

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
"КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПРОФЕССОРА В.Ф. ВОЙНО-ЯСЕНЕЦКОГО"
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Хилажева Елена Дмитриевна

**РОЛЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ В РАЗВИТИИ
НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ ПРИ СТАРЕНИИ
(экспериментальное исследование)**

1.5.24. Нейробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Комлева Юлия Константиновна

Красноярск — 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1. Старение и нейродегенерация: общие механизмы.....	17
1.1.1. Современные представления о старении ЦНС.....	17
1.1.2. Концепция « <i>hallmarks of aging</i> » применительно к мозгу.....	19
1.2. Нейровоспаление и inflammaging.....	22
1.2.1. Хроническое низкоуровневое воспаление как фон старения.....	22
1.2.2. Роль PAMP и DAMP в активации TLR и NLR.....	23
1.2.3. Нейровоспаление как связующее звено между старением и нейродегенеративными заболеваниями.....	24
1.3. Инфламмасомы и их роль в старении мозга.....	26
1.3.1. Семейство NLR, особенности активации инфламмасом.....	26
1.3.2. NLRP3-инфламмасома как ключевой механизм нейровоспаления.....	28
1.3.3. IL-1 β , IL-18, каспаза-1: эффекторные звенья.....	31
1.4. Метаболические механизмы регуляции воспалительного ответа.....	33
1.4.1. Связь метаболизма и иммунных функций (<i>immunometabolism</i>).....	33
1.4.2. Метафламмация: взаимодействие энергетического статуса клетки и воспалительных сигналов.....	35
1.4.3. Метаболические инфламмасомы («метафламмасомы»): компоненты, их активация в мозге.....	37
1.5. Инсулиновая сигнализация и мозг.....	38
1.5.1. Церебральная инсулинорезистентность: механизмы и последствия.....	38
1.5.2. IRS1, JNK, PKR, IKK β – молекулярные маркеры нарушенной сигнализации.....	40

1.5.3. Роль инсулинорезистентности в когнитивной дисфункции и ускоренном старении	42
1.6. Молекулярные и клеточные механизмы когнитивной дисфункции	45
1.6.1. Нарушение нейропластичности	45
1.6.2. Влияние глиальной дисфункции и сенесцентных клеток	47
1.6.3. Вклад митохондриальной дисфункции и окислительного стресса	49
1.7. Возможности модуляции NLRP3 и метаболических путей	51
1.7.1. Генетическая модуляция NLRP3-инфламмосомы: фенотипическая характеристика мышей с нокаутом гена <i>Nlrp3</i>	51
1.7.2. Фармакологическая модуляция инфламмосом	53
1.7.3. Перспективы в коррекции возраст-ассоциированной когнитивной дисфункции.....	56
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	58
2.1. Объекты исследования	58
2.2. Дизайн эксперимента и группы животных	59
2.3. Исследования на животных	60
2.3.1. Фармакологическая модуляция инфламмосом.....	60
2.3.2. Поведенческое тестирование	60
2.3.3. Иммуногистохимия и конфокальная микроскопия	63
2.3.4. Исследование сенесценции	64
2.4. Исследование клеточных культур.....	64
2.4.1. Выделение и культивирование нейросфер	64
2.4.2. Фармакологическая модуляция инфламмосом.....	65
2.4.3. Исследование иммуносенесценции	66
2.4.4. Иммуноцитохимическое окрашивание	66

2.5. Исследование органотипических культур гиппокампа	67
2.5.1. Получение органотипических культур гиппокампа	67
2.5.2. Фармакологическая модуляция NLRP3 инфламмасом	67
2.5.3. Исследование иммуносенесценции	68
2.5.4. Иммуноцитохимический анализ	68
2.5.5. Проведение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени	69
2.6. Статистический анализ	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	71
3.1. Изучение молекулярных механизмов метаболических нарушений и развития стареющего фенотипа клеток в головном мозге мышей дикого типа и мышей с делецией гена <i>Nlrp3</i>	71
3.1.1. Результаты поведенческого тестирования молодых и зрелых мышей дикого типа и мышей с делецией гена <i>Nlrp3</i>	71
3.1.2. Изучение сенесценции и развития SASP фенотипа с возрастом у мышей дикого типа и мышей с делецией гена <i>Nlrp3</i>	77
3.1.3. Изучение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом у молодых и зрелых мышей дикого типа и мышей с делецией гена <i>Nlrp3</i>	84
3.1.4. Изучение экспрессии маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности у молодых и зрелых мышей дикого типа и мышей с делецией гена <i>Nlrp3</i>	89
3.2. Исследование эффектов фармакологической модуляции NLRP3-инфламмасом <i>in vitro</i> с использованием LPS.....	94
3.2.1. Изучение сенесценции и развития SASP фенотипа в культурах клеток при аппликации LPS.....	94

3.2.2. Изучение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом и маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности в культурах клеток при аппликации LPS	98
3.3. Исследование эффектов фармакологической модуляции NLRP3-инфламмасом <i>in vitro</i> с использованием неспецифического блокатора глибенкламида на молекулярные механизмы метаболических нарушений и развития стареющего фенотипа клеток в головном мозге мышей дикого типа	101
3.3.1. Изучение сенесценции и развития SASP фенотипа в культурах клеток при аппликации глибенкламида	101
3.3.2. Изучение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом в культурах клеток при аппликации глибенкламида.....	106
3.3.3. Изучение экспрессии маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности в культурах клеток при аппликации глибенкламида	109
3.4. Исследование эффектов фармакологической модуляции NLRP3-инфламмасом с использованием специфического блокатора MCC950 на молекулярные механизмы метаболических нарушений и развития стареющего фенотипа клеток в головном мозге мышей дикого типа	114
3.4.1. Результаты поведенческого тестирования животных после введения MCC950.....	114
3.4.2. Изучение сенесценции и развития SASP фенотипа при модуляции NLRP3 прямым блокатором MCC950.....	116
3.4.3. Изучение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом в культуре клеток при воздействии MCC950	124
3.4.4. Изучение экспрессии маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности в культурах клеток при аппликации MCC950	128
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	130

4.1. Особенности поведенческих реакций у мышей при старении. Влияние генетического нокаута инфламماسомы NLRP3 и фармакологической модуляции NLRP3 на поведение	130
4.2. Изменение числа сенесцентных клеток и развитие SASP фенотипа с возрастом. Влияние генетического нокаута и фармакологической модуляции NLRP3 инфламماسомы	132
4.3. Изменение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ метафламмасом. Влияние генетического нокаута и фармакологической модуляции NLRP3 инфламماسомы	136
4.4. Изменение инсулиновой сигнализации при старении. Роль NLRP3 инфламмасом	142
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	146
ВЫВОДЫ	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	152

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В последние десятилетия отмечается устойчивая тенденция к увеличению продолжительности жизни населения, что отражает значительные успехи медицины и улучшение качества жизни [62]. Однако данное демографическое явление сопровождается ростом распространённости возраст-ассоциированных заболеваний, прежде всего нейродегенеративных, что создаёт существенную медицинскую, социальную и экономическую нагрузку на систему здравоохранения. В связи с этим особую актуальность приобретают исследования, направленные на понимание фундаментальных механизмов старения и разработку стратегий профилактики и терапии патологических состояний, связанных с возрастом.

