, PIM1	$90,85 \pm 3,7$	86,09 ± 1,16*#
AB12134C3, PNK inhibitor	PNK (PNKP)	95,12 ± 1,31	79,66 ± 1,22*
Dianilinopyrimidine_01	Pan kinase	$95,95 \pm 1,37$	$74,86 \pm 0,95*$
PERK inhibitor	PEK (PERK)	81,49 ± 2,75*	$90,39 \pm 2,15 \#$
ILK inhibitor	ILK	$98,3 \pm 1,42$	86,08 ± 0,98*#
ASC-033, APY 33	IRE1 (IRE1a, ERN1)	$99,19 \pm 0,99$	86,04 ± 1,55*#
IRAK-1/4 Inhibitor I	IRAK1 (IRAK)	$98,79 \pm 1,16$	78,59 ± 1,33*
IRAK4 Inhibitor	IRAK4	$97,\!98 \pm 0,\!78$	89,71 ± 0,89*#
TBK1 Inhibitor	TBK1	$98,51 \pm 0,91$	$72,62 \pm 1,12*$
Dioctanoylglycol	DAGK (DGK, Diacylglycerol kinase)	97,25 ± 1,15	65,19 ± 4,46*#
GSK-650394	SGK1 (SGK), SGK2	$99,33 \pm 0,3$	$70,69 \pm 3,42*$
PF-3758309, PF- 03758309	PAK4	72,99 ± 4,44*	65,08 ± 1,34*#
TG003, TG-003	CLK1, CLK4	$92,02 \pm 1,64$	71,67 ± 3,4*
Compound 71	DYRK1A (DYRK)	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 эфффект при моделировании ГД. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой клеток; # – статистически значимая разница по сравнению с группой «ГД», р<0,05, (U-критерий Манна-Уитни)

Выполненный анализ жизнеспособности нервных клеток *in vitro* на фоне применения ингибиторов киназ позволил разделить исследуемые киназы на несколько групп, различающихся по своему функциональному воздействию на устойчивость нервных клеток к ГД. Нами выделено 5 функциональных групп киназ:

1) Киназы, блокада которых достоверно снижает жизнеспособность первичных культур нервных клеток в физиологических условиях. К таким киназам относятся: LRRK2 (84,76 \pm 0,54 %, p<0,001), ERK2 (83,56 \pm 2,03 %, p<0,001), p38 MAPK, TNF-alpha Production Inhibitor (81,64 \pm 2,87 %, p<0,001). При этом при дефиците энергетических субстратов блокада данных киназ не оказывала влияния на жизнеспособность клеток. Вероятно, данные киназы задействованы в метаболических процессах, необходимых для жизнедеятельности клетки, но не входят в адаптационные пути.

2) Блокада киназ второй группы оказывает негативный эффект как в физиологических условиях (p70S6K (87,96 ± 0,76 %, p<0,01), DYRK1A (58,23 ± 2,4 %, p<0,0001), GSK3B (64,75 ± 6,47 %, p<0,0001), PI3K (45,7 ± 7,08 %, p<0,0001), TRKA (85,19 ± 4,67 %, p<0,01), PAK4 (72,99 ± 4,44 %, p<0,001), FLT4 (54,07 ± 3,41 %, p<0,0001)), так и при энергетическом голодании: p70S6K (69,7 ± 2,89 %, p<0,05), DYRK1A (46,99 ± 2,62 %, p<0,0001), GSK3B (58,31 ± 5,92 %, p<0,0001), PI3K (47,65 ± 7,41 %,p <0,0001), TRKA (42,96 ± 0,73 %, p<0,0001), PAK4 (65,08 ± 1,34 %, p<0,01), FLT4 (63,7 ± 3,27 %, p<0,001).

3) Киназы, ингибирование которых вызывает умеренное снижение числа живых клеток в клеточных культурах в условиях нормы: FMS ($85,96 \pm 3,53 \%$, p<0,01), SRC ($85,94 \pm 0,69 \%$, p<0,05), BCR, LYN, ABL1, FYN ($82,09 \pm 1,5 \%$, p<0,001), PEK ($81,49 \pm 2,75 \%$, p<0,001), FLT4 ($84,28 \pm 1,5 \%$, p<0,01), JAK2, CDK2/Cyclin A, CDK2/Cyclin E, FLT3 ($87,41 \pm 3,63 \%$, p<0,05), и оказывающих нейропротекторный эффект при моделировании ГД: FMS ($85,11 \pm 1,69 \%$, p<0,001), SRC ($89,25 \pm 1,79 \%$, p<0,0001), каскад BCR, LYN, ABL1, FYN ($78,51 \pm 2,34 \%$, p<0,05), PEK ($90,39 \pm 2,15 \%$, p<0,0001), FLT4 ($86,31 \pm 0,76\%$, p<0,001),

киназы сигнального пути JAK / STAT: JAK2, CDK2/Cyclin A, CDK2/Cyclin E, FLT3 ($83,64 \pm 1,3 \%$, p<0,001).

4) Киназы, блокада которых не влияет на жизнеспособность клеток первичных культур коры больших полушарий головного мозга мыши при нормальных условиях. Однако, при этом их блокада оказывает выраженный негативный эффект при энергетическом голодании: MAP3K5 (39,39 \pm 3,64 %, p<0,0001) и DAGK (65,19 \pm 4,46 %, p<0,001).

5) К пятой группе относятся киназы, ингибирование, которых в условиях ГД поддерживает жизнеспособность нервных клеток, при этом в нормальных физиологических условиях их ингибирование не влияет на жизнеспособность: CK2a1 ($80,37 \pm 1,72$ %, p<0,01), BRAF ($96,98 \pm 1,86$ %, p<0,001), PKCt ($81,55 \pm 1,18$ %, p<0,01), ILK ($86,07 \pm 0,98$ %, p<0,001), IRE1 ($86,04 \pm 1,55$ %, p<0,001), IKKb ($80,99 \pm 1,39$ %, p<0,001), KIT, PDGFRb, FGFR3 ($94,81 \pm 0,79$ %, p<0,0001), JAK2 ($91,14 \pm 0,85$ %, p<0,0001), IRAK4 ($89,71 \pm 0,89$ %, p<0,0001), CDK4/Cyclin D1, CDK6/Cyclin D3, PIM1 ($86,09 \pm 1,16$ %, p<0,001), ERBB2 ($84,93 \pm 2,15$ %, p<0,001), RIPK1 ($83,57 \pm 1,49$ %, p<0,001).

Для дальнейшего исследования были отобраны наиболее перспективные представители киназ из 3 и 5 группы, блокада которых оказывала защитное действие при ГД. Данные ингибиторы были исследованы при моделировании другого ключевого ишемического стресс-фактора – гипоксического повреждения.

Исходя из обзора литературы ингибирование киназы SRC может ослаблять, вызванную гипоксией, повышенную активацию CaM-киназы IV, что, в свою очередь, снижает апоптотическую гибель клеток (Kratimenos et al., 2018). SRC совместно с киназой CK2a1 участвует в опосредованной рецепторами митофагии (удалении нежелательных или поврежденных митохондрий в ответ на потребность в энергии) (Liu et al., 2014). При ишемии через киназы IKKb и ILK может активироваться фактор транскрипции NF-kB, который ведет к клеточной гибели (Yue et al., 2020; Fafián-Labora et al., 2021). А киназа RIPK1 может активировать RIPK3 и MLKL, запуская некроптоз, что может усугубить повреждение нейронов (Deng et al., 2019). Следовательно, ингибирование активности данных киназ при ишемическом повреждении потенциально может уменьшить потерю нейрональных клеток (Schwaninger et al., 2006; Yue et al., 2020).

Через рецепторную киназу FLT4 опосредует свое действие VEGF, который способствует регуляции нормальных и патологических ангиогенных процессов, оказывает митогенное и антиапоптотическое действие на эндотелиальные клетки, увеличивает проницаемость сосудов, способствует миграции клеток (Melincovici et al., 2018). Данных про действие FLT4 в нервных клетках очень мало, но есть что данная киназа может обладает нейротрофической и предположения, нейропротекторной активностью как в периферической, так и в центральной нервной системе, оказывая прямое действие на нейроны, шванновские клетки, астроциты, нервные стволовые клетки и микроглию (Namiecińska et al., 2005). Пути JAK / STAT регулируют важные физиологические процессы, их дисфункциональная сигнализация приводит к патологическим состояниям (Poulsen et al., 2012). Однако, по нашим данным блокада, как FLT4 киназы, так и части пути JAK / STAT оказывает нейропротекторный эффект. Поэтому мы решили дополнительно исследовать, как ингибирование киназы FLT4 и киназ JAK2, CDK2/Cyclin A, CDK2/Cyclin E, FLT3, входящих в сигнальный путь JAK / STAT, повлияют на жизнеспособность клеток при моделировании гипоксии. По аналогичному принципу была выбрана киназа eEF2K, которая при гипоксии замедляет синтез белка, и должна, напротив помогать клеткам экономить энергию и способствовать выживаемости (Karakas et al., 2020).

Нами была составлена схема сигнальных каскадов, в которую входят исследуемые киназы, блокада которых потенциально может оказать нейропторекторный эффект при моделировании факторов ишемии (Рисунок 20).



Рисуок 20. Примеры сигнальных каскадов, в которые входят киназы, блокада которых потенциально может оказать нейропторекторный эффект при моделировании факторов ишемии

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

Показано, что при моделировании гипоксии (73,59 ± 12,38 %, p<0,05), процент живых клеток в культурах достоверно снижается по сравнению с интактной культурой (95,78 ± 2,1 %) нервных клеток (Рисунок 21 А, Б).



Рисунок 21. 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)

Блокада киназ SRC (87,03 ± 1,02 %, p<0,05), IKKb (90,85 ± 1,09 %, p<0,001), RIPK1 (85,09 ± 2,42 %, p<0,05), eEF2K (84,31 ± 1,54 %, p<0,05) и FLT4 (83,75 ± 1,38 %, p<0,05) оказывало нейропротектроный эффект при действии обоих стрессфакторов, что заслуживает более подробного изучения. Ингибирование киназного каскада JAK2, CDK2/CyclinA, CDK2/CyclinE, FLT3 (74,73 ± 1,72 %, p=0,74) и блокада киназ CK2a1 (76,14 ± 2,93 %, p=0,55) и ILK (81,62 ± 2,28 %, p=0,051) не оказывали нейропротекторного эффекта при моделировании гипоксии (Рисунок 21 Б).

Для дальнейшего исследования были выбраны киназы с наиболее выраженным защитным эффектом (SRC, IKKb, eEF2K, FLT4, RIPK1) при влиянии обоих стресс-факторов. Была проведена оценка клеточного состава первичных культур головного мозга мыши методом иммуноцитохимического окрашивания при блокаде киназ SRC, IKKb, RIPK1, eEF2K и FLT4 и моделировании ГД и гипоксии (Рисунок 22).



Рисунок 22. Морфология нейрон-глиальных культур на 21 день культивирования *in vitro*. Синий – клетки, окрашенные DAPI; зеленый – клетки, окрашенные маркером нейронального белка (MAP2); красный – клетки, окрашенные маркером белка цитоскелета дифференцированных астроцитов (GFAP): А – интактная; Б – гипоксия; В – ГД

Было показано, что нейроны и астроциты присутствуют в первичных клеточных культурах нервных клеток в соотношении 1:2. ГД и гипоксия приводит к преимущественной гибели нейронов, причем гипоксия оказывает наиболее выраженный эффект. Соотношение типов клеток меняется и составляет 1:2,9,

р<0,001 при ГД и 1:3,3, р<0,001 (критерий Уилкоксона) при гипоксии. Также следует отметить фрагментацию нейронов, что свидетельствует о разрушении связей между клетками и потере синапсов (Рисунок 23). Исходя из выжеизложенного можно сделать вывод о том, что нейроны более подвержены фаторам ишемии, чем астроциты.



Рисунок 23. Соотношение нейронов и астроцитов в первичной культуре гиппокапма головного мозга мыши на 21 день культивирования. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой, *** p<0,001 (U-критерий Манна-Уитни); # – статистически значимая разница между нейронами и астроцитами, ### p<0,001 (критерий Уилкоксона)

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

Нервные клетки способны образовывать нейронные сети, обеспечивая межклеточную коммуникацию, обмениваясь друг с другом молекулами и информацией, тем самым проявляя спонтанную электрическую и химическую активность. Ионы кальция (Ca²⁺) являются универсальными внутриклеточными вторичными мессенджерами, которые способны контролировать многочисленные клеточные процессы во время развития и во взрослом возрасте (отрастание аксонов, синаптические связи, созревание сигнальных свойств нейронов,

движение и дифференцировка глии, регуляция нейрогенеза в зубчатой извилине у взрослых) (Malmersjö et al., 2013).

Регистрация и анализ сигналов между нейронами и астроцитами позволяет получить необходимую информацию о функциональных свойствах нейронглиальных сетей (Renteria et al., 2020), следовательно, было изучено изменение функциональной кальциевой динамики сети при блокаде киназ в физиологических условиях и при моделировании факторов ишемии с помощью кальциевого имиджинга (Рисунок 24).



Рисунок 24. Пример кальциевых осцилляций во время записи спонтанной кальциевой активности интактной культуры в программе ZEISS ZEN

Моделирование как гипоксического повреждения, так и ГД вызывает достоверное угнетение кальциевых событий (Рисунок 25 Б, Г).



Рисунок 25. Характерные примеры динамики флуоресценции кальциевого сенсора Oregon Green в первичных культурах нерных клеток при обработке в программе: А – интактная культура; Б – гипоксия; В – гипоксия + ингибитор RIPK1; Г – ГД; Д – ГД + ингибитор RIPK1

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 ± 4,08 % до 34,77 ± 4,08 %, p<0,001 при гипоксии (Рисунок 26 Б, В). Также при моделировании гипоксии наблюдается снижение частоты («Интактная культура» – 1,52 ± 0,22 осц/мин, «Гипоксия» – 0,64 ± 0,08 осц/мин, p<0,001) и увеличение длительности кальциевых осцилляций («Интактная культура» – 9,63 ± 0,75 с, «Гипоксия» – 11,33 ± 0,51 с, p<0,05) (Рисунок 26 В). Повышение длительности осцилляций и снижение частоты связано с тем, что в культурах клеток в постишемическом периоде преобладают астроциты, для которых характерна медленная длительность. При ГД показатели частоты («Интактная культура» – 1,55 ± 0,22 осц/мин, «ГД» – 1,16 ± 0,15 осц/мин, р=0,34) и длительности («Интактная культура» – 11,92 ± 1,28 с, «ГД» – 10,45 ± 0,43 с, р=0,65) достоверно не изменяются (Рисунок 26 Б).

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 26 В). Таким образом, несмотря на сохранение жизнеспособности клеток, блокада eEF2K негативно сказывается на метаболической кальциевой активности.

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 26 Б). Также достоверно увеличивалась частота кальциевых осцилляций при гипоксии (1,17 \pm 0,21 осц/мин, p<0,05) (рисунок 26 В). Ингибирование SRC и FLT4 киназ также не оказывало влияние на число клеток, проявляющих функциональную кальциевую активность.





Рисунок 26. 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)

Следует отметить, что блокада RIPK1 поддерживает функциональную кальциевую активность нервных клеток при моделировании обоих стрессфакторов («Гипоксия + RIPK1» – $60,38 \pm 3,4$ %, p<0,05; «ГД + RIPK1» – $74,81 \pm 5,15$ %, p<0,05) (Рисунок 26 Б, В). Также блокада киназы RIPK1 повышает длительность кальциевых осцилляций при моделировании ГД ($14,38 \pm 0,13$ с, p<0,05) (Рисунок 26 Б).

3.4 Оценка влияния ключевых киназ на параметры нейросетевой кальциевой активности

Нами впервые была исследована коллективная кальциевая динамика, характеризующая функциональные нейрон-глиальные сети, что позволяет оценить степень связности сетевых элементов после воздействия ишемических факторов. Было рассмотрено несколько параметров полученных сетей: средний уровень корреляции сети, средний уровень корреляции соседних клеток, среднее количество связей одной клетки, количество функциональных связей между парами клеток.

На рисунке 27 и 28 проанализирован уровень корреляции активности кальция между парами клеток в культуре. Соседние пары клеток, сомы которых находятся в непосредственном контакте друг с другом, показаны красными точками, а удаленные клетки показаны синим цветом. В физиологических условиях как соседние (0,63 [0,38; 0,82]), так и удаленные (0,46 [0,22; 0,68]) клетки имеют высокий уровень корреляции. Число функциональных связей составляет 372 [93,87; 572], а процент связей от максимума 78,25 [30,01; 96,96] %. Таким образом, в первичных культурах нервных клеток мозга мыши в физиологических условиях формируется развитая динамическая нейронглиальная которая характеризуется коррелированной кальциевой сеть, динамикой.



Рисунок 27. Корреляционная зависимость между спонтанными колебаниями Ca²⁺ и расстоянием между клетками (красные точки – пары соседних клеток, синие точки – пары удаленных клеток): А – интактная культура; Б – ингибитор eEF2K; В – ингибитор SRC; Г – ингибитор IKKb; Д – ингибитор FLT4; Е – ингибитор RIPK1



Рисунок 28. Репрезентативные графы корреляционной сети с порогом > 0,3: А – интактная культура; Б – ингибитор eEF2K; В – ингибитор SRC; Г – ингибитор IKKb; Д – ингибитор FLT4; Е – ингибитор RIPK1

Параметры кальциевой активности нейронной сети при блокаде киназ IKKb и FLT4 сохраняются на уровне интактной культуры. В отличие от блокады киназы eEF2K (корреляция клеток – 0,16 [0,15; 0,19], p<0,01; число связей на клетку – 9,26 [2,07; 22,7], p<0,01; процент связей от максимума – 2,38 [0,4; 5,2] %, p<0,001), где наблюдается острое угнетение нейронной сети (Рисунок 29).

Корреляция удаленных и соседних клеток при ингибировании SRC составила 0,17 [0,16; 0,21], p<0,01 и 0,21 [0,44; 0,6], p<0,05 при RIPK1 0,09 [0,09; 0,12], p<0,01 и 0,15 [0,14; 0,18], p<0,05 (Рисунок 29 А, Б); число функциональных связей при блокаде SRC 5,7 [2,93; 10,67], p<0,01, и PIPK1 0,8 [0,59; 10,79], p<0,05 (Рисунок 29 В), а процент связей от максимума 1,4 [0,49; 2,5] %, p<0,001 и 0,19 [0,13; 2,5] %, p<0,01 соответственно (Рисунок 29 Г). Блокада киназ SRC и RIPK1 сохраняет процент осциллирующих клеток, однако, более подробный анализ

Б. Α. 1.0-1.5 Корреляция соседних клеток Корреляция всех клеток 0.8 1.0 0.6 0.4 0.5 ** 0.2 0.0 0.0 NHTak THas FLIA NHTakTHan WHO . SEF2X FUTA SEF2X WHO PIPK' eger RIPK sqc Ингибитор киназы Ингибитор киназы **B.** 1000 Г. 150 Процент связей от максимума, % Число связей на клетку, шт. 800 100 600 400 50 200 ** ٥ WHTakthan Loff 24 NHTONTHON N 440 FUTA RIPK eff 24 WH2 FLIA RIPK sq. Ингибитор киназы Ингибитор киназы

характеристик выявил, что нейронная сеть при ингибировании этих данных претерпевает изменения.

Рисунок 29. Реорганизация активности нейрон-глиальной сети в первичных клеточных культурах при блокаде киназ в физиологических условиях: А – средний уровень корреляции всех клеток; Б – средний уровень корреляции всех клеток; В – среднее количество функциональных связей на клетку; Г – процент коррелированных связей от общего числа возможных связей. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой клеток, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 (U-критерий Манна-Уитни)

Воздействие ишемических факторов приводит к значительной потере функциональных связей нейронно-глиальных сетей (Рисунок 30). Количество значимых корреляций уменьшается как в соседних, так и в удаленных парах.



Рисунок 30. А-В: Корреляционная зависимость между спонтанными колебаниями Ca2+ 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

Кислородное голодание оказывает более выраженное воздействие на нейронно-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 33 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 36 А, Б). В группе «Гипоксия» также происходит снижение числа реальных функциональных связей от общего числа возможных связей («Интактная» – 78,25 [30,01; 96,96], «Гипоксия» – 24,26 [3,39; 69,73], p<0,01) (Рисунок 36 Г). Это подтверждает снижение количества функциональных связей между нервными клетками в культуре.

Количество функционально значимых клеточных связей также уменьшается при воздействии стресс-факторов: в интактной культуре – 372,08 [93,87; 572]

(Рисунок 29 В), при ГД – 39,38 [2,36; 210,24] (Рисунок 33 В), р<0,01, при гипоксии – 147,47 [8,12; 334,33], р<0,01 (Рисунок 26 В).

При моделировании ГД и блокаде исследуемых киназ только блокада FLT4 позволяет частично поддерживать степень корреляции кальциевой активности клеток (Рисунок 31-33). 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 33 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.



71

Рисунок 31. Корреляционная зависимость между спонтанными колебаниями Ca²⁺ и расстоянием между клетками (красные точки – пары соседних клеток, синие точки – пары удаленных клеток): А – интактная культура; Б – ГД; В – ГД + ингибитор SRC; Г – ГД + ингибитор IKKb; Д – ГД + ингибитор eEF2K; Е – ГД + ингибитор FLT4; Ж – ГД + ингибитор



Рисунок 32. Репрезентативные графы корреляционной сети с порогом > 0,3: А – интактная культура; Б – ГД; В – ГД + ингибитор SRC; Г – ГД + ингибитор IKKb; Д – ГД + ингибитор eEF2K; Е – ГД + ингибитор FLT4; Ж – ГД + ингибитор RIPK1


Рисунок 33. Реорганизация активности нейрон-глиальной сети в первичных клеточных культурах при блокаде киназ и моделировании ГД: А – средний уровень корреляции всех клеток; Б – средний уровень корреляции всех клеток; В – среднее количество функциональных связей на клетку; Г – процент коррелированных связей от общего числа возможных связей. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой клеток; # – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой клеток; # – статистически значимая разница по клетой «ГД», * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 (U-критерий Манна-Уитни)

Разрушение нейронно-глиальных сетей более существенно выражается при моделировании гипоксии. Нейропротекторного эффекта во время кислородного голодания и блокады киназ выявлено не было (Рисунок 34-36).

73



Рисунок 34. Корреляционная зависимость между спонтанными колебаниями Ca²⁺ и расстоянием между клетками (красные точки – пары соседних клеток, синие точки – пары удаленных клеток): А – интактная культура; Б – гипоксия; В – гипоксия + ингибитор SRC; Γ – гипоксия + ингибитор IKKb; Д – гипоксия + ингибитор eEF2K; Е – гипоксия + ингибитор FLT4; Ж – гипоксия + ингибитор RIPK1



Рисунок 35. Репрезентативные графы корреляционной сети с порогом > 0,3: А – интактная культура; Б – гипоксия; В – гипоксия + ингибитор SRC; Г – гипоксия + ингибитор IKKb; Д – гипоксия + ингибитор eEF2K; Е – гипоксия + ингибитор FLT4; Ж – гипоксия + ингибитор



Рисунок 36. Реорганизация активности нейрон-глиальной сети в первичных клеточных культурах при блокаде киназ и моделировании гипоксии: А – средний уровень корреляции всех клеток; Б – средний уровень корреляции всех клеток; В – среднее количество функциональных связей на клетку; Г – процент коррелированных связей от общего числа возможных связей. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной группой клеток; # – статистически значимая разница по сравнению с группой «Гипоксия», * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 (U-критерий Манна-Уитни)

3.5 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

76

нейронных сетей, что является дополнительным параметром оценки эффективности адаптационных возможностей нервных клеток (Kireev et al., 2017; Schürmann et al., 2018). Дополнительно к кальциевому имиджингу оценка функциональной нейросетевой активности с помощью мультиэлектродных матриц сформирует комплексную картину сохранности синаптических контактов и архитектуры нейрон-глиальной сети.

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, IKKb и RIPK1, блокада которых вызывает наиболее характерный нейропротекторный эффект на основании оценки жизнеспособности и спонтанной кальциевой активности нервных клеток головного мозга мыши. Следует отметить, что блокада киназы eEF2K значительно усугубляла негативное действие стресс-факторов на функциональную кальциевую активность нейронглиальных сетей, поэтому данную киназу исключили из дальнейшего исследования. Также значительный интерес представляла киназа FLT4, блокада SAR-131675 способствовала которой ингибитором сохранению сетевой активности после воздействия факторов ишемии. При этом ингибирование FLT4 достоверно снижало жизнеспособность нервных клеток в физиологических условиях. В следствие этого, для оценки специфичности влияния блокады FLT4 на устойчивость нервных клеток к действию гипоксии и ГД были проведены альтернативного эксперименты с использованием ингибитора MAZ51. Применение ингибитора MAZ51 выражено снижает жизнеспособность клеток первичных культур головного мозга в физиологических условиях. При этом ингибитор MAZ51 не способствовал поддержанию жизнеспособности нервных клеток при моделировании гипоксии и ГД (43,03 ± 5,77% и 42,19 ± 3,28%) соответственно). свидетельствует Это 0 TOM, что выявленный ранее нейропротекторный эффект может быть связан с специфическим действием ингибитора SAR-131675, а не непосредственно блокадой FLT4 киназы. Поэтому дальнейших исследований для FLT4 киназы на данном этапе не проводилось.

Спонтанная биоэлектрическая активность сохраняется на протяжении всей жизни клеточной культуры начиная с 3-5 дня культивирования. С развитием нейрон-глиальной сети наблюдается усиление биоэлектрической активности и повышение синхронизации импульсов (Мухина и др., 2011).

Действительно, в интактной группе клеток с 14 по 21 день культивирования наблюдалось развитие фунциональных 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 37 А), а среднее количество спайков с $18,45 \pm 1,57$ (14 день) до $90,22 \pm 12,32$, p<0,05 (21 день) (Рисунок 37 Б).

На 7 сутки после блокады киназы RIPK1 также наблюдалось развитие спонтанной биоэлектрической активности (среднее количество малых сетевых пачек к 14 дню культивирования составляло $15,83 \pm 1,86$ пачек/10 мин, к 21 дню культивирования достигало $24,27 \pm 2,4$ пачек/10 мин, р<0,05; а среднее количество спайков – $14,3 \pm 0,84$ и 27,68 $\pm 5,95$, р<0,05, соответственно). При применении ингибиторов киназ IKKb и SRC параметры биоэлектрической активности оставались на уровне развития 14 дневной культуры (Рисунок 37 А, Б).



Рисунок 37. Основные параметры спонтанной биоэлектрической активности первичных нейрон-глиальных культур на фоне блокады киназ. * – статистически значимая разница по сравнению с клеточной культурой до добавления ингибиторов; # – статистически значимая разница по сравнению с клеточной культурой через 1 сутки после добавления ингибиторов, * p<0,05 (Т-критерий Уилкоксона)

Соответственно, ингибирование киназ IKKb и SRC на 21 день развития клеточных культур приводит к снижению среднего количества сетевых пачек и спайков в пачке в культурах нервных клеток по сравнению с интактной группой: при ингибировании IKKb – $20,11 \pm 2,84$ пачек/10 мин, p<0,05 и 24,12 $\pm 3,07$ спайков, p<0,05, при ингибировании SRC – $17,34 \pm 1,75$ пачек/10 мин, p<0,05 и 30,17 $\pm 8,61$ спайков, p<0,05 (Рисунок 38). Блокада киназы RIPK1 вызывает достоверное снижение только одного параметра, а именно, среднего количества спайков в сетевой пачке, которое составило 27,68 $\pm 5,95$, p<0,05 (Рисунок 38 Б).



Рисунок 38. Основные параметры спонтанной биоэлектрической активности на 21 день развития первичных нейрон-глиальных культур на фоне блокады киназ. * – статистически значимая разница по сравнению с интактной культурой, * p<0,05 (U-критерий Манна-Уитни)

Стоит отметить, что при анализе растровых диаграмм также наблюдается нарушение сетевой активности нейрон-астроцитарных культур при использовании ингибиторов IKKb и SRC киназ (Рисунок 39).



Рисунок 39. Количество спайков в сетевых пачках за 50 мс (верхний ряд); репрезентативные примеры растровых диаграмм (средний ряд) и паттернов (нижний ряд) спонтанной биоэлектрической активности первичных нейрональных культур на 7 сутки после блокады киназ в физиологических условиях. Цветовая диаграмма – время возникновения спайков в сетевой пачке, регистрируемых с электродов, мс

Выявлено, что гипоксическое повреждение негативно влияет на развитие нейрон-глиальной сети. На 7 сутки после моделирования гипоксии параметры спонтанной биоэлектрической активности оставались на уровне развия 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, р=0,34 (Рисунок 40 А); среднее количество спайков $14,78 \pm 0,55$ и $11,58 \pm 4,7$, р=0,42, соответственно (Рисунок 40 Б).



Рисунок 40. 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)

Также данные показатели биоэлектрической активности на 7 сутки постгипоксического периода достоверно отличались от показателей интактной клеточной культуры (число малых сетевых пачек в интактной культуре – $35,79 \pm 4,35$ пачек/10 мин, в группе «Гипоксия» – $15,87 \pm 3,03$ пачек/10 мин, р<0,05; количество спайков в сетевой пачке в интактной культуре – $88,02 \pm 11,9$, в группе «Гипоксия» – $11,58 \pm 4,7$, р<0,05) (Рисунок 41 А, Б).

Следовательно, гипоксия приводит к необратимому угнетению спонтанной биоэлектрической активности и к потере части функционально значимых элементов нейрон-глиальной сети к 7 суткам постгипоксического периода.



Рисунок 41. 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)

Ингибирование IKKb и RIPK1 киназ при гипоксическом повреждении частично способствовало развитию спонтанной биоэлектрической активности на 21 сутки культивирования, о чем сведетельствует увеличение среднего количетва спайков в сетевой пачке ($36,49 \pm 8,24$, p<0,05) при блокаде IKKb (Рисунок 40 Б) и увеличении среднего количества малых сетевых пачек ($23,49 \pm 2,14$ пачек/10 мин, p<0,05) при блокаде RIPK1 (Рисунок 40 А).

Наиболее выраженный защитный эффект на биоэлектрическую активность оказало ингибирование RIPK1 киназы. На 7 день после моделирования гипоксии спонтанная биоэлектрическая активность культур группы «Гипоксия + ингибитор RIPK1» (23,49 \pm 2,14 пачек/10 мин, p<0,05) по параметру числа числа малых сетевых пачек достоверно выше, чем в группе «Гипоксия» (15,87 \pm 3,03 пачек/10 мин) (Рисунок 41 А).

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

83

При анализе паттернов активации также отмечается увеличение времени распространения импульсов между электродами после моделирования гипоксии. При этом блокада RIPK1 киназы сохраняет паттерн активации и структуру пачки на первые сутки после гипоксии (Рисунок 42). На 7 сутки постгипоксическо периода в группе гипоксия происходит утрата практически всех функциональных нейронных ансамблей. Ингибирование киназ IKKb и SRC не приводит к сохранению структуры сетевой активности в отдаленном постгипоксическом периоде, блокада киназы RIPK1 позволяет ее частично сохранить (Рисунок 43).



Рисунок 42. Количество спайков в сетевых пачках за 50 мс (верхний ряд); репрезентативные примеры растровых диаграмм (средний ряд) и паттернов (нижний ряд) спонтанной биоэлектрической активности первичных нейрональных культур на 1 сутки после гипоксии. Цветовая диаграмма – время возникновения спайков в сетевой пачке, регистрируемых с

электродов, мс



Рисунок 43. Количество спайков в сетевых пачках за 50 мс (верхний ряд); репрезентативные примеры растровых диаграмм (средний ряд) и паттернов (нижний ряд) спонтанной биоэлектрической активности первичных нейрональных культур на 7 сутки после гипоксии. Цветовая диаграмма – время возникновения спайков в сетевой пачке, регистрируемых с

Таким образом, применение Necrostatin ингибитора RIPK1 киназы способствует частичному сохранению кальциевой активности первичных культур нервных клеток в отдаленном периоде после воздействия гипоксии, а также сохраняет спонтанную биоэлектрическую активность нейрон-глиальной сети. Блокада киназ IKKb и SRC позволяет сохранять жизнеспособность нейрон-глиальных культур, но активность данных киназ необходима для поддержания функциональной нейросетевой активности культур нервных клеток в постишемическом периоде.

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

Следующим этапом работы явилось исследование влияния блокаторов киназ RIPK1, IKKb и SRC на устойчивость животных ОГБГ (Таблица 2).

Таблица 2.

Группа	Время жизни на высоте, мин	Выживаемость, %	Время потери позы, с	Время восстановления позы, с
Контроль (PBS	$3,8 \pm 0,71$	33,3%	$76,83 \pm 2,56$	$674,8 \pm 53,13$
интравентрикулярно),				
n=18				
Ингибитор SRC	6,68 ± 0,39*	33,3%	$76,00 \pm 2,26$	$738 \pm 19,43$
интравентрикулярно,				
n=18				
Ингибитор IKKb	5,12 ± 0,68	16,7%	$77 \pm 2,44$	$619 \pm 36,5$
интравентрикулярно,				
n=36				
Ингибитор RIPK1	7,65 ± 0,41*	54,5%	$79,4 \pm 3,38$	$796,2 \pm 64,36$
интравентрикулярно,				
n=22				

Основные параметры устойчивости мышей к ОГБГ

* – 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 – $3,8 \pm 0,71$ мин., ингибитор RIPK1 – $7,65 \pm 0,41$ мин., p<0,05, ингибитор SRC – $6,68 \pm 0,39$ 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 44).



Рисунок 44. Влияние блокады исследуемых киназ на распределение животных по степени устойчивости к гипоксии, %.

3.7 Тестирование ориентировочно-двигательной активности и когнитивных способностей животных после моделирования ОГБГ

Через сутки после моделирования ОГБГ в установке IR Actimeter тестировалась двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных.

Показано, что общий уровень локомоторной активности у животных не изменялся, однако животные с ОГБГ достоверно больше времени проводили в центральной области поля (интактная группа – 27,32 ± 4,63 с, контроль – 91,85 ± 22,4 с, p<0,05) (Рисунок 45 Б). Что свидетельствует о изменении уровня

тревожности животных по сравнение с интактными мышами, так как для норных грызунов является нормой покидание 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 нормалицазии уровня тревожности (ОГБГ + ингибитор IKKb – 32,7 \pm 10,18 с, p=0,057) (Рисунок 45 Б).

Также в группе мышей с ОГБГ достоверно изменялось количество 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 45 В). В группах с введением блокаторов данный параметр не отличается от показателей интактных животных и контрольной группы.



Рисунок 45. 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 ± 2,37 с, контроль – $17,72 \pm 1,76$ с, p<0,05) (Рисунок 46).



Рисунок 46. 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 ± 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.

3.8 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. Было проведено моделирование ишемического инсульта методом односторонней окклюзии сонной артерии у мышей. 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 преодоленная дистанция в интактной группе составила $15,92 \pm 0,21$ м, в контрольной – $11,78 \pm 1,01$ м, р<0,05) (Рисунок 47 А). Также после моделирования ишемии изменялся уровень тревожности животных (время в центре, проведенное животным в интактной группе – $18,2 \pm 7,01$ с, в контрольной – $65,71 \pm 10,8$ с, р<0,05) (Рисунок 47 Б).

Снижение уровня ориентировочно-исследовательской активности в группе мышей с ишемическим повреждением по сравнению с интактной группой не происходило (количество стоек в интатной группе – 26,5 ± 4,5 шт., в контрольной группе – 17,78 ± 2,44 шт., p=0,22) (Рисунок 47 В).

В группе с введением блокаторов, такие параметры, как общая преодоленная 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 47. 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). Блокада киназ SRC, IKKb и RIPK1 при ишемии не оказывала влияние на когнитивные способности мышей (Рисунок 48).



Рисунок 48. 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)

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 сохраненинии когнитивных способностей животных. При блокаде SRC такого эффекта не наблюдалась.

3.9 Обсуждение результатов

Данная работа была направлена на выявление новых мишеней для коррекции последствий нарушения мозгового кровообращения. С этой целью мы сосредоточились на выявлении представителей киназ с наиболее интересными механизмами действия, потенциально направленными на нейропротекцию нервных клеток при нейродегенеративных заболеваниях и ишемическом инсульте.