Современные представления о биологии старения выделяют несколько ключевых молекулярно-клеточных процессов, определяющих возрастные изменения: хроническое системное воспаление низкой интенсивности (inflammaging), клеточная сенесценция с формированием секреторного фенотипа (SASP), метаболическая дисрегуляция (включая снижение толерантности к глюкозе и развитие инсулинорезистентности), а также нарушения сигнальных путей, обеспечивающих клеточный гомеостаз. Эти процессы тесно взаимосвязаны и играют центральную роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний [50]. В частности, хроническое воспаление низкой интенсивности рассматривается в качестве одного из ключевых патогенетических факторов старения и нарушения нейрон-глиальных взаимодействий в центральной нервной системе. На пересечении этих процессов особое место занимает инфламасома NLRP3 — мультибелковый комплекс, инициирующий каскад провоспалительных реакций и играющий ключевую роль в развитии возраст-зависимых и нейродегенеративных патологий.

Несмотря на значительный прогресс в изучении отдельных аспектов метаболической регуляции и нейровоспаления, остаются неясными механизмы,

связывающие метаболические нарушения, активацию NLRP3 инфламмасы и нарушения нейропластичности, лежащие в основе когнитивного старения. Отсутствие целостных экспериментальных моделей, интегрирующих эти аспекты, существенно ограничивает возможности разработки эффективных терапевтических подходов к коррекции возраст-ассоциированных когнитивных нарушений.

Ранее было показано, что воспаление, ассоциированное с нарушением метаболизма при старении, инициируется за счет активации инфламмасы [38]. Метаболические механизмы, лежащие в основе нейровоспаления, включают активацию некоторых протеинкиназ (например, N-концевой киназы c-Jun (JNK)), что способствует высвобождению воспалительных цитокинов. По всей видимости, это приводит к нарушению инсулиновой сигнализации и энергетического гомеостаза нейронов [87]. Таким образом, расшифровка молекулярных механизмов, связывающих метаболическую дисрегуляцию, воспаление и нейродегенерацию, имеет фундаментальное значение для понимания процессов старения мозга и представляет собой одно из приоритетных направлений современной нейробиологии.

Степень разработанности темы исследования

К настоящему моменту достигнут значительный прогресс в понимании молекулярных основ старения и нейровоспаления. Установлено, что ключевую роль в запуске воспалительного каскада играют рецепторы врожденного иммунитета, такие как Toll-like рецепторы (TLR) и NOD-подобные рецепторы (NLR), которые распознают патоген-ассоциированные (PAMP) и ассоциированные с повреждением (DAMP) молекулярные паттерны [85]. Среди них особое внимание привлекают NLR-рецепторы, включающие инфламмасы – мультибелковые цитозольные комплексы, ответственные за процессинг и активацию провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 [42, 69].

Особый интерес в контексте нейродегенерации представляет семейство NLR-рецепторов, способные формировать NLRP3 инфламмасы —

мультибелковые цитозольные комплексы, обеспечивающие процессинг и активацию провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18. Продemonстрировано, что ее чрезмерная активация является ключевым механизмом развития многих возраст-зависимых патологий, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона [35, 85, 93]. Многочисленными исследованиями установлено, что клеточный метаболизм играет центральную роль в регуляции иммунных функций, а метаболические нарушения (например, инсулинорезистентность) напрямую связаны с активацией провоспалительных путей [71, 152]. Клинические данные подтверждают тесную связь между церебральной инсулинорезистентностью, нарушением утилизации глюкозы мозгом и развитием когнитивного дефицита [89, 248]. В последние годы сформировалась концепция «метаболических инфламмасом» (метафламмасом), отражающая взаимосвязь между метаболическим стрессом и активацией воспалительных комплексов [126, 101]. В мозговой ткани идентифицированы ключевые компоненты этих комплексов, включая фосфорилированные формы киназ IKK β , IRS1, JNK и PKR [218]. Их активация сопровождается нарушением энергетического обмена и развитием инсулинорезистентности в нейронах и астроцитах. Эти метаболические сдвиги, в свою очередь, способствуют активации NLRP3-инфламмасомы, формируя порочный круг, поддерживающий хроническое нейровоспаление.

Таким образом, метаболические механизмы нейровоспаления представляют собой совокупность внутриклеточных сигнальных каскадов, связывающих энергетический дисбаланс, фосфорилирование протеинкиназ метафламмасомного комплекса и активацию NLRP3-инфламмасомы. Изучение этих взаимосвязей является важнейшим направлением современной нейробиологии старения и открывает возможности для создания терапевтических подходов, направленных на поддержание когнитивных функций и пластичности мозга.

Несмотря на значительный прогресс в понимании метаболической регуляции NLRP3 инфламмасомы, многие аспекты этого процесса остаются неясными. В настоящее время практически отсутствуют комплексные исследования, которые бы системно и целостно интегрировали все три ключевых

аспекта возраст-зависимой нейродегенерации: метаболические нарушения (инсулинорезистентность, метафламация), активацию NLRP3 инфламماسомы как центрального узла воспаления и нарушения нейропластичности. Это определяет актуальность фундаментальных исследований, направленных на расшифровку метаболических механизмов нейровоспаления, разработку методов модуляции когнитивных функций, стимуляцию нейропластичности и регенеративного потенциала ЦНС. Полученные данные могут стать основой для создания новых терапевтических стратегий в лечении возраст-ассоциированных нейродегенеративных заболеваний.

Согласно рабочей гипотезе метаболические нарушения, возникающие при старении мозга, в том числе нарушения инсулиновой сигнализации, фосфорилирование протеинкиназ метафламмасомного комплекса (PKR, IKK β , JNK), изменение активности GSK3 β и дисрегуляция глюкозного транспорта (GLUT4), способствуют активации NLRP3-инфламмасомы и развитию хронического нейровоспаления. Генетическая инактивация или фармакологическая блокада NLRP3 может предотвращать эти изменения, снижая проявления клеточной сенесценции и поддерживая когнитивные функции при старении.