По результатам проведенного скрининга с использованием 85 высокоселективных и низкоселективных ингибиторов, нами были сформированы группы киназ, отличающиеся по своему функциональному значению в поддержании жизнеспособности нервных клеток при моделировании стрессфакторов. Наибольший интерес для дальнейших исследований представляла группа киназ, блокада которых оказывала нейропротекторное действие в условиях ГД. Из этой группы мы выбрали наиболее перспективные для детального исследования киназы. Такими представителями явились киназы eEF2K, FLT4, IKKb, SRC и RIPK1.

Киназа eEF2K принимает участие в основном внутриклеточном энергозатратном процессе – элонгации трансляции. Она способона регулировать скорость элонгации при гипоксии, а значит, и долю потребления молекул ATФ и ГТФ, посредством фосфорилирования фактора eEF2 (Moore et al., 2015).

Наши результаты, демонстрирующие нейропротекторный эффект блокады киназы eEF2K, проявляющийся в сохранении числа жизнеспособных клеток в условиях факторов ишемии хорошо согласуются с литературными данными о том. что ланная киназа может играть важную роль В развитии нейродегенеративных заболеваний. Например, блокада eEF2K активности улучшает выживаемость клеток при окислительном стрессе И стрессе эндоплазматического ретикулума, вызванном болезнью Альцгеймера (БА) (Jan et al., 2017). В моделях эпилепсии у мышей активация eEF2K влияет негативно на клетки, ухудшая ГАМК-эргическую передачу сигналов, а ингибирование eEF2K оказывает нейропротекторный эффект (Heise et al., 2017; Liu et al., 2020). Однако, как при БА, так и при эпилепсии механизмы действия eEF2K до конца не изучены.

Однако сохранения функциональной активности нейронально-глиальных сетей при блокаде eEF2K не происходит. Это можно объяснить тем, что ингибируя киназу eEF2K при гипоксии, мы блокируем ее способность к

93

фосфорилированию фактора eEF2. Соответственно, процесс элонгации продолжается, а запасы АТФ истощаются, что в условиях гипоксии приводит к еще более критическому энергетическому голоданию. Исходя из этого, можно сделать вывод, что ингибируя данную киназу, мы получаем токсический эффект, оказываемый на функциональное взаимодействие клеток нейронально-глиальной сети.

Еще одной перспективной киназой для дальнейшего обсуждения является FLT4. Киназа FLT4, являясь рецепторной, опосредует активацию сигнальных путей MAPK/ERK, которые участвуют в поддержании жизнеспособности клеток (Hou et al., 2011). Известно, что фактор VEGF, опосредующий свое действие через FLT4, способен обладать нейротрофической и нейропротекторной активностью как в периферической, так и в центральной нервной системе, оказывая прямое влияние на нейроны, шванновские клетки, астроциты, нейральные стволовые клетки и микроглию (Namiecińska et al., 2005). Участие FLT4 в каскадах, инициирующих поддержание выживаемости клеток, нейрогенез и ангиогенез (Monaghan et al., 2021), позволяет предположить, что модулирование активности VEGF рецепторов может быть эффективным при терапии ряда нейродегенеративных заболеваний и ишемического инсульта. Однако данных об этом в научной литературе пока немного.

При моделировании очаговой ишемии у крыс показано, что блокада FLT4 снижает активацию лимфатического эндотелия, снижает уровень активации провоспалительных макрофагов, уменьшает объем инфаркта головного мозга (Zhang et al., 2018).

Блокада FLT4, вероятно, может снизить уровень воспаления и реактивность глиальных клеток, поскольку VEGFR-3 может быть вовлечен в развитие воспалительного ответа астроцитов при ишемических инсультах (Shin et al., 2013). В настоящее время не вызывает сомнений, что астроциты играют важную роль в модуляции синаптической пластичности и взаимодействиях нейронных сетей (Verkhratsky et al., 2018), следовательно, предотвращение перехода астроцитов в реактивное состояние может положительно сказаться на активности

нейронной сети. Косвенным подтверждением этого может служить тот факт, что имеются данные о повышении экспрессии фактора роста эндотелия сосудов и его рецепторов при нейродегенеративных изменениях, вызванных БА (Mahoney et al., 2021).

Наши эксперименты позволили оценить нейропротекторный эффект блокады FLT4 при моделировании ГД и гипоксии. Существенным результатом является сохранение параметров корреляционных характеристик и функциональной архитектуры нейрон-глиальной сети при ингибировании данной киназы и моделирования ГД.

Мы впервые описали влияние блокады FLT4 на функциональную кальциевую активность нервных Проведенные клеток. исследования FLT4. свидетельствуют, киназа несомненно, что важна В развитии функциональной дисфункции при нарушениях мозгового кровообращения, и требует более детального изучения в будущем.

Следующей киназой, роль которой при ишемическом повреждении была показана в данной работе, явилась киназа ІККb, инициирующая экспрессию транскрипционного фактора NF-κB, являющегося регулятором генов, участвующих в выживании клеток и воспалении (Truitt et al., 2016). По имеющимся литературным данным, роль NF-кВ в ответе нервных клеток на ишемическое повреждение противоречива. С одной стороны, с использованием модели фокальной церебральной ишемией, вызванной окклюзией средней мозговой артерии на грызунах, было выявлено, что активация NF-кВ происходит как острая реакция на повреждение при инсульте, участвует в разрушении ГЭБ, воспалении и способствует гибели нейронов, тем самым, блокада NF-кВ вызывает уменьшение размера инсульта и нейродефицита (Xu et al., 2002).

С другой стороны, при использовании NEMO-связывающего пептида для ингибирования активации IKKb и NF-kB в модели транзиторной окклюзии сонных артерий у новорожденных крыс подавление активации NF-kB приводило к обострению нейродефицита (van den Tweel et al., 2006). Менее специфичный ингибитор NF-кB, диэтилдитиокарбамат, вызывал увеличение

постреперфузионного апоптоза и размера инсульта в модели окклюзии средней мозговой артерии у крыс (Hill et al., 2001). Исходя из вышеизложенного, следует, что действие фактора NF-kB может зависить от способа ингибирования его активности.

Существует несколько работ, где на активность NF-кВ воздействовали путем ингибирования киназы IKKb (Truitt et al., 2016; Nathan et al., 2017). В нашей работе мы также использовали блокатор IKKB, чтобы оценить эффект, оказываемый на клеточные культуры при моделировнаии ГД и гипоксии.

Блокада IKKb оказывала нейропротекторный эффект, сохраняя процент жизнеспособных клеток, однако данный эффект не распространялся на сохранение функциональной целостности нейрон-глиальной сети при моделировании факторов ишемии. Причем в экспериментах на моделях ОГПГ и ишемии *in vivo* ингибирование IKKb, напротив, снижало выживаемость животных.

Одним из предположений двойственного действия NF-kB при блокаде его активности является то, что NF-kB обладет провоспалительными эффектами, с одной стороны, и антиапоптотическими эффектами, с другой. Bcl2 является примером кB-зависимой индукции антиапоптотического регулятора, который может ограничивать размер инсульта (Haselager et al., 2021). В то же время нижестоящие провоспалительные медиаторы от NF-кB (например, IL-6, MMP9) могут способствовать ишемическому повреждению ткани (Ohta et al., 2017).

Также известно разнонаправленное действие NF-kB в нейронах и астроцитах (Harari et al., 2013). Вклад нейронального и астроглиального NF-кB в реакцию клеток на ишемическое повреждение был исследован на мышах с окклюзией сонных артерий. Было показано, что ингибирование нейронального NF-кB уменьшает размер ядра инсульта и снижает уровень апоптоза, тогда как ингибирование астроглиального NF-кB не имело эффекта (Zhang et al., 2005).

Таким образом, влияние ингибирования IKKb на адаптацию нервных клеток к ишемическому повреждению в настоящее время представляется далеко не очевидным, и требует дальнейших исследований.

96

Киназа SRC участвует в регуляции многих нормальных и патологических процессов в нервной системе, включая выживание и пролиферацию клеток, а также ангиогенез (Mishra et al., 2009; Yin et al., 2018). Нами показано, что ее ингибирование позволяет поддерживать жизнеспособность нервных клеток в первичных культурах при моделировании ключевых факторов ишемии. Данный эффект может быть вызван тем, что активная SRC способна фосфорилировать субъединицу NR2A NMDA-рецептора, вызывая усиление активности рецептора, что может приводить к развитию эксайтотоксичности (Jiang et al., 2008; Yu et al., 2018).

Однако, несмотря на эффективное поддержание жизнеспособности нервных клеток, функциональная активность нейронной сети при блокаде данной киназы не сохраняется, что подтверждается экспериментами по оценке спонтанной кальциевой и биоэлектрической активности. Особый интерес представляют полученные нами данные, согласно которым наблюдается разрушение корреляционных характеристик нейросетевой активности как при ГД, так и при гипоксии, что говорит о прекращении эффективного взаимодействовия клеток друг с другом.

В исследованиях на животных, было показано, что киназа SRC может активироваться в ответ на внутрижелудочковое кровоизлияние при черепномозговой травме (ЧМТ). Системное введение неспецифического ингибитора киназы семейства SRC предотвращает потерю нейронов гиппокампа и дефицит пространственной памяти (Liu et al., 2017). Также блокада SRC после транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс приводит к ускоренному восстановлению моторных, сенсорных и рефлекторных нарушений в течение длительного трехнедельного периода тестирования (Liang et al., 2009). В модели ишемического инсульта у новорожденных свиней ингибирование SRC снижает активацию каспаз 3 и 9 (Kratimenos et al., 2018). Нейропротекторный эффект блокады киназы SRC может быть вызван тем, что активированная киназа SRC регулирует экспрессию VEGF-A через STAT3, а усиленная экспрессия VEGF-A усугубляет проницаемость ГЭБ во время ишемического инсульта (Bai et al., 2014). Вероятно, ингибируя SRC в ишемизированном мозге, можно избежать сверхактивации VEGF-A.

Нами было выполнено исследование влияния блокады SRC на устойчивость мелких лабораторных животных к моделированию ОГБГ и ишемии. Несмотря на то, что блокада киназы SRC в условиях ОГБГ не влияла на выживаемость животных, такие параметры, как доля высокоустойчивых к гипоксии животных и время жизни животных на высоте достоверно повышались по сравнению с контрольной группой. При моделировании ишемии нейропротекторный эффект не выявлен.

Подводя итог, можно заключить, что блокада киназы SRC эффективно поддерживает жизнеспособность нервных клеток *in vitro* и устойчивость мышей к воздействию ОГБГ в экспериментах *in vivo*, однако, она не оказывает нейропротекторного эффекта на функциональную нейросетевую активность и на устойчивость мышей к воздействию ишемии.

Наиболее интересной и перспективной для исследования стала киназа RIPK1. блокада которой выявила нейропротекторное действие как В экспериментах in vitro, так и в in vivo. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными. Недавние исследования показали, что кислородно-глюкозная депривация в нервных клетках головного мозга может индуцировать некроптоз (программируемую некротическую клеточную гибель), запускаемый каскадом RIPK1/RIPK3/MLKL (Newton et al., 2016). К таким выводам пришли вследствии ряда эксперементов, показавших, что блокируя киназу RIPK1, можно предотвратить гибель клеток после инсульта и уменьшить область поражения в головном мозге (Qu et al., 2016). Было продемонстрировано, что мыши с нокаутом RIPK1 проявляют большую устойчивость к ишемическому инсульту (Cruz et al., 2018), также выявлено, что использование блокатора Nec-1 ингибирует индуцированное ишемией увеличение экспрессии RIPK3 и MLKL и уменьшает объем ишемического повреждения головного мозга (Zhang et al., 2019). У мышей с нокаутом RIPK1 или RIPK3 показано уменьшение объема повреждения после ЧМТ до 80%. При этом отмечалось снижение уровня

активации астроцитов и микроглии и улучшение функции памяти (Wehn et al., 2021).

Некроптоз может быть вызван активацией рецепторов смерти, например, рецептором TNFR1. При определенных условиях TNFR1 может приводить к активации RIPK1, которая затем ведет образованию комплекса к RIPK1/RIPK3/MLKL. Фосфорилирование MLKL с помощью RIPK3 в конечном итоге приводит к некроптозу посредством разрушения плазматической мембраны и лизиса клеток (Yuan et al., 2019). Кроме того, активация RIPK1 может альтернативно приводить к апоптозу или нейровоспалению, в зависимости от типа клеток и характера повреждения (Ofengeim et al., 2013). Следовательно, ингибирование RIPK1 может способствовать клеточному выживанию в условиях стресса. Действительно, наши данные подтверждают нейропротекторное действие, вызваннное блокадой RIPK1.

Мы продемонстрировали сохранение числа жизнеспособных клеток после моделирования ГД и гипоксии. Кроме того, нами впервые было показано влияние ингибитора киназы RIPK1 на уровне нейронной сети. С использованием мультиэлектродных матриц для длительного культивирования было показано, что блокада RIPK1 поддерживает количество сетевых импульсов в культурах нервных клеток в постгипоксический период. Интересно отметить, что, несмотря на сохранение биоэлектрической активности нейронной сети и доли клеток, в регистрировались кальциевые события, корреляция которых кальциевой динамики при ингибировании RIPK1 в постгипоксическом периоде значительно снижалась. Вероятно, это связано с тем, что астроциты начинают вносить значительный вклад в кальциевую динамику культур гиппокампа после воздействия стрессовых факторов, при этом ИХ коллективная динамика нарушается.

Кроме того, для подтверждения данных, полученных *in vitro*, мы оценили влияние применения ингибитора RIPK1 на устойчивость мышей к воздействию ОГБГ и ишемии. Выявлено, что введение ингибитора киназы RIPK1 Necrostatin-1 повышает устойчивость животных к воздействию ОГБГ, что хорошо согласуется с имеющимися литературными данными.

Результаты наших исследований показывают, что ингибирование индукции некроптоза через путь RIPK1/RIPK3/MLKL может стать перспективной стратегией для коррекции последствий ишемического инсульта и гипоксияассоциированных заболеваний.

Заключение

По 85 результатам проведенного скрининга использованием с 5 высокоселективных низкоселективных ингибиторов, И выделено 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, IKKb, eEF2K, FLT4 и RIPK1. Данные киназы были выбраны для исследования влияния на сетевую кальциевую динамику. Выявлено, что ингибирование SRC, IKKb и RIPK1 киназ частично поддерживает кальциевую функциональную активность. Однако блокада киназ нейропротекторный SRC IKKb И эффект не оказала на сохранение биоэлектрической активности нейрон-глиальных сетей при гипоксическом повреждении.

В экспериментах *in vivo* были исследованы киназы SRC, IKKb и RIPK1. Показано, что применение ингибитора IKKb 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-a, 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, IKKb, 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 IKKb.

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 IKKb, напротив, оказывало отрицательное влияние на выживаемость мышей при гипоксическом и ишемическом повреждении.

Список сокращений

4E-BP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) – эукариотический фактор инициации трансляции 4E-связывающий белок 1

АКТ (protein kinase B) – протеин киназа В

ALK (anaplastic lymphoma kinase) – киназа анапластической лимфомы

AMP (adenosine monophosphate) – аденозинмонофосфат

АМРА (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) – α-амино-3гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота

ANOVA (analysis of variance) – дисперсионный анализ

ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) – регулирующая сигнал апоптоза киназа 1

ATF2 (activating transcription factor 2) – активирующий фактор транскрипции 2

ATM (ataxia-telangiectasia-mutated kinase) – мутированная в результате атаксиителеангиэктазии киназа

ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) – связанная с атаксиейтелеангиэктазией и Rad3 киназа

BCR (breakpoint cluster region protein) – белок кластерной области точки разрыва

BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – нейротрофический фактор головного мозга

CDK (cyclin-dependent kinases) – циклин зависимая киназа

CHK (checkpoint kinase) - киназа контрольной точки

CHOP (C/EBP homologous protein) – гомологичный белок C/EBP

CK2 (casein kinase 2) – казеинкиназа 2

CLK (cdc2-like kinase) – cdc2-подобная киназа

CSF-1R (colony stimulating factor 1 receptor) – рецептор колониестимулирующего фактора 1

Cx43 (connexin 43) – коннексин 43

DAGK (diacylglycerol kinase) – диацилглицерин киназа

DAPK (death-associated protein kinase) – ассоциированная со смертью протеинкиназа

DBD (DNA-binding domain) – ДНК-связывающий домен

DFG (three-residue motif Asp-Phe-Gly) – трехостаточный мотив аспартатфенилаланин-глицин

DYRK1A (dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A) – регулируемая тирозин-фосфорилированием с двойной специфичностью киназа 1A eEF2K (eukaryotic elongation factor-2 kinase) – киназа эукариотического фактора элонгации-2

EGFR (epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста ERK (extracellular signal-regulated kinases) – регулируемая внеклеточными сигналами киназа

FAK (focal adhesion kinase) - киназа фокальной адгезии

FGFR (fibroblast growth factor receptors) – рецептор фактора роста фибробластов

FLT4 (Fms-related tyrosine kinase 4) – Fms-связанная тирозинкиназа 4

GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor) – глиальный нейротрофический фактор

GDP (turning the G protein off) – выключение G-белка

GFAP (glial fibrillary acidic protein) – глиальный фибриллярный кислотный белок

GFRa (GDNF family receptor-а protein) – белок рецептора-а семейства GDNF

GSK3 (glycogen synthase kinase 3) – киназа-3 гликогенсинтазы

GTP (turning the G protein on) – включение G-белка

ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science) – Международный совет по науке о лабораторных животных

IFN (interferon) – интерферон

IGF1R (insulin-like growth factor 1) – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1

IKKβ (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase) – ингибитор киназы ядерного фактора каппа-В

IL (interleukin) – интерлейкин

IL-1R (interleukin-1 receptor) – рецептора интерлейкина 1

ILK (integrin-linked kinase) – интегрин-связанная киназа

IR (insulin receptor) – рецептор инсулина

IRAK (interleukin-1 receptor-associated kinase) – ассоциированная с рецептором интерлейкина-1 киназа

IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) – требующий инозитол фермент 1

JAK (janus kinase) – янус киназа

JNK (c-Jun N-terminal kinases) – N-концевая киназа c-Jun

KIT (protein tyrosine kinase) – белковая тирозинкиназа

Lck (ymphocyte-specific protein tyrosine kinase) – тирозинкиназа, специфичная для лимфоцитов

LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) – богатая лейцином повторяющаяся киназа 2

LSM (laser scanning microscopes) – лазерный сканирующий микроскоп

Lyn – нерецепторная тирозинкиназа, принадлежащая к семейству киназ SRC

MAPK (mitogen-activated protein kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа

MEF2 (myocyte enhancer factor-2) – фактор энхансера миоцитов-2

MER (myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase) – миелоидно-эпителиальнорепродуктивная тирозинкиназа

MKK (mitogen-activated protein kinase kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа киназа

MLCK (myosin light-chain kinase) – киназа легкой цепи миозина

MLKL (mixed lineage kinase domain like pseudokinase) – домен киназы смешанной линии, подобный псевдокиназе

mTOR (mammalian target of rapamycin) – мишень рапамицина млекопитающих

NBM (neural basal media) – нейробазальная среда

NEMO (NF-kappa-B essential modulator) – эссенциальный модулятор NF-каппа-B

NF-кВ (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – усилитель

ядерного фактора каппа-легкой цепи активированных В-клеток

NIK (NF-кB-inducing kinase) – индуцирующая NF-кВ киназа

NMDA (N-methyl-D-aspartate) – N-метил-D-аспартат

NOX4 (NADPH oxidase 4) – NADPH-оксидаза 4

OICR (Ontario Institute for Cancer Research) – институт исследования рака Онтарио p70S6K (ribosomal protein S6 kinase beta-1) – рибосомная протеинкиназа S6 бета-1 PAK4 (p21-activated kinase 4) – p21-активированная киназа 4

PBS (phosphate-buffered saline) – фосфатный буферный солевой раствор

PDGFR (platelet-derived growth factor receptors) – рецептор тромбоцитарного фактора роста

PDK1 (protein 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) – протеин-3фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа-1

РЕК (pancreatic eIF-2α kinase) – панкреатическая eIF-2 α киназа

PI3K (phosphoinositide 3-kinases) – фосфоинозитид-3-киназа

Pim1 (proto-oncogene protein kinase) – протоонкогенная протеинкиназа 1

PIP (phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate) – фосфатидилинозитол (3, 4, 5)трифосфат

PKA (protein kinase A) – протеинкиназа А

РКС (protein kinase C) – протеинкиназа C

PNK (polynucleotide kinase) – полинуклеотидкиназа

PTEN (phosphatase and tensin homolog) – фосфатаза и гомолог тензина

Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma) – быстро прогрессирующая фибросаркома (серин / треонин-специфическая протеинкиназа)

Ras (rat sarcoma virus) – вирус саркомы крысы (серин / треонин-специфическая протеинкиназа)

RET (receptor tyrosine kinase) – рецепторная тирозинкиназа

RIPK1 (receptor-interacting protein kinase 1) – рецептор-взаимодействующая протеинкиназа 1

ROCK (Rho-associated protein kinase) – Rho-ассоциированная протеинкиназа

RTK (receptor tyrosine kinases) – рецепторная тирозинкиназа

SCFR (cell growth factor receptor) – рецептор фактора роста клеток

Ser (serine) – серин

SGK1 (serum/glucocorticoid regulated kinase 1) – регулируемая сывороткой / глюкокортикоидами киназа 1

SH2 (Src-homology 2) – Src-гомолог 2

SIRT1 (sirtuin 1) – сиртуин 1

SOS (Son of Sevenless) – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов, который взаимодействует с белками RAS для превращения GDP в GTP

Src – нерецепторная тирозинкиназа, принадлежащая к семейству киназ SRC

STAT (signal transducer and activator of transcription) – преобразователь сигнала и активатор транскрипции

TAD (topologically associating domain) – топологически ассоциированный домен TAM (Tyro-Axl-Mer) – рецепторы Tyro3, Axl и Mertk

ТВК1 (TANK-binding kinase 1) – ТАNК-связывающая киназа 1

TEY (Thr-Glu-Tyr) – киназный мотив активации треонин-глутамин-тирозин

TGFβR (transforming growth factor beta receptor) – бета-рецептор трансформирующего фактора роста

TGY (Thr-Gly-Tyr) – киназный мотив активации треонин-глицин-тирозин Thr (threonine) – треонин

TLR (toll-like receptor) – толл-подобный рецептор

TNFR (tumor necrosis factor receptor) – рецептор фактора некроза опухоли

TNF- α (tumor necrosis factor- α) – фактор некроза опухоли- α

ТРҮ (Thr-Pro-Tyr) – киназный мотив активации треонин-пролин-тирозин

TRKA (tropomyosin receptor kinase A) – киназа рецептора тропомиозина А

TRKB (tropomyosin receptor kinase B) – киназа рецептора тропомиозина B

TSC (tuberous sclerosis complex) – комплекс туберозного склероза

Tyr (tyrosine) – тирозин

Yes – нерецепторная тирозинкиназа, принадлежащая к семейству киназ SRC

 $AT\Phi$ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГД – глюкозная депривация

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДМСО – диметилсульфоксид

- мРНК матричная рибонуклеиновая кислота
- ОГБГ острая гипобарическая гипоксия
- ЦНС центральная нервная система
- ЭПР эндоплазматический ретикулум
Список литературы

He, Y. PGK1-mediated cancer progression and drug resistance / Y. He, Y. Luo, D. Zhang, X. Wang, P. Zhang, H. Li, S. Ejaz, S. Liang. // Am. J. Cancer Res. – 2019. – V. 9. – № 11. – P. 2280-2302.

2) Recabarren, R. Mechanistic insights into the phosphoryl transfer reaction in cyclin-dependent kinase 2: A QM/MM study / R. Recabarren, E.H. Osorio, J. Caballero, I. Tuñón, J.H. Alzate-Morales // PLoS One. – 2019. – V. 14. – № 9. – P. e0215793.

3) Zhang, H. A subcellular map of the human kinome / H. Zhang, X. Cao, M. Tang, G. Zhong , Y. Si, H. Li, F. Zhu, Q. Liao, L. Li, J. Zhao, J. Feng, S. Li, C. Wang, M. Kaulich, F. Wang, L. Chen, L. Li, Z. Xia, T. Liang, H. Lu, X.-H. Feng, B. Zhao // Elife. – 2021. V. 10. – P. e64943.

4) Xin, P. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases / P. Xin, X. Xu, C. Deng, S. Liu, Y. Wang, X. Zhou, H. Ma, D. Wei, S. Sun // Int. Immunopharmacol. – 2020. – V. 80. – P. 106210.

5) Xie, Y. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review) / Y. Xie, X. Shi, K. Sheng, G. Han, W. Li, Q. Zhao, B. Jiang, J. Feng, J. Li, Y. Gu // Mol. Med. Rep. – 2019. – V. 19. – № 2. – P. 783-791.

6) Sun, Y. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis / Y. Sun, W.-Z. Liu, T. Liu, X. Feng, N. Yang, H.-F. Zhou // J. Recept. Signal Transduct. Res. – 2015. – V. 35. – № 6. – P. 600-604.

7) Jiang, S. AMPK: Potential Therapeutic Target for Ischemic Stroke / S. Jiang,
T. Li, T. Ji, W. Yi, Z. Yang, S. Wang, Y. Yang, C. Gu // Theranostics. – 2018. – V. 8. – № 16. – P. 4535-4551.

 Weiss, H.R. Akt activation improves microregional oxygen supply/consumption balance after cerebral ischemia-reperfusion / H.R. Weiss, O.Z. Chi, G.K. Kiss, X. Liu, S. Damito, E. Jacinto // Brain Res. – 2018. – V. 1683. – P. 48-54.

9) Peng, W. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors / W. Peng, T.E.
 Nielsen, M.H. Clausen // Trends. Pharmacol. Sci. – 2015. – V. 36. – № 7. – P. 422-439.

10) Li, Y. Protection against acute cerebral ischemia/reperfusion injury by Leonuri Herba Total Alkali via modulation of BDNF-TrKB-PI3K/Akt signaling pathway in rats / Y. Li, L. Xiang, C. Wang, Y. Song, J. Miao, M. Miao // Biomed. Pharmacother. – 2021. – V. 133. – P. 111021.

11) Zhang, H. Improvement of cerebral ischemia/reperfusion injury by daucosterol palmitate-induced neuronal apoptosis inhibition via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway / H. Zhang, Y. Song, C. Feng // Metab. Brain Dis. – 2020. – V. 35. – $N_{\rm P}$ 6. – P. 1035-1044.

12) Weiss, H.R. Improvement in Microregional Oxygen Supply/Consumption Balance and Infarct Size After Cerebral Ischemia-Reperfusion With Inhibition of p70 Ribosomal S6 Kinase (S6K1) / H.R. Weiss, S.J. Mellender, G.K. Kiss, X. Liu, O.Z. Chi // J. Stroke Cerebrovasc. Dis. – 2019. – V. 28. – № 10. – P. 104276.

13) Pluta, R. Tau Protein Dysfunction after Brain Ischemia / R. Pluta, M. Ułamek-Kozioł, S. Januszewski, S.J. Czuczwar // J. Alzheimers. Dis. – 2018. – V. 66. – № 2. – P. 429-437.

14) Jiang, S. AMPK: Potential Therapeutic Target for Ischemic Stroke / S. Jiang,
T. Li, T. Ji, W. Yi, Z. Yang, S. Wang, Y. Yang, C. Gu // Theranostics. – 2018. – V. 8. –
№ 16. – P. 4535-4551.

15) Li, Q. Inhibition of double-strand DNA-sensing cGAS ameliorates brain injury after ischemic stroke / Q. Li, Y. Cao, C. Dang, B. Han, R. Han, H. Ma, J. Hao, L. Wang // EMBO Mol. Med. – 2020. – V. 12. – № 4. – P. e11002.

16) Shi, J. Neuron-autonomous transcriptome changes upon ischemia/reperfusion injury / J. Shi, X. Chen, H. Li, Y. Wu, S. Wang, W. Shi, J. Chen, Y. Ni // Sci. Rep. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 5800.

17) Cheon, S.Y. Cell Type-Specific Mechanisms in the Pathogenesis of Ischemic Stroke: The Role of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 / S.Y. Cheon, E.J. Kim, J.M. Kim, B.-N. Koo // Oxid. Med. Cell Longev. – 2018. – P. 2596043.

18) Shen, G. Anlotinib: a novel multi-targeting tyrosine kinase inhibitor in clinical development / G. Shen, F. Zheng, D. Ren, F. Du, Q. Dong, Z. Wang, F. Zhao, R. Ahmad, J. Zhao // J. Hematol. Oncol. – 2018. – V. 11. – № 1. – P. 120.

19) Ferguson, F.M. Kinase inhibitors: the road ahead / F.M. Ferguson, N.S. Gray
// Nat. Rev. Drug Discov. - 2018. - V. 17. - № 5. - P. 353-377.

20) Severino, P. Ischemic Heart Disease and Heart Failure: Role of Coronary Ion Channels / P. Severino, A. D'Amato, M. Pucci, F. Infusino, L.I. Birtolo, M.V. Mariani, C. Lavalle, V. Maestrini, M. Mancone, F. Fedele // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – V. 21. – № 9. – P. 3167.

21) Gagno, G. From Brain to Heart: Possible Role of Amyloid-β in Ischemic Heart Disease and Ischemia-Reperfusion Injury / G. Gagno, F. Ferro, A.L. Fluca, M. Janjusevic, M. Rossi, G. Sinagra, A.P. Beltrami, R. Moretti, A. Aleksova // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – V. 21. – № 24. – P. 9655.

Shin, T.H. Metabolome Changes in Cerebral Ischemia / T.H. Shin, D.Y. Lee,
S. Basith, B. Manavalan, M.J. Paik, I. Rybinnik, M.M. Mouradian, J.H. Ahn, G. Lee //
Cells. – 2020. – V. 9. – № 7. – P. 1630.

23) Kirdajova, D.B. Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells / D.B. Kirdajova, J. Kriska, J. Tureckova, M. Anderova // Front Cell Neurosci. – 2020. – V. 14. – P. 51.

24) Smith, K.J. Regulation of cerebral blood flow and metabolism during exercise / K.J. Smith, P.N. Ainslie // Exp. Physiol. – 2017. – V. 102. – № 11. – P. 1356-1371.

25) Au, A. Metabolomics and Lipidomics of Ischemic Stroke / A. Au // Adv. Clin. Chem. – 2018. – V. 85. – P. 31-69.

26) Endres, M. The ischemic cascade and mediators of ischemic injury / M.
Endres, U. Dirnagl, M.A. Moskowitz // Handb. Clin. Neurol. – 2009. – V. 92. – P. 3141.

27) Moral, Y. Neonatal hypoxia-ischemia: cellular and molecular brain damage and therapeutic modulation of neurogenesis / Y. Moral, N.J. Robertson, F. Goni-de-Cerio, D. Alonso-Alconada // Rev. Neurol. – 2019. – V. 68. – № 1. – P. 23-36.

28) Li, C. Recent advances in nanomedicines for the treatment of ischemic stroke / C. Li, T. Sun, C. Jiang // Acta. Pharm. Sin. B. – 2021. – V. 11. – № 7. – P. 1767-1788.

29) Sveinsson, O.A. Cerebral ischemia/infarction - epidemiology, causes and symptoms / O.A. Sveinsson, O. Kjartansson, E.M. Valdimarsson // Laeknabladid. – 1 2014. – V. 100. – № 5. – P. 271-279.

30) Pamenter, M.E. Autophagy and apoptosis are differentially induced in neurons and astrocytes treated with an in vitro mimic of the ischemic penumbra / M.E. Pamenter, G.A. Perkins, A.K. McGinness, X.Q. Gu, M.H. Ellisman, G.G. Haddad // PLoS One. $-2012. - V. 7. - N_{2} 12. - P. e51469.$

31) Demyanenko, S.V. The Expression and Localization of Histone Acetyltransferases HAT1 and PCAF in Neurons and Astrocytes of the Photothrombotic Stroke-Induced Penumbra in the Rat Brain Cortex / S.V. Demyanenko, V.A. Dzreyan, A.B. Uzdensky // Mol. Neurobiol. – 2020. – V. 57. – \mathbb{N} 7. – P. 3219-3227.

32) Ferrer, I. Signaling of Cell Death and Cell Survival Following Focal Cerebral Ischemia: Life and Death Struggle in the Penumbra / I. Ferrer, A.M. Planas // Journal of Neuropathology & Experimental Neurology. – 2003. – V. 62. – № 4. – P. 329-339.

33) Håberg, A. Glutamate and GABA metabolism in transient and permanent middle cerebral artery occlusion in rat: importance of astrocytes for neuronal survival / A. Håberg, H. Qu, U. Sonnewald // Neurochem. Int. – 2006. – V. 48. – № 6-7. – P. 531-540.

34) Liu, C. Clematichinenoside Serves as a Neuroprotective Agent Against Ischemic Stroke: The Synergistic Action of ERK1/2 and cPKC Pathways / C. Liu, Q. Du, X. Zhang, H. Ji, Y. Li // Front Cell Neurosci. – 2016. – V. 9. – P. 517.

35) Liu, Y. Functions of lactate in the brain of rat with intracerebral hemorrhage evaluated with MRI/MRS and in vitro approaches / Y. Liu, S. Yang, E. Cai, L. Lin, P. Zeng, B. Nie, F. Xu, Q. Tian, J. Wang // CNS Neurosci. Ther. – 2020. – V. 26. – № 10. – P. 1031-1044.

36) Taoufik, E. Ischemic neuronal damage / E. Taoufik, L. Probert // Curr. Pharm. Des. – 2008. – V. 14. – № 33. – P. 3565-3573.

37) Radak, D. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke / D.
Radak, N. Katsiki, I. Resanovic, A. Jovanovic, E. Sudar-Milovanovic, S. Zafirovic, S.A.
Mousad, E.R. Isenovic // Curr. Vasc. Pharmacol. – 2017. – V. 15. – № 2. – P. 115-122.

38) Choi, D.W. Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020 /
 D.W. Choi // Front Neurosci. - 2020. - V. 14. - P. 579953.

39) Burd, I. Excitotoxicity as a Common Mechanism for Fetal Neuronal Injury with Hypoxia and Intrauterine Inflammation / I. Burd, J. Welling, G. Kannan, M.V. Johnston // Adv. Pharmacol. -2016. - V. 76. - P. 85-101.

40) Brouns, R. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke / R. Brouns, P.P. de Deyn // Clin. Neurol. Neurosurg. – 2009. – V. 111. – № 6. – P. 483-495.

41) Rodrigo, R. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities / R. Rodrigo, R. Fernández-Gajardo, R. Gutiérrez, J.M. Matamal, R. Carrasco, A. Miranda-Merchak, W. Feuerhake // CNS Neurol. Disord. Drug Targets. $-2013. - V. 12. - N \le 5. - P. 698-714.$

42) Li, P. Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery / P. Li, R.A. Stetler, R.K. Leak, Y. Shi, Y. Li, W. Yu, M.V.L. Bennett, J. Chen // Neuropharmacology. – 2018. – V. 134. – P. 208-217.

43) Ya, B.-L. Uric Acid Protects against Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion-Induced Oxidative Stress via Activating Nrf2 and Regulating Neurotrophic Factor Expression / B.-L. Ya, Q. Liu, H.-F. Li, H.-J. Cheng, T. Yu, L. Chen, Y. Wang, L.-L. Yuan, W.-J. Li, W.-Y. Liu, B. Bai // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2018. – P. 6069150.

44) Cui, Y. Nodal mitigates cerebral ischemia-reperfusion injury via inhibiting oxidative stress and inflammation / Y. Cui, J.-Q. Wang, X.-H. Shi, Y.-Y. Wang, H.-Y. Liu, Z. Li, Y. Dong, J. Mang, Z.-X. Xu // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2019. – V. 23. – № 13. – P. 5923-5933.

45) Liu, Q. Antioxidant effects of ginkgolides and bilobalide against cerebral ischemia injury by activating the Akt/Nrf2 pathway in vitro and in vivo / Q. Liu, Z. Jin, Z. Xu, H. Yang, L. Li, G. Li, F. Li, S. Gu, S. Zong, J. Zhou, L. Cao, Z. Wang, W. Xiao // Cell Stress Chaperones. – 2019. – V. 24. – № 2. – P. 441-452.