Цель исследования

Изучение роли NLRP3 инфламмасомы как медиатора межклеточной сигнализации и нейроиммунной коммуникации и метаболических механизмов в формировании возраст-ассоциированных изменений поведения животных, клеточной сенесценции и метаболической дисрегуляции, а также определение возможности её фармакологической модуляции для профилактики когнитивных нарушений, связанных со старением.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать возрастные особенности изменения когнитивных функций, социального поведения и тревожности у мышей дикого типа и у NLRP3-нокаутных мышей.

2. Изучить возрастные и индуцированные липополисахаридом (LPS) особенности формирования воспалительного и сенесцентного фенотипа (SASP) в головном мозге и органотипических культурах гиппокампа, а также оценить участие NLRP3-инфламماسомы в этих процессах.

3. Исследовать взаимосвязь между активацией метафламмасомного комплекса (PKR, IKK β , JNK), нарушениями глюкозного транспорта (GLUT4) и активностью GSK3 β при старении в головном мозге у мышей дикого типа и у NLRP3 - нокаутных мышей.

4. Оценить эффекты фармакологической модуляции NLRP3 инфламماسомы на показатели когнитивных и метаболических функций у животных разных возрастных групп, используя как неспецифические, так и селективные ингибиторы, и определить нейропротекторный потенциал блокирования воспалительного каскада.

5. Сопоставить эффективность генетической инактивации и фармакологической блокады NLRP3 инфламماسомы в предотвращении возраст-ассоциированных когнитивных, нейродегенеративных и метаболических и воспалительных нарушений, установив их вклад в поддержание когнитивных функций.

Научная новизна

1. Впервые в рамках единого экспериментального подхода продемонстрирована фундаментальная роль NLRP3-инфламماسомы как медиатора сигнала метаболической опасности в регуляции возраст-ассоциированных поведенческих и молекулярных изменений.

2. Впервые показано, что делеция гена *Nlrp3* предотвращает развитие когнитивных нарушений, связанных со старением, сохраняя процессы сигнальной памяти. При этом выявлено, что отсутствие NLRP3 сопровождается снижением социальной активности, что отражает сложный характер участия данного белкового комплекса в регуляции поведения.

3. Получены новые данные о сравнительной эффективности генетической инактивации и фармакологической блокады NLRP3. Установлено, что отсутствие

Nlrp3 предотвращает формирование SASP-фенотипа в мозге при старении, подавляет фосфорилирование протеинкиназ метафламماسомного комплекса (PKR, IKK β , JNK) и экспрессию GSK3 β , оказывая выраженный протекторный эффект в отношении возраст-ассоциированных изменений.

4. Впервые показано, что фармакологическая блокада NLRP3 инфламмасы способствует улучшению когнитивной функции у стареющих животных, демонстрируя перспективу терапевтической коррекции возраст-ассоциированных когнитивных нарушений и нейропротекции.

Теоретическая значимость работы

Исследование расширяет понимание фундаментальных молекулярных и клеточных механизмов развития возрастной нейродегенерации, интегрируя когнитивные, поведенческие, воспалительные и метаболические аспекты. Полученные данные подтверждают ключевую роль NLRP3-инфламмасы в нейродегенеративных процессах и формируют фундамент для дальнейшего изучения нейроиммунной регуляции когнитивных функций, в том числе в контексте концепции воспалительного старения мозга («inflammaging»).

Практическая значимость

Результаты исследования обосновывают целесообразность применения ингибиторов NLRP3 для профилактики и терапии возраст-ассоциированных когнитивных нарушений. Полученные данные могут быть использованы в разработке стратегий фармакологического вмешательства при нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, а также при оценке эффективности нейропротективных подходов, направленных на поддержание функциональной пластичности и межклеточной коммуникации мозга в стареющем организме.

Методология и методы исследования

Работа имеет экспериментальный характер. Для решения задач исследования проведено поведенческое тестирование животных, иммуногистохимическое исследование срезов гиппокампа головного мозга, выделение и культивирование нейросфер, последующая дифференцировка их в астроциты и нейроны, иммуоцитохимический анализ клеточных культур, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, фазово-контрастная, флуоресцентная микроскопия, использованы методы качественной и количественной обработки данных. Достоверность полученных данных подтверждена методами математической статистики.

Положения, выносимые на защиту

1. У мышей с делецией гена *Nlrp3* выявлена устойчивость к возраст-зависимому снижению когнитивных и социальных функций: нокаутные животные сохраняют показатели сигнальной памяти и социального взаимодействия на уровне молодых особей, что указывает на ключевую роль NLRP3-инфламмосомы в развитии возрастных нейробиологических изменений.
2. NLRP3 инфламмосома является ключевым медиатором возраст-ассоциированных изменений: её активация сопровождается ростом экспрессии IL-18, HMGB1, провоспалительных киназ (PKR, IKK β , JNK), а её инаktivация приводит к сохранению поведенческих характеристик и снижению проявлений клеточной сенесценции.
3. Фармакологическая блокада инфламмосомы (глибенкламид, MCC950) воспроизводит эффекты генетической инаktivации NLRP3, снижая уровень воспалительных маркеров и ослабляя проявления сенесценции и метаболической дисрегуляции у зрелых и стареющих животных.
4. Воспаление, индуцированное LPS, сопровождается активацией NLRP3 инфламмосомы, повышением уровней IL-18, HMGB1 и JNK, а также изменениями в регуляции глюкозного транспорта (увеличение экспрессии GLUT4 при старении).

5. Возраст-ассоциированная активация NLRP3 инфламмасомы тесно связана с развитием клеточной сенесценции и признаками инсулинорезистентности в мозге, включая снижение экспрессии GLUT4 и повышение GSK3 β , что указывает на интегративный характер её действия в нейродегенеративных процессах.

Степень достоверности полученных результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным количеством экспериментов и использованием современных методов исследования. Численность исследуемой выборки соответствовала основным регламентам работы с лабораторными живыми объектами. Все эксперименты проводились с использованием современных методов исследований на высокотехнологичном оборудовании. Обработка и интерпретация данных осуществлялись с применением общепризнанных статистических методов анализа.

Личный вклад соискателя

Все основные этапы исследования выполнены лично автором. Автором самостоятельно выполнено иммуногистохимическое исследование срезов головного мозга животных для анализа экспрессии маркеров воспаления и сенесценции; осуществлено выделение и культивирование нейросфер, их последующая дифференцировка в астроциты и нейроны; проведён иммуноцитохимический анализ клеточных культур, флуоресцентная микроскопия, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени; при непосредственном участии проведено поведенческое тестирование животных. Автором также проведена качественная и количественная обработка данных, включая статистический анализ и интерпретацию полученных результатов.

Апробация работы

Основные результаты работы были доложены конференциях в виде устных и стендовых докладов: XXIV съезд физиологического общества им. И. П. Павлова, 2023, г. Санкт-Петербург; международная конференция «Социальный мозг: профилактика и реабилитация негативных стрессовых воздействий», 2023, г. Красноярск, конференция с международным участием RUSNEUROCHEM 2022, Санкт-Петербург.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК, 2 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе цитирования (Scopus).

Структура и объём диссертации

Диссертация оформлена в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р7.0.11-2011. Диссертация изложена на 181 страницах машинописного текста, включает в себя 57 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов. Список литературы содержит 265 источников, из них 14 на русском и 251 на иностранном языке.

Финансовая поддержка диссертации

Грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук «Метаболические механизмы нейровоспаления как мишень для профилактики и терапии возраст-ассоциированной когнитивной дисфункции» (МД-2368.2022.3, 2022-2023 гг.);

Грант на проведение крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития № 075-15-2024-638 «Возраст-

зависимые заболевания мозга: разработка новых моделей и создание передовых медицинских нейротехнологий» (2024-2025 гг.).

Благодарности

Автор выражает благодарность коллективу НИИ молекулярной медицины и патобиохимии (ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, руководитель – д.м.н., Шуваев А.Н.) за помощь в организации и проведении экспериментов, подготовке рукописей к публикации, а также за помощь в подготовке и обсуждении диссертации.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Старение и нейродегенерация: общие механизмы

1.1.1. Современные представления о старении ЦНС

В последние десятилетия наблюдается стойкое увеличение продолжительности жизни людей, сопровождающееся общей тенденцией к старению населения [62]. Ожидается, что к 2050 г. количество людей в возрасте старше 65 лет превысит 1,5 млрд. [257]. Вместе с тем с увеличением общей продолжительности жизни неизбежно возрастает и доля возраст-ассоциированных заболеваний, в том числе нейродегенеративных, что оказывает значительное негативное влияние на качество жизни людей и представляет собой серьезную проблему для системы здравоохранения [180].

Старение представляет собой сложный и непрерывный биологический процесс, свойственный всем живым организмам. Он обусловлен взаимодействием генетических и эпигенетических механизмов, а также воздействием внешнесредовых факторов. В ходе старения происходят системные изменения, затрагивающие молекулярный, клеточный и тканевой уровни организации организма, скорость старения определяется соотношением химических, физиологических и патофизиологических процессов повреждения с одной стороны и процессов репарации - с другой [8, 114]. Люди с одинаковым хронологическим возрастом могут демонстрировать разную скорость и разные фенотипы старения, что обусловлено сложным взаимодействием генетических факторов, эпигенетических изменений, образа жизни, питания, окружающей среды и многих других [13].

В процессе нормального старения человеческий мозг подвергается структурным изменениям, характеризующимся снижением объема как серого, так и белого вещества и компенсаторным расширением желудочков [57]. Данные МРТ-исследований указывают на то, что наиболее выраженная возрастная

атрофия серого вещества наблюдается в лобной и височной долях [91]. Согласно гистологическим анализам, в основе атрофии лежат процессы дендритной регрессии, потери нейронов, уменьшения объема тел нейронов [30, 60]. Скорость данной атрофии является значимым предиктором последующего развития когнитивных нарушений и деменции. Несмотря на существенную вариабельность скорости атрофии при старении, на основе данных нейровизуализации предлагается определять биологический возраст мозга [91]. Важно отметить, что на динамику структурных изменений мозга могут влиять факторы окружающей среды. Так, аэробные физические нагрузки ассоциируются с увеличением объема гиппокампа [63], в то время как ожирение и избыточное потребление калорий, напротив, ускоряют его атрофию [42]. В исследованиях на животных моделях было показано, что ограничение калорийности питания и прерывистое голодание замедляют структурное и функциональное старение мозга [239].

Мозг демонстрирует высокую уязвимость к возрастным изменениям, что находит отражение в прогрессирующих структурных и когнитивных нарушениях [79]. Возрастное снижение когнитивных функций характеризуется естественным и прогрессирующим ухудшением эпизодической памяти, способности к обучению, скорости обработки информации, сенсорного восприятия и моторной координации [148]. Несмотря на то, что часть популяции сохраняет высокую когнитивную сохранность и следует траектории здорового старения, у значительного числа людей развиваются клинически выраженные нейродегенеративные заболевания. Следует отметить, что субклинические нейродегенеративные изменения широко распространены среди пожилых людей, однако индивидуальный риск реализации той или иной патологической траектории старения зависит от сложного взаимодействия генетической предрасположенности и факторов внешней среды [242].

1.1.2. Концепция «*hallmarks of aging*» применительно к мозгу

Концепция «признаков старения» (*hallmarks of aging*), предложенная López-Otín et al. в 2013 году [136] и обновленная в 2023 году [137], представляет собой описание сложных биологических процессов, лежащих в основе старения организма, такие как развитие митохондриальной дисфункции, окислительный стресс, нарушение функций лизосом и протеасом, нарушение регуляции метаболизма и межклеточной коммуникации, нарушение адаптивного ответа на стресс, аберрантная активность нейронной сети, нарушение репарации ДНК, истощение пула стволовых клеток, клеточное старение, хроническое воспаление.

Головной мозг является особенно уязвимым органом при развитии возрастных изменений, в связи с его сложностью, высокими энергетическими потребностями и ограниченной регенеративной способностью. Будучи высокоэнергозатратным органом, мозг особенно зависит от функционирования митохондрий [149]. Также митохондрии играют важную роль в клеточном гомеостазе Ca^{2+} и в качестве источника сигналов, регулирующих транскрипцию ядерных генов [184]. Более того, образование переходных пор проницаемости митохондриальных мембран (mPTP) является ключевым событием в апоптозе, форме запрограммированной гибели клеток, которая обычно происходит во время развития мозга и патологически при ряде нейродегенеративных состояний [147]. Многочисленные исследования свидетельствуют о прогрессирующем нарушении митохондриальных функций в процессе старения мозга. К числу ключевых изменений относятся структурные перестройки, такие как увеличение размеров и фрагментация митохондриальной сети, а также накопление окислительных повреждений митохондриальной ДНК, нарушение работы комплексов электрон-транспортной цепи, увеличение доли митохондрий с деполяризованными мембранами, дисрегуляция кальциевого гомеостаза [181, 195]. Снижение функции митохондрий во время старения мозга связано со снижением внутриклеточного уровня NAD^+ и соотношения NAD^+/NADH [34]. Данное нарушение метаболического статуса, в свою очередь, негативно сказывается на активности

NAD⁺-зависимых ферментов, в частности, сиртуинов - семейства протеиндеацетилаз, играющих ключевую роль в поддержании нейронального гомеостаза и клеточной жизнеспособности [65].