46) Cobley, J.N. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress / J.N. Cobley, M.L. Fiorello, D.M. Bailey // Redox. Biol. – 2018. – V. 15. – P. 490-503.

47) Yang, C. Neuroinflammatory mechanisms of blood-brain barrier damage in ischemic stroke / C. Yang, K.E. Hawkins, S. Doré, E. Candelario-Jalil // Am J. Physiol. Cell Physiol. – 2019. – V. 316. – № 2. – P. C135-C153.

48) Love, S. Oxidative stress in brain ischemia / S. Love // Brain Pathol. – 1999.
- V. 9. - № 1. - P. 119-131.

49) Доровских, В.А. Оксид азота в химии, биологии и медицине / В.А. Доровских, Т.А. Баталова, А.А. Сергиевич, Г.Е. Уразова. – Благовещенск: ГОУ ВПО АГМА, 2007. – 41 с.

50) Blomgren, K. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain / K. Blomgren, H. Hagberg // Free Radic. Biol. Med. $-2006. - V. 40. - N_{2} 3. - P. 388-397.$

51) Kong, X.-yi. Molecular Biological Roles of Oxidative Stress in Acute Brain Ischemia / X.-yi Kong, J. Guan, R-zhi Wang // Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. – 2016. – V. 38. – № 2. – P. 222-227.

52) Abdullahi, W. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection / W. Abdullahi, D. Tripathi, P.T. Ronaldson // Am J. Physiol. Cell Physiol. – 2018. – V. 315. – № 3. – P. C343-C356.

53) Jiang, X. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke / X. Jiang, A.V. Andjelkovic, L. Zhu, T. Yang, M.V.L. Bennett, J. Chen, R.F. Keep, Y. Shi // Prog. Neurobiol. – 2018. – V. 163-164. – P. 144-171.

54) Cai, W. Pericytes in Brain Injury and Repair After Ischemic Stroke / W. Cai, H. Liu, J. Zhao, L.Y. Chen, J. Chen, Z. Lu, X. Hu // Transl. Stroke Res. – 2017. – V. 8. – № 2. – P. 107-121.

55) Hu, X. Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke / X. Hu, T.M. de Silva, J. Chen, F.M. Faraci // Circ. Res. – 2017. – V. 120. – № 3. – P. 449-471.

56) del Zoppo, G.J. Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia / G.J. del Zoppo, R. Milner, T. Mabuchi, S. Hung, X. Wang, G.I. Berg, J.A. Koziol // Stroke. – 2007. – V. 38. – P. 646-651.

57) Lv, J.-M. The Noncompetitive AMPAR Antagonist Perampanel Abrogates Brain Endothelial Cell Permeability in Response to Ischemia: Involvement of Claudin-5 / J.-M. Lv, X.-M. Guo, B. Chen, Q. Lei, Y.-J. Pan, Q. Yang // Cell Mol. Neurobiol. – $2016. - V. 36. - N_{2} 5. - P. 745-753.$

58) Castro, P. Hemorrhagic transformation and cerebral edema in acute ischemic stroke: Link to cerebral autoregulation / P. Castro, E. Azevedo, J. Serrador, I. Rocha, F. Sorond // J. Neurol. Sci. – 2017. – V. 372. – P. 256-261.

59) Cheng, X. Astrocytic endothelin-1 overexpression promotes neural progenitor cells proliferation and differentiation into astrocytes via the Jak2/Stat3 pathway after stroke / X. Cheng, P.K.K. Yeung, K. Zhong, P.L.M. Zilundu, L. Zhou, S.K. Chung // J. Neuroinflammation. – 2019. – V. 16. – N 1. – P. 227.

60) Liu, X. Inhibition of endothelin A receptor protects brain microvascular endothelial cells against hypoxia-induced injury / X. Liu, F. Deng, Z. Yu, Y. Xie, C. Hu, L. Chen // Int. J. Mol. Med. – 2014. – V. 34. – N_{2} 1. – P. 313-320.

61) Oliveira-Ferreira, A.I. Spreading depolarizations in the rat endothelin-1 model of focal cerebellar ischemia / A.I. Oliveira-Ferreira, S. Major, I. Przesdzing, E.-J. Kang, J.P. Dreier // J. Cereb Blood Flow Metab. – 2020. – V. 40. – № 6. – P. 1274-1289.

62) Jin, W.-N. Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury / W.-N. Jin, S. X.-Y. Shi, Z. Li, M. Li, K. Wood, R.J. Gonzales, Q. Liu // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2017. – V. 37. – № 6. – P. 2224-2236.

63) Morizawa, Y.M. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway / Y.M. Morizawa, Y. Hirayama, N. Ohno, S. Shibata, E. Shigetomi, Y. Sui, J. Nabekura, K. Sato, F. Okajima, H. Takebayashi, H. Okano, S. Koizumi // Nat. Commun. – 2017. – V. 8. – No 1. – P. 28.

64) Zhao, S.-C. Regulation of microglial activation in stroke / S.-C. Zhao, L.-S.
Ma, Z.-H. Chu, H. Xu, W.-Q. Wu, F. Liu // Acta. Pharmacol. Sin. – 2017. – V. 38. – №
4. – P. 445-458.

65) Hung, W.-T. Leptin protects brain from ischemia/reperfusion-induced infarction by stabilizing the blood-brain barrier to block brain infiltration by the blood-

borne neutrophils / W.-T. Hung, C.-H. Wang, S.-Y. Lin, S.-Y. Cheng, L.-Y. Liao, L.-Y. Lu, Y.-J. Chen, Y.-Z. Huang, C.-H. Lin, V.-M. Hsueh // Eur. J. Neurosci. – 2020. – V. 52. – № 12. – P. 4890-4907.

66) Jordán, J. Inflammation as therapeutic objective in stroke / J. Jordán, T. Segura, D. Brea, M.F. Galindo, J. Castillo // Curr. Pharm. Des. – 2008. – V. 14. – № 33. – P. 3549-3564.

67) Niquet, J. Mitochondrial pathways of neuronal necrosis / J. Niquet, D.-W. Seo, C.G. Wasterlain // Biochem. Soc. Trans. – 2006. – V. 34. – P. 1347-1351.

68) Ueda, H. Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain / H. Ueda, R. Fujita // Biol. Pharm. Bull. $-2004. - V. 27. - N_{\odot} 7. - P. 950-955.$

69) Wang, X. Hypoxia promotes apoptosis of neuronal cells through hypoxiainducible factor-1α-microRNA-204-B-cell lymphoma-2 pathway / X. Wang, J. Li, D. Wu, X. Bu, Y. Qiao // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2016. – V. 241. – № 2. – P. 177-183.

70) Fricker, M. Neuronal Cell Death / M. Fricker, A.M. Tolkovsky, V. Borutaite,
M. Coleman, G.C. Brown // Physiol. Rev. – 2018. – V. 98. – № 2. – P. 813-880.

71) Черешнев, В.А. Клиническая патофизиология: курс лекций / В.А.
Черешнев, П.Ф. Литвицкий, В.Н. Цыган. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2015. – 472
с.

72) Xie, W. HMGB1-triggered inflammation inhibition of notoginseng leaf triterpenes against cerebral ischemia and reperfusion injury via MAPK and NF- κ B signaling pathways / W. Xie, T. Zhu, X. Dong, F. Nan, X. Meng, P. Zhou, G. Sun, X. Sun // Biomolecules. – 2019. – V. 9. – Nº 10. – P. 512.

73) Chen, C. Identification of a major determinant for serine-threonine kinase phosphoacceptor specificity / C. Chen, B.H. Ha, A.F.T. Thévenin, H.J. Lou, R. Zhang, K.Y. Yip, J.R. Peterson, M. Gerstein, P.M. Kim, P. Filippakopoulos, S. Knapp, T.J. Boggon, B.E. Turk // Mol. Cell. – 2014. – V. 53. – № 1. – P. 140-147.

74) Kannaiyan, R. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy / R. Kannaiyan, D. Mahadevan // Expert. Rev. Anticancer. Ther. – 2018.
– V. 18. – № 12. – P. 1249-1270.

75) Lakkaniga, N.R. Structural Characterization of the Aurora Kinase B "DFG-flip" Using Metadynamics / N.R. Lakkaniga, M. Balasubramaniam, S. Zhang, B. Frett, H.-Y. Li // AAPS J. – 2019. – V. 22. – № 1. – P. 14.

76) Leroux, A.E. Renaissance of Allostery to Disrupt Protein Kinase Interactions
 / A.E. Leroux, R.M. Biondi // Trends. Biochem. Sci. – 2020. – V. 45. – № 1. – P. 27-41.

77) Nakae, S. Structure of mitogen-activated protein kinase kinase 1 in the DFGout conformation / S. Nakae, M. Kitamura, D. Fujiwara, M. Sawa, T. Shirai, I. Fujii, T. Tada // Acta. Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun. – 2021. – V. 77. – № 12. – P. 459-464.

78) Garuti, L. Non-ATP competitive protein kinase inhibitors / L. Garuti, M. Roberti, G. Bottegoni // Curr. Med. Chem. – 2010. – V. 17. – № 25. – P. 2804-2821.

79) Ung, P.M.-U. Redefining the Protein Kinase Conformational Space with Machine Learning / P.M.-U. Ung, R. Rahman, A. Schlessinger // Cell Chem. Biol. – 2018. – V. 25. – N_{2} 7. – P. 916-924.e2.

80) Gao, F. Phosphorylation-dependent protein design: design of a minimal protein kinase-inducible domain / F. Gao, B.S. Thornley, C.M. Tressler, D. Naduthambi, N.J. Zondlo // Org. Biomol. Chem. – 2019. – V. 17. – № 16. – P. 3984-3995.

81) O'Malley, D.P. Recent advances in inhibitors of C-terminal SRC kinase / D.P.
O'Malley // Future Med. Chem. – 2020. – V. 12. – № 16. – P. 1447-1449.

82) Diallo, A. The serine/threonine kinases that control cell cycle progression as therapeutic targets / A. Diallo, C. Prigent // Bull Cancer. – 2011. – V. 98. – № 11. – P. 1335-1345.

83) Roskoski, Jr. R. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation / Jr. R. Roskoski // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2012. – V. 417. – N \ge 1. – P. 5-10.

84) Li, E. Receptor tyrosine kinase transmembrane domains Function, dimer structure and dimerization energetics / E. Li, K. Hristovacor // Cell Adh. Migr. – 2010. – V. 4. – No 2. – P. 249-254.

85) Lemmon, M.A. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases / M.A. Lemmon,
J. Schlessinger // Cell. – 2010. – V. 141. – № 7. – P. 1117-1134.

86) Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases / J. Schlessinger //
 Cell. - 2000. - V. 103. - № 2. - P. 211-225.

87) Du, Z. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer / Z. Du,
C.M. Lovly // Mol. Cancer. - 2018. - V. 17. - № 1. - P. 58.

88) Artim, S.C. Comparison of tyrosine kinase domain properties for the neurotrophin receptors TrkA and TrkB / S.C. Artim, A. Kiyatkin, M.A. Lemmon // Biochem. J. – 2020. – V. 477. – № 20. – P. 4053-4070.

89) Bogetti, M.E. NGF, TrkA-P and neuroprotection after a hypoxic event in the developing central nervous system / M.E. Bogetti, V.M.P. Devoto, M. Rapacioli, V. Flores, S.F. de Plazas // Int. J. Dev. Neurosci. – 2018. – V. 71. – P. 111-121.

90) Zhang, J. Ginsenoside F1 promotes angiogenesis by activating the IGF-1/IGF1R pathway / J. Zhang, M. Liu, M. Huang, M. Chen, D. Zhang, L. Luo, G. Ye, L. Deng, Y. Peng, X. Wu, G. Liu, W. Ye, D. Zhang // Pharmacol. Res. – 2019. – V. 144. – P. 292-305.

91) Nguyen, Q.L. Vascular PDGFR-alpha protects against BBB dysfunction after stroke in mice / Q.L. Nguyen, N. Okuno, T. Hamashima, S.T. Dang, M. Fujikawa, Y. Ishii, A. Enomoto, T. Maki, H.N. Nguyen, V.T. Nguyen, T. Fujimori, H. Mori, J. Andrae, C. Betsholtz, K. Takao, S. Yamamoto, M. Sasahara // Angiogenesis. – 2021. – V. 24. – № 1. – P. 35-46.

92) Raffaele, S. TNF Production and Release from Microglia via Extracellular Vesicles: Impact on Brain Functions / S. Raffaele, M. Lombardi, C. Verderio, M. Fumagalli // Cells. – 2020. – V. 9. – № 10. – P. 2145.

93) Esposito, E. Brain-to-cervical lymph node signaling after stroke / E. Esposito,
B.J. Ahn, J. Shi, Y. Nakamura, J.H. Park, E.T. Mandeville, Z. Yu, S.J. Chan, R. Desai,
A. Hayakawa, X. Ji, E.H. Lo, K. Hayakawa // Nat. Commun. – 2019. – V. 10. – № 1. –
P. 5306.

94) Bale, T.A. FGFR- gene family alterations in low-grade neuroepithelial tumors
/ T.A. Bale // Acta Neuropathol. Commun. – 2020. – V. 8. – № 1. – P. 21.

95) Eskilsson, E. EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma / E. Eskilsson, G.V. Røsland, G. Solecki, Q. Wang, P.N. Harter, G. Graziani, R.G.W. Verhaak, F. Winkler, R. Bjerkvig, H. Miletic // Neuro. Oncol. $-2018. - V. 20. - N_{\odot} 6. - P. 743-752.$

96) Pop, E. c-Kit expression in somatosensory nuclei of lower medulla oblongata
/ E. Pop, M. Mărdărescu, M. Lazăr, M.C. Rusu, D.A. Ion // Rom. J. Morphol. Embryol.
- 2013. - V. 54. - P. 721-724.

97) Wu, H. Mer regulates microglial/macrophage M1/M2 polarization and alleviates neuroinflammation following traumatic brain injury / H. Wu, J. Zheng, S. Xu, Y. Fang, Y. Wu, J. Zeng, A. Shao, L. Shi, J. Lu, S. Mei, X. Wang, X. Guo, Y. Wang, Z. Zhao, J. Zhang // J. Neuroinflammation. – 2021. – V. 18. – № 1. – P. 2.

98) Pyonteck, S.M. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression / S.M. Pyonteck, L. Akkari, A.J. Schuhmacher, R.L. Bowman, L. Sevenich, D.F. Quail, O.C. Olson, M.L. Quick, J.T. Huse, V. Teijeiro, M. Setty, C.S. Leslie, Y. Oei, A. Pedraza, J. Zhang, C.W. Brennan, J.C. Sutton, E.C. Holland, D. Daniel, J.A. Joyce // Nat. Med. – 2013. – V. 19. – № 10. – P. 1264-1272.

99) Olmos-Alonso, A. Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology / A. Olmos-Alonso, S.T.T. Schetters, S. Sri, K. Askew, R. Mancuso, M. Vargas-Caballero, C. Holscher, V.H. Perry, D. Gomez-Nicola // Brain. – 2016. – V. 139. – P. 891-907.

100) Zhou, D. Cerebral ischemia-reperfusion is modulated by macrophage-stimulating 1 through the MAPK-ERK signaling pathway / D. Zhou, M. Zhang, L. Min, K. Jiang, Y. Jiang // J. Cell. Physiol. – 2020. – V. 235. – № 10. – P. 7067-7080.

101) Guo, Y.-J. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis / Y.-J. Guo, W.-W. Pan, S.B. Liu, Z.-F. Shen, Y. Xu, L.-L. Hu // Exp. Ther. Med. – 2020. – V. 19. – № 3. – P. 1997-2007.

102) Zhou, J. Crosstalk Between MAPK/ERK and PI3K/AKT Signal Pathways During Brain Ischemia/Reperfusion / J. Zhou, T. Du, B. Li, Y. Rong, A. Verkhratsky, L. Peng // ASN Neuro. – 2015. – V. 7. – № 5. – P. 1759091415602463. 103) Xie, W. Protective Effects and Target Network Analysis of Ginsenoside Rg1 in Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury: A Comprehensive Overview of Experimental Studies / W. Xie, P. Zhou, Y. Sun, X. Meng, Z. Dai, G. Sun, X. Sun // Cells. $-2018 - V. 7 - N \ge 12 - P. 270$.

104) Sun, Y. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis / Y. Sun, W.-Z. Liu, T. Liu, X. Feng, N. Yang, H.-F. Zhou // J. Recept. Signal. Transduct. Res. $-2015. - V. 35. - N_{\odot} 6. - P. 600-604.$

105) Eriksson, M. Mitogen activated protein kinase-dependent activation of c-Jun and c-Fos is required for neuronal differentiation but not for growth and stress response in PC12 cells / M. Eriksson, M. Taskinen, S. Leppä // J. Cell Physiol. – 2007. – V. 210. – N_{2} 2. – P. 538-548.

106) Yang, R. EGFR activates GDH1 transcription to promote glutamine metabolism through MEK/ERK/ELK1 pathway in glioblastoma / R. Yang, X. Li, Y. Wu, G. Zhang, X. Liu, Y. Li, Y. Bao, W. Yang, H. Cui // Oncogene. – 2020. – V. 39. – № 14. – P. 2975-2986.

107) Remy, G. Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3 / G. Remy, A.M. Risco, F.A. Iñesta-Vaquera, B. González-Terán, G. Sabio, R.J. Davis, A. Cuenda // Cell Signal. – 2010. – V. 22. – № 4. – P. 660-667.

108) Nishimoto, S. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2 / S. Nishimoto, E. Nishida // EMBO Rep. – 2006. – V. 7. – № 8. – P. 782-786.

109) Cargnello, M. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases / M. Cargnello, P.P. Roux // Microbiol. Mol. Biol. Rev. $-2011. - V.75. - N_{2} 1. - P. 50-83.$

110) Zhang, Z. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review) / Z. Zhang, L. Yao, J. Yang, Z. Wang, G. Du // Mol. Med. Rep. -2018. - V. 18. $- N_{2} 4. - P. 3547-3554.$

111) Zhao, M. Vinpocetine Protects Against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Targeting Astrocytic Connexin43 via the PI3K/AKT Signaling Pathway / M. Zhao, S. Hou, L. Feng, P. Shen, D. Nan, Y. Zhang, F. Wang, D. Ma, J. Feng // Front Neurosci. – 2020. – V. 14. – P. 223.

112) Zhong, Z. Bone marrow mesenchymal stem cells upregulate PI3K/AKT pathway and down-regulate NF- κ B pathway by secreting glial cell-derived neurotrophic factors to regulate microglial polarization and alleviate deafferentation pain in rats / Z. Zhong, A. Chen, Z. Fa, Z. Ding, L. Xiao, G. Wu, Q. Wang, R. Zhang // Neurobiol. Dis. – 2020. – V. 143. – P. 104945.

113) Tian, D. The protective effects of PI3K/Akt pathway on human nucleus pulposus mesenchymal stem cells against hypoxia and nutrition deficiency / D. Tian, J. Liu, L. Chen, B. Zhu, J. Jing // J. Orthop. Surg. Res. $-2020. - V. 15. - N_{2} 1. - P. 29.$

114) Parra-Mercado, G.K. CRF 1 Receptor Signaling via the ERK1/2-MAP and Akt Kinase Cascades: Roles of Src, EGF Receptor, and PI3-Kinase Mechanisms / G.K. Parra-Mercado, A.M. Fuentes-Gonzalez, J. Hernandez-Aranda, M. Diaz-Coranguez, F.M. Dautzenberg, K.J. Catt, R.L. Hauger, J.A. Olivares-Reyes // Front Endocrinol. (Lausanne). – 2019. – V. 10. – P. 869.

115) Thamilselvan, V. FAK association with multiple signal proteins mediates pressure-induced colon cancer cell adhesion via a Src-dependent PI3K/Akt pathway / V. Thamilselvan, D.H. Craig, M.D. Basson // FASEB J. – 2007. – V. 21. – № 8. – P. 1730-1741.

116) Simonyan, L. Regulation of Bax/mitochondria interaction by AKT / L.
Simonyan, T.T. Renault, N.M.J. da Costa, M.J. Sousa, M. Côrte-Real, N. Camougrand,
C. Gonzalez, S.M. Manon // FEBS Lett. – 2016. – V. 590. – № 1. – P. 13-21.

117) Kucukler, S. Morin attenuates acrylamide-induced testicular toxicity in rats by regulating the NF-κB, Bax/Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways / S. Kucukler, C. Caglayan, E. Darendelioğlu, F.M. Kandemir // Life Sci. – 2020. – V. 261. – P. 118301.

118) Losiewicz M.K. mTORC1 and mTORC2 expression in inner retinal neurons and glial cells / M.K. Losiewicz, L. Elghazi, D.C. Fingar, R.V.S. Rajala, S.I. Lentz, P.E. Fort, S.F. Abcouwer, T.W. Gardner // Exp. Eye Res. – 2020. – V. 197. – P. 108131.

119) Li, N. Expression of phosphorylated mTOR and its regulatory protein is related to biological behaviors of ameloblastoma / N. Li, M. Zhong, M. Song // Int. J. Clin. Exp. Pathol. $-2012. - V. 5. - N \circ 7. - P. 660-667.$

120) Qin, X. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein / X. Qin, B. Jiang, Y. Zhang // Cell Cycle. – 2016. – V. 15. – № 6. – P. 781-786.

121) Heim, M.H. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus / M.H. Heim // J. Recept. Signal Transduct. Res. – 1999. – V. 19. – № 1-4. – P. 75-120.

122) Horvath, C.M. The Jak-STAT pathway stimulated by interferon gamma /
C.M. Horvath // Sci. STKE. – 2004. – V. 2004. – № 260. – P. tr8.

123) Silver-Morse, L. JAK-STAT in heterochromatin and genome stability / L. Silver-Morse, W.X. Li // JAKSTAT. – 2013. – V. 2. – № 3. – P. e26090.

124) Gong, P. Tetramethylpyrazine attenuates blood-brain barrier disruption in ischemia/reperfusion injury through the JAK/STAT signaling pathway / P. Gong, Z. Zhang, Y. Zou, Q. Tian, S. Han, Z. Xu, J. Liao, L. Gao, Q. Chen, M. Li // Eur. J. Pharmacol. – 2019. – V. 854. – P. 289-297.

125) Liang, W. Preactivation of Notch1 in remote ischemic preconditioning reduces cerebral ischemia-reperfusion injury through crosstalk with the NF- κ B pathway / W. Liang, C. Lin, L. Yuan, L. Chen, P. Guo, P. Li, W. Wang, X. Zhang // J. Neuroinflammation. – 2019. – V. 16. – No 1. – P. 181.

126) Thoma, A. NF-kB and Inflammatory Cytokine Signalling: Role in Skeletal Muscle Atrophy / A. Thoma, A.P. Lightfoot // Adv. Exp. Med. Biol. – 2018. – V. 1088. – P. 267-279.

127) Brás, J.P. TNF-alpha-induced microglia activation requires miR-342: impact on NF-kB signaling and neurotoxicity / J.P. Brás, J. Bravo, J. Freitas, M.A. Barbosa, S.G. Santos, T. Summavielle, M.I. Almeida // Cell Death Dis. – 2020. – V. 11. – № 6. – P.415.

128) Park, Y. Downregulation of Src-kinase and glutamate-receptor phosphorylation after traumatic brain injury / Y. Park, T. Luo, F. Zhang, C. Liu, H.M.

Bramlett, W.D. Dietrich, B. Hu // J. Cereb. Blood Flow. Metab. – 2013. – V. 33. – № 10. – P. 1642-1649.

129) Tian, H.-P. Non-receptor tyrosine kinase Src is required for ischemiastimulated neuronal cell proliferation via Raf/ERK/CREB activation in the dentate gyrus / H.-P. Tian, B.-S. Huang, J. Zhao, X.-H. Hu, J. Guo, L.-X. Li // BMC Neurosci. – 2009. – V. 10. – P. 139.

130) Kratimenos, P. Effect of Src Kinase inhibition on Cytochrome c, Smac/DIABLO and Apoptosis Inducing Factor (AIF) Following Cerebral Hypoxia-Ischemia in Newborn Piglets / P. Kratimenos, I. Koutroulis, B. Agarwal, S. Theocharis, M. Delivoria-Papadopoulos // Sci Rep. – 2017. – V. 7. – N_{2} 1. – P. 16664.

131) Bagnato, G. Nuclear Functions of the Tyrosine Kinase Src / G. Bagnato, M. Leopizzi, E. Urciuoli, B. Peruzzi // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – V. 21. – № 8. – P. 2675.

132) Li, S. Src kinase signaling in leukaemia / S. Li // Int. J. Biochem. Cell Biol.
- 2007. - V. 39. - № 7-8. - P. 1483-1488.

133) Newton, K. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury / K. Newton, D.L. Dugger, A. Maltzman, J.M. Greve, M. Hedehus, B. Martin-McNulty, R.A.D. Carano, T.C. Cao, N. van Bruggen, L. Bernstein, W.P. Lee, X. Wu, J. DeVoss, J. Zhang, S. Jeet, I. Peng, B.S.McKenzie, M. Roose-Girma, P. Caplazi, L. Diehl, J.D. Webster, D.Vucic // Cell Death Differ. – 2016. – V. 23. – No 9. – P. 1565-1576.

134) Baltan, S. CK2 inhibition protects white matter from ischemic injury / S. Baltan, C. Bastian, J. Quinn, D. Aquila, A. McCray, S. Brunet // Neurosci. Lett. – 2018. – V. 687. – P. 37-42.

135) Li, B. Inhibition of RhoA/ROCK Pathway in the Early Stage of Hypoxia Ameliorates Depression in Mice via Protecting Myelin Sheath / B. Li, Y. Xu, Y. Quan, Q. Cai, Y. Le, T. Ma, Z. Liu, G. Wu, F. Wang, C. Bao, H. Li // ACS Chem. Neurosci. – 2020. – V. 11. – № 17. – P. 2705-2716.

136) Zhang, J.-G. Hypoxic induction of vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma: role of HIF-1 α, RhoA/ROCK and Rac1/PAK signaling / J.-G. Zhang, H.-M.

Zhou, X. Zhang, W. Mu, J.-N. Hu, G.-L. Liu, Q. Li // BMC Cancer. – 2020. – V. 20. – № 1. – P. 32.

137) Kang, C. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: fine-tuning of autophagy in Caenorhabditis elegans homeostasis / C. Kang, L. Avery // FEBS J. $-2010. - V. 277. - N_{2} 1. - P. 66-73.$

138) Williams, S. Expression and Functional Relevance of Death-Associated Protein Kinase in Human Drug-Resistant Epileptic Brain: Focusing on the Neurovascular Interface / S. Williams, M. Hossain, S. Mishra, J. Gonzalez-Martinez, I. Najm, C. Ghosh // Mol. Neurobiol. $-2019. - V.56. - N_{\odot}7. - P.4904-4915.$

139) Bae, Y.-H. Brain injury induces HIF-1 α -dependent transcriptional activation of LRRK2 that exacerbates brain damage / Y.-H. Bae, H. Joo, J. Bae, S.J. Hyeon, S. Her, E. Ko, H.G. Choi, H. Ryu, E.-M. Hur, Y. Bu, B.D. Lee // Cell Death Dis. – 2018. – V. 9. – No 11. – P. 1125.

140) Li, C. Anagliptin Protected against Hypoxia/Reperfusion-Induced Brain Vascular Endothelial Permeability by Increasing ZO-1 / C. Li, Y. Zhang, R. Liu, Y. Mai // ACS Omega. – 2021. – V. 6. – № 11. – P. 7771-7777.

141) Liu, Z. Inhibitions of PKC and CaMK-II synergistically rescue ischemiainduced astrocytic dysfunction / Z. Liu, Y. Huang, L. Liu, L. Zhang // Neurosci. Lett. – 2017. – V. 657. – P. 199-203.

142) Moore Claire E. J., Mikolajek Halina, da Mota Sergio Regufe, Wang Xuemin, Kenney Justin W., Werner Jörn M., Proud Christopher G. Elongation Factor 2 Kinase Is Regulated by Proline Hydroxylation and Protects Cells during Hypoxia // Mol. Cell Biol. 2015. V. 35. № 10. P. 1788-1804.

143) Horman, S. Myocardial ischemia and increased heart work modulate the phosphorylation state of eukaryotic elongation factor-2 / S. Horman, C. Beauloye, D. Vertommen, J.-L. Vanoverschelde, L. Hue, M.H. Rider // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – N_{2} 43. – P. 41970-41976.

144) Dengler, F. Activation of AMPK under Hypoxia: Many Roads Leading to Rome / F. Dengler // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – V. 21. – № 7. – P. 2428.

145) Zhu, H.-H. Pim1 Overexpression Prevents Apoptosis in Cardiomyocytes After Exposure to Hypoxia and Oxidative Stress via Upregulating Cell Autophagy / H.-H. Zhu, X.-T. Wang, Y.-H. Sun, W.-K. He, J.-B. Liang, B.-H. Mo, L. Li // Cell Physiol. Biochem. $-2018. - V. 49. - N_{\rm P} 6. - P. 2138-2150.$

146) Eymin, B. p14ARF activates a Tip60-dependent and p53-independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress / B. Eymin, P. Claverie, C. Salon, C. Leduc, E. Col, E. Brambilla, S. Khochbin, S. Gazzeri // Mol. Cell Biol. – 2006. – V. 26. – N_{2} 11. – P. 4339-4350.

147) Lee, J.-H. Hypoxia activates tumor suppressor p53 by inducing ATR-Chk1 kinase cascade-mediated phosphorylation and consequent 14-3-3 γ inactivation of MDMX protein / J.-H. Lee, Y. Jin, G. He, S.X. Zeng, Y.V. Wang, G.M. Wahl, H. Lu // J. Biol. Chem. – 2012. – V. 287. – No 25. – P. 20898-20903.

148) Meng, T. SIRT1 Antagonizes Oxidative Stress in Diabetic Vascular Complication / T. Meng, W. Qin, B. Liu // Front Endocrinol. (Lausanne). – 2020. – V. 11. – P. 568861.

149) Bronner, S.M. Design of a brain-penetrant CDK4/6 inhibitor for glioblastoma / S.M. Bronner, K.A. Merrick, J. Murray, L. Salphati, J.G. Moffat, J. Pang, C.J. Sneeringer, N. Dompe, P. Cyr, H. Purkey, G. de L. Boenig, J. Li, A. Kolesnikov, R. Larouche-Gauthier, K.W. Lai, X. Shen, S. Aubert-Nicol, Y.-C. Chen, J. Cheong, J.J. Crawford, M. Hafner, P. Haghshenas, A. Jakalian, J.-P. Leclerc, N.-K. Lim, T. O'Brien, E.G. Plise, H. Shalan, C. Sturino, J. Wai, Y. Xiao, J. Yin, L. Zhao, S. Gould, A. Olivero, T.P. Heffron // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2019. – V. 29. – № 16. – P. 2294-2301.

150) Nair, P. Microcephalic primordial dwarfism in an Emirati patient with PNKP mutation / P. Nair, A.R. Hamzeh, M. Mohamed, F. Saif, N. Tawfiq, M.E. Halik, M.T. Al-Ali, F. Bastaki // Am J. Med. Genet. A. – 2016. – V. 170. – № 8. – P. 2127-2132.

151) Shang, J. Adaption of an autonomously cascade DNA circuit for amplified detection and intracellular imaging of polynucleotide kinase with ultralow background /

J. Shang, J. Wei, Q. Wang, J. Wang, Y. Zhou, S. Yu, X. Liu, F. Wang // Biosens. Bioelectron. – 2020. – V. 152. – P. 111994.

152) Kulalert, W. Molecular Determinants of the Regulation of Development and Metabolism by Neuronal eIF2 α Phosphorylation in Caenorhabditis elegans / W. Kulalert, H. Sadeeshkumar, Y.K. Zhang, F.C. Schroeder, D.H. Kim // Genetics. – 2017. – V. 206. – No 1. – P. 251-263.

153) Garcia-Marin, J. Tripeptides as Integrin-Linked Kinase Modulating Agents Based on a Protein-Protein Interaction with α -Parvin / J. Garcia-Marin, M. Griera-Merino, A. Matamoros-Recio, S. de Frutos, M. Rodríguez-Puyol, R. Alajarín, J.J. Vaquero, D. Rodríguez-Puyol // ACS Med. Chem. Lett. – 2021. – V. 12. – Nº 11. – P. 1656-1662.

154) Doultsinos, D. Peptidomimetic-based identification of FDA-approved compounds inhibiting IRE1 activity / D. Doultsinos, A. Carlesso, C. Chintha, J.C. Paton James, A.W. Paton, A. Samali, E. Chevet, L.A. Eriksson // FEBS J. – 2021. – V. 288. – N_{2} 3. – P. 945-960.

155) Revach, O.-Y. Targeting TANK-binding kinase 1 (TBK1) in cancer / O.-Y. Revach, S. Liu, R.W. Jenkins // Expert Opin. Ther. Targets. – 2020. – V. 24. – № 11. – P. 1065-1078.

156) Liu, L. Diacylglycerol kinases regulate TRPV1 channel activity / L. Liu, Y.
Yudin, T. Rohacs // J. Biol. Chem. – 2020. – V. 295. – № 24. – P. 8174-8185.

157) Lang, F. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 in the regulation of renal and extrarenal potassium transport / F. Lang, V. Vallon // Clin. Exp. Nephrol. – 2012. – V. 16. – N_{2} 1. – P. 73-80.

158) Won, S.-Y. PAK4 signaling in health and disease: defining the PAK4-CREB axis / S.-Y. Won, J.-J. Park, E.-Y. Shin, E.-G. Kim // Exp. Mol. Med. $-2019. - V. 51. - N_{2} 2. - P. 1-9.$

159) Dekel, N. Expression, purification and crystallization of CLK1 kinase - A potential target for antiviral therapy / N. Dekel, Y. Eisenberg-Domovich, A. Karlas, T.F. Meyer, F. Bracher, M. Lebendiker, T. Danieli, O. Livnah // Protein Expr. Purif. – 2020. – V. 176. – P. 105742.

160) Artarini, A. Regulation of influenza A virus mRNA splicing by CLK1 / A.
Artarini, M. Meyer, Y.J. Shin, K. Huber, N. Hilz, F. Bracher, D. Eros, L.Orfi, G. Keri,
S. Goedert, M. Neuenschwander, J. von Kries, Y. Domovich-Eisenberg, N. Dekel, I.
Szabadkai, M. Lebendiker, Z. Horváth, T. Danieli, O. Livnah, O. Moncorgé, R. Frise,
W. Barclay, T.F. Meyer, A. Karlas // Antiviral Res. – 2019. – V. 168. – P. 187-196.

161) Tazarki, H. New pyrido[3,4-g]quinazoline derivatives as CLK1 and DYRK1A inhibitors: synthesis, biological evaluation and binding mode analysis / H. Tazarki, W. Zeinyeh, Y.J. Esvan, S. Knapp, D. Chatterjee, M. Schröder, A.C. Joerger, J. Khiari, B. Josselin, B. Baratte, S. Bach, S. Ruchaud, F. Anizon, F. Giraud, P. Moreau // Eur. J. Med. Chem. – 2019. – V. 166. – P. 304-317.

162) Falkenburger, B.H. Cellular models for Parkinson's disease / B.H. Falkenburger, T. Saridaki, E. Dinter // J. Neurochem. – 2016. – V. 139. – P. 121-130.

163) Tasca, C.I. In vitro oxygen-glucose deprivation to study ischemic cell death
/ C.I. Tasca, T. Dal-Cim, H. Cimarosti // Methods Mol. Biol. – 2015. – V. 1254. – P.
197-210.

164) Roppongi, R.T. Low-Density Primary Hippocampal Neuron Culture / R.T. Roppongi, K.P. Champagne-Jorgensen, T.J. Siddiqui // J. Vis. Exp. – 2017. – V. 18. – № 122. – P. 55000.

165) Gafarov, F.M. Neural electrical activity and neural network growth / F.M. Gafarov // Neural. Netw. – 2018. – V. 101. – P. 15-24.

166) Sun, Z. A simple Ca 2+-imaging approach to neural network analyses in cultured neurons / Z. Sun, T.C. Südhof // J. Neurosci. Methods. – 2021. – V. 1. – № 349. – P. 109041.