Во время старения клетки головного мозга накапливают дисфункциональные белки и повреждённые митохондрии, что связано с окислительным дисбалансом - следствием повышенной генерации активных форм кислорода (АФК) и ослабления антиоксидантной защиты. Ключевыми АФК, продуцируемыми в нейронах, являются супероксид-анион, гидроксильный радикал и оксид азота. Окислительный стресс, в свою очередь, может вызывать активацию нейровоспалительных путей, вызывать повреждение сосудов и нарушать функцию протеасом и лизосом [261]. В частности, в процессе старения окислительный стресс индуцирует повреждение мембраносвязанных везикулярных АТФаз, что приводит к неспособности нейрональных лизосом поддерживать низкий уровень pH [44].

Согласно данным исследований, в нейронах при старении наблюдается аутофагическая и протеасомная деградация, проявляющаяся в внутриклеточном накоплении аутофагосом с неразложенным содержимым, дисфункциональными митохондриями и полиубиквитинированными белками [111]. Накопление и агрегация неправильно свернутых белков, нарушение протеостаза характерны для старения и способствуют прогрессирующей нейрональной дисфункции и нейродегенерации [64].

Из-за повышенных энергетических потребностей мозг особенно подвержен развитию метаболической дисфункции. Известно, что при старении нарушается метаболизм глюкозы и липидов, как на периферии, так и в головном мозге. При старении в головном мозге наблюдается снижение уровня транспортеров глюкозы, а также дисрегуляцией активности ферментов энергетического метаболизма [53]. Возраст-ассоциированная инсулинорезистентность, в свою очередь, связана с ухудшением когнитивных функций и может быть фактором риска развития болезни Альцгеймера [170, 226]. Дислипидемия, выражающаяся в повышении концентрации липопротеинов и триглицеридов низкой плотности в

крови, является фактором риска инсульта и сосудистой деменции, а также может увеличить риск развития болезни Альцгеймера [19].

Существенным фактором, способствующим ухудшению структуры и функции головного мозга в процессе старения, выступает клеточное старение. Клеточное старение (сенесценция) характеризуется комплексом изменений, включающих остановку клеточного цикла, изменения в морфологии, экспрессии генов, которое сопровождается развитием гиперсекреторного провоспалительного фенотипа, известного как секреторный фенотип, ассоциированный со старением (SASP – senescence-associated secretory phenotype) [78]. С возрастом происходит накопление сенесцентных клеток в тканях, в результате чего поддерживается хроническое воспаление за счет постоянного высвобождения ими провоспалительных медиаторов, хемокинов и протеаз. Эти факторы вносят существенный вклад в развитие хронического системного воспаления низкой степени интенсивности, характерного для старения, и создают патологическую среду, способствующую возникновению возраст-зависимых заболеваний и функциональных нарушений [72]. Стоит отметить, что нейроны головного мозга, в отличие от пролиферирующих клеток, пребывая в постмитотическом состоянии, не испытывают репликативного старения. Однако в них также может развиваться сенесцентный фенотип под воздействием повреждений ДНК [99]. Высокий уровень глюкозы или диета с высоким содержанием жиров также способствуют появлению в нейронах классических маркеров сенесцентных клеток, таких как ассоциированная с клеточным старением β -галактозидаза (SA- β -gal) [173]. Клеточное старение признается одним из ключевых механизмов, способствующих развитию и прогрессированию нейродегенеративных процессов с помощью ряда механизмов, включая воспаление опосредованное SASP, а также митохондриальную дисфункцию, окислительный стресс, нарушение белкового гомеостаза и нарушение барьерной функции [51, 74, 235].

1.2. Нейровоспаление и inflammaging

1.2.1. Хроническое низкоуровневое воспаление как фон старения

В 2000 году группа иммунологов под руководством С. Franceschi представила одну из современных теорий старения, известную как теория «inflammaging» (инфламмейджинг). Этот термин, обозначающий воспалительное старение, является сочетанием двух понятий: «воспаление» (inflammation) и «старение» (aging). Согласно данной теории, характерным проявлением старения считается хроническое воспаление низкой интенсивности, не сопровождающееся явными признаками инфекции, которое называют стерильным воспалением [70]. Провоспалительный фенотип, ассоциированный с процессом старения, характеризуется повышением в 2-4 раза концентрации в системном кровотоке широкого спектра медиаторов воспаления, таких как провоспалительные цитокины, факторы свертывания крови, простагландины, лейкотриены, белки острой фазы. Данное состояние формирует патологический фон, способствующий развитию широкого спектра возраст-ассоциированных заболеваний [9, 153].

Патогенез инфламмейджинг является многокомпонентным. Ключевым драйвером выступает постоянная активация врожденного иммунитета в ответ на кумулятивное накопление молекулярных повреждений. С возрастом в организме накапливаются поврежденные белки, липиды и фрагменты нуклеиновых кислот, которые распознаются иммунной системой в качестве паттернов молекулярных повреждений (DAMPs), что приводит к хронической стимуляции Toll-подобных рецепторов (TLR) и инфламмасом. Существенный вклад в поддержание провоспалительного статуса вносят сенесцентные клетки, секретирующие широкий спектр воспалительных медиаторов в рамках феномена SASP [2, 132].

Важную роль в поддержании инфламмейджинг играют возрастные изменения барьерных функций. Повышение проницаемости кишечного эпителия способствует транслокации микробных липополисахаридов (LPS) в системную циркуляцию, что потенцирует активацию иммунных клеток. Аналогичным

образом, дисфункция гематоэнцефалического барьера способствует проникновению провоспалительных факторов в паренхиму мозга. Дополнительным фактором выступает кишечный дисбиоз, характеризующийся снижением микробного разнообразия и увеличением провоспалительных таксонов, что усиливает периферическое воспаление [162].

С патофизиологической точки зрения, хроническое воспаление создает неблагоприятное микроокружение, нарушает тканевый гомеостаз и инициирует развитие функциональных нарушений органов. Инфламмейджинг тесно ассоциирован с патогенезом атеросклероза, инсулинорезистентности, нейродегенеративных заболеваний и злокачественных новообразований. Кроме того, персистирующая антигенная стимуляция приводит к истощению и функциональным нарушениям адаптивной иммунной системы, феномену, известному как иммуносенесценция [132].

Таким образом, инфламмейджинг представляет собой не просто маркер старения, а интегрирующий патогенетический механизм, связывающий молекулярно-клеточные повреждения с развитиемвозраст-зависимых патологий.

1.2.2. Роль PAMP и DAMP в активации TLR и NLR

На сегодняшний день рассматриваются различные источники и пути формирования «инфламмейджинг». Активация воспалительной реакции инициируется после идентификации рецепторами врожденной иммунной системы, в частности представителями TLR и NLR семейств, двух классов лигандов: патоген-ассоциированных (PAMP) и ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов (DAMP) [1]. К PAMP относятся экзогенные консервативные молекулярные структуры патогенов, такие как липополисахарид грамотрицательных бактерий, липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий или вирусная двуцепочечная РНК. В отличие от них, DAMP представляют собой эндогенные внутриклеточные компоненты, высвобождаемые в межклеточное пространство при повреждении, такие как АТФ, HMGB1,

митохондриальная ДНК и кристаллы мочевой кислоты [46, 225]. Первую линию защиты от таких угроз обеспечивают клетки врождённого иммунитета — нейтрофилы, моноциты и макрофаги. Они распознают PAMP и DAMP с помощью специализированных паттерн-распознающих рецепторов (PRR), включая Toll-подобные (TLR), NOD-подобные (NLR), RIG-I-подобные (RLR) рецепторы, а также и лектиновые рецепторы [86].

Активация PRR рецепторов запускает NF-κB-зависимый провоспалительный ответ, приводящий к синтезу цитокинов (TNF-α, IL-6, IL-1β) и хемокинов (IL-8, MCP-1). Особую роль в регуляции воспаления играют инфламмосомы — мультибелковые цитозольные комплексы, которые активируются в ответ на PAMP/DAMP, митохондриальный стресс (mtROS) и метаболические нарушения. Наибольшее внимание в исследованиях получила инфламмосома NLRP3 (NLR-семейство, пирин-домен-содержащий белок 3), способная запускать протеолитическое созревание интерлейкинов IL-1β и IL-18 посредством активации каспазы-1 [5, 186]. Зрелые формы этих цитокинов сигнализируют иммунной системе о наличии потенциальной угрозы и способствуют усилению провоспалительного ответа. В настоящее время значительная часть научных усилий направлена на расшифровку точных молекулярных механизмов, лежащих в основе активации NLRP3-зависимого воспаления.

1.2.3. Нейровоспаление как связующее звено между старением и нейродегенеративными заболеваниями

Особую значимость приобретает персистирующая активация TLR и NLR в контексте старения. Возрастное накопление клеточных повреждений и нарушение функций барьерных тканей приводит к повышенному высвобождению эндогенных DAMP и потенциально - к увеличению воздействия PAMP вследствие повышенной проницаемости барьеров. Это создает состояние хронического низкоуровневого системного воспаления, известного как инфламмейджинг [66,

265]. Хроническая стимуляция врожденного иммунитета через данные рецепторы вносит значительный вклад в патогенез возраст-ассоциированных заболеваний, включая нейродегенеративные патологии. Например, такие патогенные белки, как β -амилоид при болезни Альцгеймера или α -синуклеин при болезни Паркинсона, могут функционировать как DAMP, активируя TLR и NLR и усугубляя нейровоспаление и повреждение нейронов [109]. Сенесцентные микроглия и астроциты с возрастом приобретают секреторный фенотип SASP, характеризующийся гиперпродукцией провоспалительных факторов, что дополнительно усиливает нейровоспаление и создает токсичное микроокружение для нейронов [139].

В условиях физиологического старения нейровоспаление носит вялотекущий характер и развивается на фоне системного воспалительного фона, поддерживаемого периферическими возрастными изменениями. Однако при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Паркинсона или болезнь Альцгеймера этот процесс приобретает патологическую интенсивность. Активированная микроглия и астроциты претерпевают функциональные изменения, вырабатывая провоспалительные цитокины (TNF- α , IL-1 β , IL-6), хемокины и активные формы кислорода, которые нарушают нейрональный гомеостаз [205, 233]. Важно отметить, что нейровоспаление выполняет двойственную роль в патогенезе нейродегенерации. На начальных этапах оно может иметь протективную функцию, направленную на очистку тканей от патологических белковых агрегатов (β -амилоида, α -синуклеина) и восстановление повреждений. Однако хроническая активация приводит к дисрегуляции иммунного ответа, формированию порочного круга воспаления и нейродегенерации. Провоспалительные медиаторы напрямую ингибируют нейрогенез, нарушают синаптическую пластичность и индуцируют апоптоз нейронов. Кроме того, активированная микроглия теряет способность к эффективному фагоцитозу патологических белков, что способствует их дальнейшему накоплению [66, 109].

Таким образом, нейровоспаление выступает в качестве критического связующего звена, которое опосредует переход от физиологического старения мозга к клинически выраженным нейродегенеративным заболеваниям. Понимание молекулярных механизмов регуляции этого процесса открывает перспективы для разработки терапевтических стратегий, направленных на модуляцию иммунного ответа и замедление прогрессирования нейродегенерации.