167) Saavedra, L. Comparison of Acute Effects of Neurotoxic Compounds on Network Activity in Human and Rodent Neural Cultures / L. Saavedra, K. Wallace, T.F. Freudenrich, M. Mall, W.R. Mundy, J. Davila, T.J. Shafer, M. Wernig, D. Haag // Toxicol. Sci. $-2021. - V. 180. - N_{2} 2. - P. 295-312.$

168) Heidemann, M. Functional regeneration of intraspinal connections in a new in vitro model / M. Heidemann, J. Streit, A. Tscherter // Neuroscience. $-2014. - V. 14. - N_{2} 262. - P. 40-52.$

169) Vedunova, M.V. Formation of Neural Networks in 3D Scaffolds Fabricated by Means of Laser Microstereolithography / M.V. Vedunova, P.S. Timashev, T.A. Mishchenko, E.V. Mitroshina, A.V. Koroleva, B.N. Chichkov, V.Ya. Panchenko, V.N. Bagratashvili, I.V. Mukhina // Bull. Exp. Biol. Med. – 2016. – V. 161. – \mathbb{N} 4. – P. 616-621.

170) Митрошина, Е.В. Участие эндоканнабиноидной системы в адаптации нейрон-глиальных сетей к факторам ишемии in vitro / Е.В. Митрошина, Т.А. Мищенко, Н.В. Воронова, Р.С. Ярков, Д.С. Асютин, М.А. Мищенко, М.В. Ведунова // СТМ. – 2017. – Т. 9. – № 4. – С. 66-75.

171) Vedunova, M.V. TrkB-Mediated Neuroprotective and Antihypoxic Properties of Brain-Derived Neurotrophic Factor / M.V. Vedunova, T.A. Mishchenko, E.V. Mitroshina, I.V. Mukhina // Oxid. Med. Cell Longev. – 2015. – V. 2015. – P. 453901.

172) Митрошина, Е.В. Адаптационная роль глиального нейротрофического фактора при ишемии головного мозга / Е.В. Митрошина, Б.Ж. Абогессименгане, М.Д. Уразов, И. Хамрауй, Т.А. Мищенко, Т.А. Астраханова, Н.А. Щелчкова, Р.Д. Лапшин, Т.В. Шишкина, И.И. Белоусова, И.В. Мухина, М.В. Ведунова // СТМ. – 2017. – Т. 9. – № 1. – С. 68-77.

173) Ho, S.L. Toxicity evaluation of prolonged convection-enhanced delivery of small-molecule kinase inhibitors in naïve rat brainstem / S.L. Ho Sharon, R. Singh, Z. Zhou, E. Lavi, M.M. Souweidane // Childs Nerv. Syst. – 2015. – V. 31. – \mathbb{N} 2. – P. 221-226.

174) Deng, X.-X. Necrostatin-1 Prevents Necroptosis in Brains after Ischemic Stroke via Inhibition of RIPK1-Mediated RIPK3/MLKL Signaling / X.-X. Deng, S.-S. Li, F.-Y. Sun // Aging Dis. – 2019. – V. 10. – № 4. – P. 807-817.

175) Vedunova, M.V. TrkB-Mediated Neuroprotective and Antihypoxic Properties of Brain-Derived Neurotrophic Factor / M.V. Vedunova, T.A. Mishchenko, E.V. Mitroshina, I.V. Mukhina // Oxid. Med. Cell Longev. – 2015. – V. 2015. – P. 453901. 176) Vedunova, M.V. Antihypoxic properties of the brain-derived neurotrophic factor in the modeling of hypoxia in dissociated hippocampal cultures / M.V. Vedunova, T.A. Sakharnova, E.V. Mitroshina, I.V. Mukhina // Modern Technologies in Medicine. $-2012. - V. 2014. - N_{\odot} 4. - P. 17-23.$

177) Paxinos, G. The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition /G. Paxinos, K.B.J. Franklin // Access Online via Elsevier. – 2001.

178) Kustikova, V. CalciumCV: Computer Vision Software for Calcium Signaling in Astrocytes / V. Kustikova, M. Krivonosov, A. Pimashkin, P. Denisov, A. Zaikin, M. Ivanchenko, I. Meyerov, A. Semyanov // AIST 2018: Analysis of Images, Social Networks and Texts. – 2018. – V. 11179

179) Mitroshina, E.V. Signatures of the Consolidated Response of Astrocytes to Ischemic Factors In Vitro / E.V. Mitroshina, M.I. Krivonosov, D.E. Burmistrov, M.O. Savyuk, T.A. Mishchenko, M.V. Ivanchenko, M.V. Vedunova // International Journal Molecular Sciences. $-2020. - V. 21. - N_{\odot} 21. - P. 7952.$

180) Savyuk, M. Neuroprotective Effect of HIF Prolyl Hydroxylase Inhibition in an In Vitro Hypoxia Model / M. Savyuk, M. Krivonosov, T. Mishchenko, I. Gazaryan, M. Ivanchenko, A. Khristichenko, A. Poloznikov, D. Hushpulian, S. Nikulin, E. Tonevitsky, G. Abuzarova, E. Mitroshina, M. Vedunova // Antioxidants (Basel). – 2020. – V. 9. – № 8. – P. 662.

181) Mishchenko, T.A. Features of Neural Network Formation and Their Functions in Primary Hippocampal Cultures in the Context of Chronic TrkB Receptor System Influence / T.A. Mishchenko, E.V. Mitroshina, A.V. Usenko, N.V. Voronova, T.A. Astrakhanova, O.M. Shirokova, I.A. Kastalskiy, M.V. Vedunova // Front Physiol. – 2019. – V. 9. – P. 1925.

182) Pimashkin, A. Spiking signatures of spontaneous activity bursts in hippocampal cultures / A. Pimashkin, I. Kastalskiy, A. Simonov, E. Koryagina, I. Mukhina, V. Kazantsev // Front Comput. Neurosci. – 2011. – V. 5. – P. 46.

183) Joerger-Messerli, M.S. Extracellular Vesicles Derived from Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Prevent and Resolve Programmed Cell Death Mediated by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Neuronal Cells / M.S. Joerger-Messerli, B. Oppliger, M. Spinelli, G. Thomi, I. di Salvo, P. Schneider, A. Schoeberlein // Cell Transplant. – 2018. – V. 27. – № 1. – P. 168-180.

184) Kratimenos, P. Effect of Concurrent Src Kinase Inhibition with Short-Duration Hypothermia on Ca2+/Calmodulin Kinase IV Activity and Neuropathology after Hypoxia-Ischemia in the Newborn Swine Brain / P. Kratimenos, I. Koutroulis, A. Jain, S. Malaeb, M. Delivoria-Papadopoulos // Neonatology. – 2018. – V. 113. – $N_{\rm D}$ 1. – P. 37-43.

185) Liu, L. Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems / L.
Liu, K. Sakakibara, Q. Chen, K. Okamoto // Cell Res. – 2014. – V. 24. – № 7. – P. 787-795.

186) Fafián-Labora, J.A. NF- κ B/IKK activation by small extracellular vesicles within the SASP / J.A. Fafián-Labora, A. O'Loghlen // Aging Cell. – 2021. – V. 20. – № 7. – P. e13426.

187) Interleukin-10 Deficiency Alters Endothelial Progenitor Cell-Derived Exosome Reparative Effect on Myocardial Repair via Integrin-Linked Kinase Enrichment / Y. Yue, C. Wang, C. Benedict, G. Huang, M. Truongcao, R. Roy, M. Cimini, V.N. Srikanth Garikipati, Z. Cheng, W.J. Koch, R. Kishore // Circ Res. – 2020. – V. 126. – N $_{2}$ 3. – P. 315-329.

188) Schwaninger, M. NF-kappaB signalling in cerebral ischaemia / M. Schwaninger, I. Inta, O. Herrmann // Biochem. Soc Trans. – 2006. – V. 34. – P. 1291-1294.

189) Yue, Y. Interleukin-10 Deficiency Alters Endothelial Progenitor Cell-Derived Exosome Reparative Effect on Myocardial Repair via Integrin-Linked Kinase Enrichment / Y. Yue, C. Wang, C. Benedict, G. Huang, M. Truongcao, R. Roy, M. Cimini, V.N.S. Garikipati, Z. Cheng, W.J. Koch, R. Kishore // Circ. Res. – 2020. – V. 126. – \mathbb{N}_{2} 3. – P. 315-329.

190) Melincovici, C.S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis / C.S. Melincovici, A.B. Boşca, S. Şuşman, M. Mărginean, C. Mihu, M. Istrate, I.M. Moldovan, A.L. Roman, C.M. Mihu // J. Morphol. Embryol. – 2018. – V. 59. – № 2. – P. 455-467.

191) Namiecińska, M. VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor / M. Namiecińska, K. Marciniak, J.Z. Nowak // Postepy Hig. Med. Dosw. (Online). – 2005. – V. 59. – P. 573-583.

192) Poulsen, A. Structure-based design of oxygen-linked macrocyclic kinase inhibitors: discovery of SB1518 and SB1578, potent inhibitors of Janus kinase 2 (JAK2) and Fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3) / A. Poulsen, A. William, S. Blanchard, A. Lee, H. Nagaraj, H. Wang, E. Teo, E. Tan, K.C. Goh, B. Dymock // J. Comput. Aided. Mol. Des. -2012. - V. 26. $- N_{\odot} 4$. - P. 437-450.

193) Karakas, D. Eukaryotic elongation factor-2 kinase (eEF2K) signaling in tumor and microenvironment as a novel molecular target / D. Karakas, B. Ozpolat // J. Mol. Med. (Berl). $-2020. - V. 98. - N_{2} 6. - P. 775-787.$

194) Malmersjö, S. Neural progenitors organize in small-world networks to promote cell proliferation / S. Malmersjö, P. Rebellato, E. Smedler, H. Planert, S. Kanatani, I. Liste, E. Nanou, H. Sunner, S. Abdelhady, S. Zhang, M. Andäng, A.E. Manira, G. Silberberg, E. Arenas, P. Uhlén // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – V. 110. – № 16. – P. E1524-E1532.

195) Renteria, C. Dynamic Tracking Algorithm for Time-Varying Neuronal Network Connectivity using Wide-Field Optical Image Video Sequences / C. Renteria, Y.-Z. Liu, E.J. Chaney, R. Barkalifa, P. Sengupta, S.A. Boppart // Sci. Rep. – 2020. – V. $10. - N_{2} 1. - P. 2540.$

196) Kireev, D. Graphene Multielectrode Arrays as a Versatile Tool for Extracellular Measurements / D. Kireev, S. Seyock, J. Lewen, V. Maybeck, B. Wolfrum, A. Offenhäusser // Adv. Healthc. Mater. $-2017. - V. 6. - N_{2} 12.$

197) Schürmann, M. Technical feasibility study for production of tailored multielectrode arrays and patterning of arranged neuronal networks / M. Schürmann, N. Shepheard, N. Frese, K. Geishendorf, H. Sudhoff, A. Gölzhäuser, U. Rückert, C. Kaltschmidt, B. Kaltschmidt, A. Thomas // PLoS One. – 2018. – V. 13. – No 2. – P. e0192647.

198) Мухина, И.В. Культивирование клеток гиппокампа на мультиэлектродных матрицах / И.В. Мухина, Е.А. Корягина, С.А. Коротченко //

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 2011. – 30 с.

199) Fu, Q. Discovery of New Inhibitors of eEF2K from Traditional Chinese Medicine Based on In Silico Screening and In Vitro Experimental Validation / Q. Fu, X. Liu, Y. Li, P. Wang, T. Wu, H. Xiao, Y. Zhao, Q. Liao, Z. Song // Molecules. – 2022. – V. 27. – № 15. – P. 4886.

200) Dong, W. Electroacupuncture Improves Synaptic Function in SAMP8 Mice Probably via Inhibition of the AMPK/eEF2K/eEF2 Signaling Pathway / W. Dong, W. Yang, F. Li, W. Guo, C. Qian, F. Wang, C. Li, L. Lin, R. Lin. // Evid. Based. Complement. Alternat. Med. – 2019. – P. 8260815.

201) Moore, C.E.J. Elongation Factor 2 Kinase Is Regulated by Proline Hydroxylation and Protects Cells during Hypoxia / C.E.J. Moore, H. Mikolajek, S.R. da Mota, X. Wang, J.W. Kenney, J.M. Werner, C.G. Proud. // Mol. Cell Biol. – 2015. – V. $35. - N_{\rm P} 10. - P. 1788-1804.$

202) Jan, A. Sorensen. eEF2K inhibition blocks Aβ42 neurotoxicity by promoting an NRF2 antioxidant response / A. Jan, B. Jansonius, A. Delaidelli, S.P. Somasekharan, F. Bhanshali, M. Vandal, G.L. Negri, D. Moerman, I. MacKenzie, F. Calon, M.R. Hayden, S. Taubert, P.H. // Acta. Neuropathol. – 2017. – V. 133. – №1. – P. 101-119.

203) Heise, C. eEF2K/eEF2 Pathway Controls the Excitation/Inhibition Balance and Susceptibility to Epileptic Seizures / C. Heise, E. Taha, L. Murru, L. Ponzoni, A. Cattaneo, F.C. Guarnieri, C. Montani, A. Mossa, E. Vezzoli, G. Ippolito, J. Zapata, I. Barrera, A.G. Ryazanov, J. Cook, M. Poe, M.R. Stephen, M. Kopanitsa, R. Benfante, F. Rusconi, D. Braida, M. Francolini, C.G. Proud, F. Valtorta, M. Passafaro, M. Sala, A. Bachi, C. Verpelli, K. Rosenblum, C. Sala // Cereb. Cortex. – 2017. – V. 27. – № 3. – P. 2226-2248.

204) Liu, Z. Direct Medial Entorhinal Cortex Input to Hippocampal CA3 Is Crucial for eEF2K Inhibitor-Induced Neuronal Oscillations in the Mouse Hippocampus / Z. Liu, C. Peng, Y. Zhuang, Y. Chen, T. Behnisch // Front. Cell Neurosci. – 2020. – V. 14. – P. 24. 205) Hou, Y. Distribution of vascular endothelial growth factor receptor-3/Flt4 mRNA in adult rat central nervous system / Y. Hou, Y.-J. Shin, E. J. Han, J.-S. Choi, J.-M. Park, J.-H. Cha, J.-Y. Choi, M.-Y. Lee // J. Chem. Neuroanat. – 2011. – V. 42. – № 1. – P. 56-64.

206) Namiecińska, M. VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor / M. Namiecińska, K. Marciniak, J.Z. Nowak // Postepy. Hig. Med. Dosw. (Online). – 2005. – V. 59. – P. 573-583.

207) Monaghan, R.M. The physiological and pathological functions of VEGFR3 in cardiac and lymphatic development and related diseases / R.M. Monaghan, D.J. Page,
P. Ostergaard, B.D Keavney // Cardiovasc Res. – 2021. – V. 117. – № 8. – P. 1877-1890.

208) Zhang, Y. Functions and Regeneration of Mature Cardiac Lymphatic
Vessels in Atherosclerosis, Myocardial Infarction, and Heart Failure / Y. Zhang, Y. Bai,
Q. Jing, J. Qian // Lymphat. Res. Biol. – 2018. – V. 16. – № 6. – P. 507-515.

209) Shin, Y.-J. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 expression in perivascular cells of the ischemic core following focal cerebral ischemia in rats / Y.-J. Shin, J.-M. Park, J.M. Cho, J.-H. Cha, S.Y. Kim, M.-Y. Lee // Acta Histochem. $-2013. - V. 115. - N_{2} 2. - P. 170-177.$

210) Verkhratsky, V. Physiology of Astroglia / Alexei Verkhratsky, Maiken Nedergaard // Physiol Rev. – 2018. – V. 98. – № 1. – P. 239-389.

211) Mahoney, E.R. Brain expression of the vascular endothelial growth factor gene family in cognitive aging and alzheimer's disease / E.R. Mahoney, L. Dumitrescu, A.M. Moore, F.E. Cambronero, P.L. De Jager, M.E.I. Koran, V.A. Petyuk, R.A.S. Robinson, S. Goyal, J.A. Schneider, D.A. Bennett, A.L. Jefferson, T.J. Hohman // Mol. Psychiatry. $-2021. - V. 26. - N_{\odot} 3. - P. 888-896.$

212) Truitt, J.M. Inhibition of IKK β Reduces Ethanol Consumption in C57BL/6J Mice / J.M. Truitt, Y.A. Blednov, J.M. Benavidez, M. Black, O. Ponomareva, J. Law, M. Merriman, S. Horani, K. Jameson, A.W. Lasek, R.A. Harris, R.D. Mayfield // eNeuro. – 2016. – V. 3. – No 5. – P. ENEURO.0256-16.2016. 213) Xu, L. Recombinant adenoviral expression of dominant negative IkappaBalpha protects brain from cerebral ischemic injury / L. Xu, Y. Zhan, Y. Wang, G.Z. Feuerstein, X. Wang // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2002. – V. 299. – \mathbb{N}° 1. – P. 14-17.

214) Van den Tweel, E.R.W. Selective inhibition of nuclear factor-kappaB activation after hypoxia/ischemia in neonatal rats is not neuroprotective / E.R.W van den Tweel, A. Kavelaars, M.S. Lombardi, F. Groenendaal, M. May, C.J. Heijnen, F. van Bel // Pediatr. Res. – 2006. – V. 59. – N_{2} 2. – P. 232-236.

215) Hill, W.D. The NF-kappaB inhibitor diethyldithiocarbamate (DDTC) increases brain cell death in a transient middle cerebral artery occlusion model of ischemia / W.D. Hill, D.C. Hess, J.E. Carroll, C.G. Wakade, E.F. Howard, Q. Chen, C. Cheng, A. Martin-Studdard, J.L. Waller, R.A. Beswick // Brain Res. Bull. – 2001. – V. $55. - N_{2} 3. - P. 375-386.$

216) Nathan, S. BRCA1-mimetic compound NSC35446.HCl inhibits IKKB expression by reducing estrogen receptor- α occupancy in the IKKB promoter and inhibits NF- κ B activity in antiestrogen-resistant human breast cancer cells / S. Nathan, Y. Ma, Y.A. Tomita, E. De Oliveira, M.L. Brown, E.M. Rosen // Breast Cancer Res. Treat. – 2017. – V. 166. – No 3. – P. 681-693.