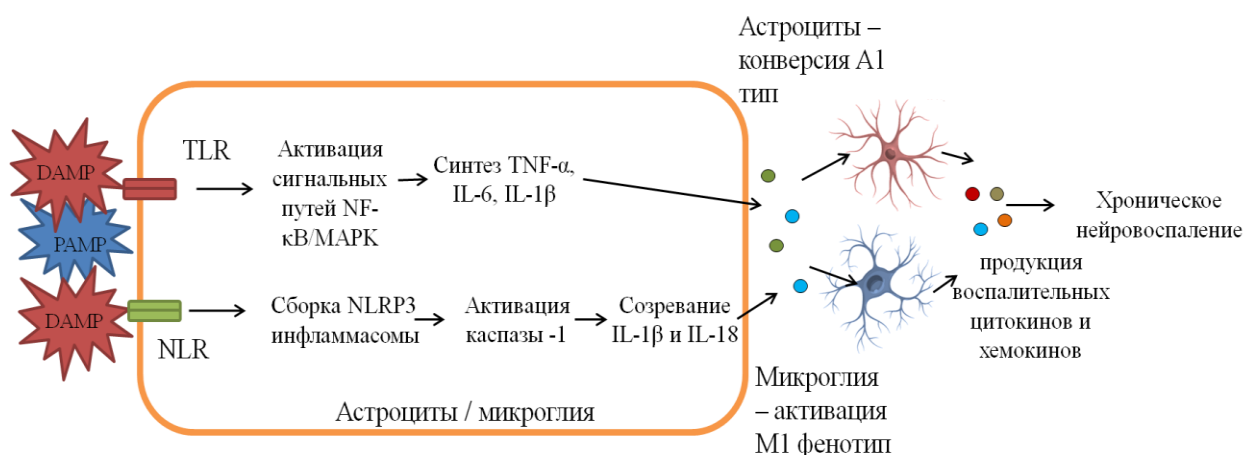


Рисунок 1 - Схема активации микроглии и астроцитов через PAMP/DAMP

1.3. Инфламмасомы и их роль в старении мозга

1.3.1. Семейство NLR, особенности активации инфламмасом

NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptors, NLR) представляют собой семейство внутриклеточных паттерн-распознающих рецепторов, играющих ключевую роль в регуляции врожденного иммунитета и воспалительных процессов. Наиболее изученным аспектом их функций является формирование мультибелковых сигнальных комплексов — инфламмасом, ответственных за активацию каспазы-1 и созревание провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-18 [8, 131].

Инфламмасома представляет собой мультибелковый олигомерный комплекс цитозольной локализации, который включает сенсорные белки (PRRs,

относящиеся к семействам NLR или ALR), выполняющие функцию рецепторов, адаптерный белок ASC, обеспечивающий сборку комплекса, и эффекторные каспазы, непосредственно запускающие каскад воспалительных реакций [250].

Семейство NLR инфламмасом классифицируется на пять структурно-функциональных подсемейств: NLRP, NLRA, NLRB, NLRC и NLRX. Белки семейства NLR характеризуются консервативной доменной организацией: Белки семейства NLR обладают высококонсервативной модульной структурой. Их центральный NACHT-домен (также известный как NOD) проявляет АТФ-азную активность и обеспечивает олигомеризацию молекулы. На N-конце располагается эффекторный домен — либо PYD (пирин-домен), характерный для подсемейства NLRP, либо CARD (домен активации и рекрутирования каспаз), присущий подсемейству NLRC. С-терминальная область представлена лейцин-богатыми повторами (LRR), которые участвуют как в распознавании лигандов, так и в поддержании аутоингибированного состояния белка в отсутствие стимула. [48].

Активация инфламмасом представляет собой многоступенчатый процесс. Первый сигнал, или прайминг, инициируется через активацию Toll-подобных рецепторов (TLR) и запускает каскад, ведущий к активации транскрипционного фактора NF-κB. Это, в свою очередь, стимулирует транскрипцию генов, кодирующих как компоненты инфламмасом (в частности, NLRP3), так и неактивные проформы провоспалительных цитокинов — pro-IL-1β и pro-IL-18. Далее инициирующий сигнал, представленный такими стимулами, как ионы калия и кальция, АФК, АТФ, катепсин В или различные кристаллы, запускает процесс сборки инфламмасомного комплекса. На первом этапе активированный NLR-белок (к примеру, NLRP3) олигомеризуется, используя для этого NACHT-домен. Далее происходит рекрутинг адаптерного белка ASC посредством PYD-PYD гомофильного взаимодействия. Завершающей стадией является опосредованное ASC привлечение прокаспазы-1 через CARD-CARD взаимодействия, что влечет за собой ее аутопротеолитическое расщепление в зрелую каспазу-1. Активированная каспаза-1 катализирует протеолитическую активацию проформ цитокинов, превращая их в зрелые биологически активные

формы IL-1 β и IL-18. и индукцию пироптоза путем активации гасдермина D [15, 97].

Стоит отметить, что ASC и прокаспаза-1 не требуют транскрипционной регуляции. Двухэтапный механизм активации выполняет важную регуляторную функцию, предотвращая неконтролируемое воспаление [110].

Семейство NLR и инфламмасомные комплексы формируют высокоспециализированную систему распознавания внутриклеточных сигналов опасности. Вместе с тем нарушение регуляции активации инфламмасом тесно связано с развитием ряда патологий, включая аутовоспалительные синдромы (например, периодические синдромы, ассоциированные с криопирином — CAPS), нейродегенеративные расстройства (такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона), а также метаболические заболевания (в частности подагру и сахарный диабет 2 типа), возраст-ассоциированные патологии. Детальная расшифровка молекулярных механизмов функционирования этих комплексов создает основу для разработки таргетных терапевтических стратегий при хронических воспалительных и возраст-ассоциированных заболеваниях [81, 207].

1.3.2. NLRP3-инфламмасома как ключевой механизм нейровоспаления

NLRP3-инфламмасома представляет собой мультибелковый олигомерный комплекс, играющий центральную роль в инициации и поддержании нейровоспалительных процессов. Ее активация в клетках центральной нервной системы, в частности в микроглии и астроцитах, признана критическим звеном в патогенезе широкого спектра нейродегенеративных заболеваний [14]. Инфламмасома NLRP3 считается наиболее исследованным и детально охарактеризованным представителем семейства инфламмасом. Ее структура включает сенсорный белок NLR, адапторную молекулу ASC (апоптоз-ассоциированный Speck-подобный белок, содержащий CARD-домен) и эффекторный компонент — прокаспазу-1, которая в активированной форме запускает созревание провоспалительных цитокинов [207].

Активация NLRP3-инфламмасомы в нервной ткани происходит в ответ на разнообразные PAMP и DAMP стимулы. В процессе старения различные экзогенные и эндогенные факторы способствуют повреждению теломер и митохондриальной ДНК, вызывая накопление мутаций и хромосомных перестроек. Известно, что повреждение ДНК активирует сигнальный путь NF- κ B, что приводит к транскрипционному праймированию белка NLRP3, а также pro-IL-1 β [82]. После праймирования NLRP3 второй стимул способствует сборке инфламмасомы и каспазы-1 запускает протеолитическое созревание проформ цитокинов — pro-IL-1 β и pro-IL-18, превращая их в биологически активные молекулы, а также активирует гасдермин D, который способен олигомеризоваться и формировать поры в плазматической мембране, что приводит к развитию пироптоза. Высвобождающиеся воспалительные цитокины с повреждённой ДНК дополнительно индуцируют инфламмейджинг, провоцируют дальнейшее повреждение ДНК, что способствует высвобождению большего количества цитокинов, поддерживая порочный круг, приводящий к возрастным заболеваниям [108, 177].