217) Zhang, W. Neuronal activation of NF-kappaB contributes to cell death in cerebral ischemia / W. Zhang, I. Potrovita, V. Tarabin, O. Herrmann, V. Beer, F. Weih, A. Schneider, M. Schwaninger // J. Cereb. Blood Flow Metab. – 2005. – 25. – № 1. – P. 30-40.

218) Haselager, M. Regulation of Bcl-XL by non-canonical NF-κB in the context of CD40-induced drug resistance in CLL / M. Haselager, R. Thijssen, C. West, L. Young, R. Van Kampen, E. Willmore, S. Mackay, A. Kater, E. Eldering // Cell Death Differ. $-2021. - V. 28. - N_{2} 5. - P. 1658-1668.$

219) Ohta, K. TNF- α -induced IL-6 and MMP-9 expression in immortalized ameloblastoma cell line established by hTERT / K. Ohta, T. Naruse, Y. Ishida, H. Shigeishi, T. Nakagawa, A. Fukui, H. Nishi, K. Sasaki, I. Ogawa, M. Takechi // Oral Dis. – 2017. – V. 23. – No 2. – P. 199-209.

220) Mishra, O.P. NO-mediated activation of Src kinase during hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets / O.P. Mishra, Q.M. Ashraf, M. Delivoria-Papadopoulos // Neurosci. Lett. $-2009. - V.460. - N_{2}1. - P.61-65.$

221) Yin, X. Roles of astrocytic connexin-43, hemichannels, and gap junctions in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury induced neuroinflammation and the possible regulatory mechanisms of salvianolic acid B and carbenoxolone / X. Yin, L. Feng, D. Ma, P. Yin, X. Wang, S. Hou, Y. Hao, J. Zhang, M. Xin, J. Feng // J. Neuroinflammation. $-2018. - V. 15. - N_{\rm P} 1. - P. 97.$

222) Jiang, X. Activated Src kinases interact with the N-methyl-D-aspartate receptor after neonatal brain ischemia / X. Jiang, D. Mu, V. Biran, J. Faustino, S. Chang, C.M. Rincón, R.A. Sheldon, D.M. Ferriero // Ann. Neurol. – 2008. – V. 63. – N_{2} 5. – P. 632-641.

223) Yu, X. Src is Implicated in Hepatic Ischemia Reperfusion-Induced Hippocampus Injury and Long-Term Cognitive Impairment in Young Mice via NMDA Receptor Subunit 2A Activation / X. Yu, L. Jia, K. Yin, J. Lv, W. Yu, H. Du // Neuroscience. – 2018. – V. 391. – P. 1-12.

224) Liu, D.Z. Inhibition of Src family kinases improves cognitive function after intraventricular hemorrhage or intraventricular thrombin / D.Z. Liu, B. Waldau, B.P. Ander, X. Zhan, B. Stamova, G.C. Jickling, B.G. Lyeth, F.R. Sharp // J. Cereb. Blood Flow Metab. $-2017. - V. 37. - N_{\odot} 7. - P. 2359-2367.$

225) Liang, S. Neuroprotective profile of novel SRC kinase inhibitors in rodent models of cerebral ischemia / S. Liang, K. Pong, C. Gonzales, Y. Chen, H.-P. Ling, R.J. Mark, F. Boschelli, D.H. Boschelli, F. Ye, A. C.B. Sosa, T.S. Mansour, P. Frost, A. Wood, M.N. Pangalos, M.M. Zaleska // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2009. – V. 331. – № 3. – P. 827-835.

226) Kratimenos, P. Effect of Concurrent Src Kinase Inhibition with Short-Duration Hypothermia on Ca2+/Calmodulin Kinase IV Activity and Neuropathology after Hypoxia-Ischemia in the Newborn Swine Brain / P. Kratimenos, I. Koutroulis, A. Jain, S. Malaeb, M. Delivoria-Papadopoulos // Neonatology. – 2018. – V. 113. – $N_{\rm P}$ 1. – P. 37-43. 227) Bai, Y. Inhibition of Src phosphorylation reduces damage to the blood-brain barrier following transient focal cerebral ischemia in rats / Y. Bai, G. Xu, M. Xu, Q. Li, X. Qin // Int. J. Mol. Med. -2014. - V. 34. - No 6. - P. 1473-1482.

228) Newton, K. RIPK3 deficiency or catalytically inactive RIPK1 provides greater benefit than MLKL deficiency in mouse models of inflammation and tissue injury / K. Newton, D.L. Dugger, A. Maltzman, J.M. Greve, M. Hedehus, B. Martin-McNulty, R.A.D. Carano, T.C. Cao, N. van Bruggen, L. Bernstein, W.P. Lee, X. Wu, J. DeVoss, J. Zhang, S. Jeet, I. Peng, B.S. McKenzie, M. Roose-Girma, P. Caplazi, L. Diehl, J.D. Webster, D. Vucic // Cell Death Differ. – 2016. – V. 23. – № 9. – P. 1565-1576.

229) Qu, Y. MLKL inhibition attenuates hypoxia-ischemia induced neuronal damage in developing brain / Y. Qu, J. Shi, Y. Tang, F. Zhao, S. Li, J. Meng, J. Tang, X. Lin, X. Peng, D. Mu. // Exp. Neurol. – 2016. – V. 279. – P. 223-231.

230) Cruz, S.A. Dabrafenib, an inhibitor of RIP3 kinase-dependent necroptosis, reduces ischemic brain injury / S.A. Cruz, Z. Qin, A.F.R. Stewart, H.H. Chen // Neural. Regen. Res. – 2018. – V. 13. – P. 252-256.

231) Zhang, Y.-Y. Ligustroflavone reduces necroptosis in rat brain after ischemic stroke through targeting RIPK1/RIPK3/MLKL pathway / Y.-Y. Zhang, W.-N. Liu, Y.-Q. Li, X.-J. Zhang, J. Yang, X.-J. Luo, J. Peng // Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. – 2019. – V. 392. – N_{2} 9. – P. 1085-1095.

232) When, A.C. RIPK1 or RIPK3 deletion prevents progressive neuronal cell death and improves memory function after traumatic brain injury / A.C. Wehn, I. Khalin, M. Duering, F. Hellal, C. Culmsee, P. Vandenabeele, N. Plesnila, N.A. Terpolilli // Acta Neuropathol. Commun. $-2021. - V. 9. - N_{\odot} 1. - P. 138$.

233) Yuan, J. Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases / J. Yuan, P. Amin, D. Ofengeim // Nat. Rev. Neurosci. – 2019. – V. 20. – № 1. – P. 19-33.

234) Ofengeim, D. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death / D. Ofengeim, J. Yuan // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2013. – V. 14. – N_{2} 11. – P. 727-736.

Приложения

Приложение 1.

Химическая структура ингибиторов киназ

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
ST638, ST-6385	Tyrosine kinase inhibitor	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	HO NH ₂
Neratinib, HKI- 272, CPD-820	EGFR (ERBB1, HER1), ErbB2 (TRK1, HER2, NEU)	C ₃₀ H ₂₉ C ₁ N ₆ O ₃	
K-252a, K-2151	TRKA (TRK)	C27H ₂₁ N ₃ O ₅	
SAR-131675	FLT4 (VEGFR3)	C ₁₈ H ₂₂ N ₄ O ₄	

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
OSI-906, Linsitinib	IGF1R (JTK13, IGFIR)	C ₂₆ H ₂₃ N ₅ O	NH2 N HO
SJN 2511	TGFbR1 (ALKS)	C ₁₇ H ₁₃ N ₅	
BGJ-398, NVP- BGJ-398, NVP- BGJ398	FGFR1 (FLT2), FGFR2, FGFR3, FGFR4	C ₂₆ H ₃₁ C ₁₂ N ₇ O ₃	
RET Inhibitor Example 8 (Free base)	RET	C ₂₅ H ₂₆ N ₄ O ₄ S ₂	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N
LY-2157299	TGFbR1 (ALK5), TGFbR2	C ₂₂ H ₁₉ N ₅ O	
Crenolanib, ARO- 002, CP-868596	PDGFRa (PDGFR2), PDGFRb (PDGFR, PDGFR1)	C ₂₆ H ₂₉ N ₅ O ₂	

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
Masitinib, AB- 1010, AB1010, Masiviera	KIT (c-KIT), PDGFRb (PDGFR, PDGFR1), FGFR3	C ₂₈ H ₃₀ N ₆ OS	
Masitinib mesylate, AB1010, AB-1010	KIT (c-KIT), PDGFRb (PDGFR, PDGFR1), FGFR3	C ₂₉ H ₃₄ N ₆ O ₄ S ₂	
Mubritinib, TAK- 165, D04025	ErbB2 (TKR1, HER2, NEU)	C ₂₅ H ₂₃ F ₃ N ₄ O ₂	
CH5424802, AF- 802, CH-5424802	ALK	C ₃₀ H ₃₄ N ₄ O ₂	
LDN193189, LDN-193189, DM- 3189	ALK2, BMPR1A (ALK 3)	C ₂₅ H ₂₂ N ₆	
JNJ-28312141	FMS (c-FMS, CSF-1R, CSF1R)	C ₂₆ H ₃₂ N ₆ O ₂	
Encorafenib, LGX- 818, NVP-LGX- 818	BRAF (B-raf)	C ₂₂ H ₂₇ C ₁ FN ₇ O ₄ S	

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
ТАК-632	BRAF (B-raf), RAF1 (c-Raf)	C ₂₇ H ₁₈ F ₄ N ₄ O ₃ S	
Binimetinib, ARRY-162, ARRY-438162, MEK-162	MAP2K1 (MEK1), MAP2K2 (MEK2)	C ₁₇ H ₁₅ BrF ₂ N ₄ O ₃	Br F N N N N N N N N N N N N N N N N N N
RG-7842, GDC- 0994	Erk1, Erk2 (ERK, p38)	C ₂₁ H ₁₈ C ₁ FN ₆ O ₂	
Compound 10	Erk2 (ERK, p38)	C ₂₄ H ₂₂ FN ₅ OS	
Compound 70	Erk2 (ERK, p38)	C24H22FN5O3S	

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
XMD8-92, XMD- 8-92	Erk5 (BMK1, PRKM7)	C ₂₈ H ₃₁ F ₃ N ₆ O ₅	
BIX-RSK2 Inhibitor	RSK1 (RSK, S6Ka, MAPKAPK1C), RSK2 (S6K-a3, p90-RSK2)	C ₂₂ H ₂₀ N ₆ O ₂	NH NH NH
LY2228820, LY- 2228820	p38a, p38b	C ₂₆ H ₃₇ FN ₆ O ₆ S ₂	
Losmanimod	n38a	C22H26FN2O2	
856553, GSK- AHAB, GW- 856553, GW- 856553X, SB- 856553	- poor	C221120111302	
S-99	MAP3K5 (ASK1)	C ₁₆ H ₁₅ F ₃ N ₆ O	F F N N N N N N N N N N N N N N N N N N

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
PF 3644022, PF- 3644022, MK2 inhibitor, compound 35	MAPKAPK2 (MK2)	C ₂₁ H ₁₈ N ₄ OS	HIN HIN NH
GLPG-0259, Compound A	MAPKAPK5 (PRAK)	C ₂₄ H ₂₆ N ₈ O ₂	
SR-3576, SR 3576	JNK3	C ₂₇ H ₂₇ N ₅ O ₅	
GDC-0941 bismesylate, RG- 7321, Pictilisib	РІЗК	C ₂₅ H ₃₅ N ₇ O ₉ S ₄	
CZC 24832, CZC- 24832	Phosphatidylino sitol 3-Kinase gamma (PI3Kgamma) Inhibitor	C ₁₅ H ₁₇ FN ₆ O ₂ S	
GSK 2334470, GSK-2334470	PDK1 (PDPK1)	C ₂₅ H ₃₄ N ₈ O	NH NH NH NH NH NH ₂

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
GDC-0068, RG- 7440, Ipatasertib	AKT1 (PKBa), AKT2 (PKBb), AKT3 (PKBg)	C ₂₄ H ₃₂ C ₁ N ₅ O ₂	
Pp242, Torkinib	FRAP (MTOR, FRAP1)	C ₁₆ H ₁₆ N ₆ O	HO NH ₂ NH N N N
AZD-2014	mTOR Complex 1 (mTORC1) Inhibitor, mTOR Complex 2 (mTORC2) Inhibitor	C ₂₅ H ₃₀ N ₆ O ₃	
S6K-18	p70S6K (S6K, S6K1)	C ₁₇ H ₁₈ N ₄ O ₃ S	
PF 4708671, PF- 4708671	p70S6K (S6K, S6K1)	C19H21F3N6	

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
Filgotinib, G- 146034, GLPG- 0634	JAK1, JAK2	C ₂₁ H ₂₃ N ₅ O ₃ S	
NVP-BSK805	JAK2	C ₂₇ H ₃₀ C ₁₂ F ₂ N ₆ O	
LY2784544, LY- 2784544	JAK2	C ₂₃ H ₂₅ C ₁ FN ₇ O	
Pacritinib, ONX- 0803, SB-1518	JAK2, CDK2/Cyclin A, CDK2/Cyclin E, FLT3 (STK1, FLK2)	C ₂₈ H ₃₂ N ₄ O ₃	
Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
---------------------------	---	--	---------------------
AMG 548, AMG- 548	p38 MAPK, TNF-alpha Production Inhibitor	C ₂₉ H ₂₇ N ₅ O	
NIK Kinase Inhibitor	NIK	C19H17C1N6O2	CI NH2 NH2 CI OH
ACHP	IKKb (IKK2)	C ₂₁ H ₂₄ N ₄ O ₂	
PS1145 dihydrochloride	IKKb (IKK2)	C ₁₇ H ₁₃ C ₁₃ N ₄ O	
Quinalizarin	CK2a1 (CK2, CKII, Casein kinase2)	C ₁₄ H ₈ O ₆	
KU-60019	ATM	C ₃₀ H ₃₃ N ₃ O ₅ S	

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
CHIR-124	CHK1	C ₂₃ H ₂₂ C ₁ N ₅ O	
Chk2 Inhibitor II, 339253	СНК2	C ₂₀ H ₁₄ C ₁ N ₃ O ₂	
Y-39983, RKI-983, SNJ-1656	ROCK1, ROCK2 (ROCKa)	C ₁₆ H ₁₇ C ₁ N4O	HCI
A 769662, A- 769662	АМРК	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	
OICR0000857A	Histone Deacetylase SIRT1 inhibitor	C ₁₆ H ₂₂ N2O ₂ S	NH ₂ NH

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
TTP 22	CK2a1 (CK2, CKII, Casein kinase 2)	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂	HO O
TC-DAPK 6	DAPK1, DAPK3 (ZIPK, ZIP)	C ₁₇ H ₁₂ N ₂ O ₂	
LY2835219, LY- 2835219	CDK4/Cyclin D1, CDK6/Cyclin D3, PIM1	C ₂₇ H ₃₂ F ₂ N ₈	
OICR0000666A01	PIM1	C ₁₉ H ₁₈ F ₄ N ₄ O ₂	
A 1070722, A- 1070722	GSK3	C ₁₇ H ₁₃ F ₃ N ₄ O ₂	HN HN F
CHIR-98014 isomer, CT-98014	GSK3	C ₂₀ H ₁₇ C ₁₂ N ₉ O ₂	

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
2-Thio(3- iodobenzyl)-5-(1- pyridyl)-[1,3,4]- oxadiazole	GSK3B	C ₁₄ H ₁₀ IN ₃ OS	
VE-821	ATR	C ₁₈ H ₁₆ N ₄ O ₃ S	N NH2
W-7 hydrochloride	smMLCK (MLCK, myosin light chain kinase, MYLK)	C ₁₆ H ₂₂ C ₁₂ N ₂ O ₂ S	CI O HCI NH ₂
HG-10-102-01	LRRK2	C ₁₇ H ₂₀ C ₁ N ₅ O ₃	
Compound 34	eEF2K	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₂ S	NH ₂ NH ₂ NH ₂
Compound4	SRC (c-SRC)	C32H23C1N8	

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
Bafetinib, CNS-9, INNO-406, NS- 187	BCR, LYN, ABL1 (ABL), FYN (p59fyn)	C ₃₀ H ₃₁ F ₃ N ₈ O	
Dianilinopyrimidin e_01	Pan kinase	C ₁₇ H ₁₆ FN ₅	H ₂ N F
Compound 71	DYRK1A (DYRK)	C22H25C12N9	
UNC-569A, UNC- 569, Mer inhibitor	MER (MERTK, c-mer)	C22H29FN6	
PND-1186, VS- 4718	FAK (FAK1)	C25H26F3N5O3	
TG003, TG-003	CLK1, CLK4	C ₁₃ H ₁₅ NO ₂ S	

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
AB12134C3, PNK inhibitor	PNK (PNKP)	C30H38N4O5	
PERK inhibitor	PEK (PERK)	C ₂₂ H ₂₀ BrN ₇	HN N H
PKC theta inhibitor	PKCt	C ₂₈ H ₂₉ N ₇	
ILK inhibitor	ILK	C ₁₁ H ₁₀ FN ₅ O ₂ S ₂	H ₂ N O F N N N N N N
ASC-033, APY 33	IRE1 (IRE1a, ERN1)	C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O	
IRAK-1/4 Inhibitor I	IRAK1 (IRAK)	C ₂₀ H ₂₁ N ₅ O ₄	

L

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
IRAK4 Inhibitor	IRAK4	C ₁₆ H ₁₆ C ₁ N ₅	
TBK1 Inhibitor	TBK1	C ₂₈ H ₃₅ N ₇ O ₄	
XRP44X, XRP- 44X, WCH-44	Ras-NET (Elk3), Tubulin polimerization	C ₂₁ H ₂₁ C ₁ N ₄ O	
Dioctanoylglycol	DAGK (DGK, Diacylglycerol kinase)	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	John Stranger
GSK-650394	SGK1 (SGK), SGK2	C25H22N2O2	

Ингибитор	Мишень	Химическая формула	Структурная формула
PF-3758309, PF- 03758309	PAK4	C ₂₅ H ₃₀ N ₈ OS	
Necrostatin-1	RIPK1 (RIP)	C ₁₃ H ₁₃ N ₃ OS	HN S