Дисфункция митохондрий, которая также является отличительной чертой старения, повышенная продукция оксидантов в митохондриях влияет на окислительное фосфорилирование, что может привести к некротической гибели клеток, утрате целостности плазматической мембраны и высвобождению митохондриального содержимого — в частности, ионов кальция, свободных гемовых групп, кардиолипина и митохондриальной ДНК (мтДНК) [256, 260]. Попадая в цитозоль или внеклеточное пространство, эти молекулы функционируют как эндогенные сигналы повреждения (DAMP), распознаваемые паттерн-распознающими рецепторами и способные запускать воспалительный ответ, в том числе через активацию инфламмасомы NLRP3 [199, 238].

Снижение активности протеасом и аутофагии в процессе старения также способствует активации NLRP3 инфламмасомы. Наряду со старением, накопление неправильно свёрнутых белков и повреждённых органелл приводит к нарушениям в различных биологических процессах; таким образом, оперативная

аутофагия необходима для минимизации последствий старения путем элиминации и переработки поврежденных или лишних клеточных компонентов, таких как неправильно свернутые белки и органеллы, включая митохондрии и эндоплазматический ретикулум [185]. Исследования показали, что трансгенная сверхэкспрессия гена *Atg5*, ключевого регулятора аутофагии, у мышей сопровождается увеличением продолжительности жизни по сравнению с контрольной группой. У таких животных также отмечалось улучшение ряда возраст-ассоциированных параметров, включая повышенную чувствительность к инсулину, сохранение мышечного тонуса и более стабильный окислительно-восстановительный баланс [182].

Известно, что митохондриально-генерируемые АФК способны активировать транскрипционный фактор NF-κB за счёт подавления сигнального каскада IKK/IκB, что приводит к хроническому праймированию инфламмосомы NLRP3 [157]. Было показано, что фармакологическая индукция аутофагии с помощью рапамицина — ингибитора mTOR (мишени рапамицина млекопитающих) — снижает активацию каспазы-1 благодаря эффективному удалению повреждённых митохондрий и АФК [117]. Снижение аутофагической активности, напротив, приводит к накоплению компонентов сигнального комплекса NF-κB, которые в норме деградируют посредством селективной аутофагии, что усиливает передачу сигнала через путь NF-κB. Помимо этого, аутофагия играет важную регуляторную роль в контроле воспаления: она способствует элиминации эндогенных DAMP и целенаправленной деградации компонентов инфламмосом, ограничивая их чрезмерную активацию [198]. Исследования демонстрируют, что нарушение аутофагии в макрофагах и дендритных клетках сопровождается усилением NLRP3-зависимой секреции провоспалительных цитокинов, в частности IL-1β и IL-18 [92].

Таким образом, NLRP3-инфламмосома выступает ключевым молекулярным интегратором, связывающим фундаментальные процессы старения - дисфункцию митохондрий, нарушение протеостаза и накопление повреждений ДНК - с развитием хронического нейровоспаления [10]. Ее активация инициирует

порочный круг: высвобождаемые цитокины и DAMP дополнительно усиливают окислительный стресс и повреждение клеточных структур, что приводит к прогрессирующей дисфункции нейронов.

1.3.3. IL-1 β , IL-18, каспаза-1: эффекторные звенья

Ось NLRP3/каспаза-1/IL-1 представляет собой фундаментальный сигнальный каскад врожденной иммунной системы и центральной нервной системы (ЦНС) [189]. Каспаза-1, играющая центральную роль в этом пути, демонстрирует повышенную активность при различных нейровоспалительных патологиях. Важнейшими эффекторными молекулами данной оси выступают интерлейкины IL-1 β и IL-18, которые вносят значительный вклад в развитие и поддержание нейровоспаления [4, 202].

Многочисленные исследования подтверждают повышенную концентрацию IL-1 β и IL-18 в спинномозговой жидкости, ткани головного мозга и периферической крови пациентов с нейроинфекциями, черепно-мозговыми травмами, болезнью Альцгеймера и рассеянным склерозом [83]. Связывание этих цитокинов со своими рецепторами на клетках микроглии, астроцитах, нейронах и эндотелиальных клетках инициирует сложный каскад внутриклеточных сигналов, приводящий к активации провоспалительных генов. Следует подчеркнуть, что активация данных цитокиновых сигнальных путей тесно связана с возникновением когнитивных дефицитов и формированием устойчивых психоневрологических нарушений [67].

Передача сигналов посредством IL-1 β играет ключевую роль в развитии и поддержании воспалительных реакций ЦНС в ответ на патогенные стимулы. Данный цитокин способствует нарушению целостности гематоэнцефалического барьера, облегчая инфильтрацию периферических иммунных клеток в паренхиму мозга. Активируя микроглию и астроциты, IL-1 β также потенцирует активацию Т-лимфоцитов, проникших в ЦНС, стимулируя продукцию провоспалительных факторов (IL-6, TNF- α) и нейротоксических медиаторов [166]. Кроме того, IL-1 β

опосредует хемотаксис лейкоцитов через индукцию экспрессии хемокинов, а экспериментальные данные свидетельствуют о его роли в эксайтотоксическом повреждении нейронов через модуляцию глутаматергической передачи [118].

В отличие от IL-1 β , IL-18 преимущественно модулирует Th1-опосредованные иммунные реакции, стимулируя продукцию молекул адгезии, провоспалительных цитокинов и хемокинов в NK-клетках, Th1-лимфоцитах и В-клетках. В клетках микроглии IL-18 индуцирует каскад сигнальных событий, приводящих к усиленной экспрессии каспазы-1, матриксных металлопротеиназ и провоспалительных цитокинов. Дополнительным патогенетическим механизмом является способность IL-18 усиливать экспрессию FasL в глиальных клетках, потенцируя Fas-опосредованную гибель нейронов в условиях нейровоспаления [31].

Особое значение в контексте активации NLRP3 инфламмасы приобретает пироптоз - высокоинфламаторная запрограммированная клеточная гибель, катализируемая каспазой-1 и отличающаяся от апоптоза и некроза. Современные исследования демонстрируют участие пироптоза в гибели как глиальных, так и нейрональных клеток [25]. Этот процесс характеризуется быстрой потерей целостности плазматической мембраны и массивным высвобождением провоспалительных медиаторов (TNF- α , IL-1 β , IL-6, CX3CL1), что усугубляет воспалительную гибель нейронов [115]. Важно подчеркнуть, что эти медиаторы способствуют рекрутингу иммунных клеток из периферического кровотока в очаги воспаления, усиливая повреждение ткани ЦНС при различных невропатологических состояниях [118].

Каспаза-1, IL-1 β и IL-18 образуют универсальный эффекторный модуль, преобразующий активацию различных инфламмасом в стандартизированный воспалительный ответ. Их скоординированная регуляция имеет критическое значение для поддержания иммунного гомеостаза, а дисбаланс в этой системе приводит к развитию хронического воспаления.

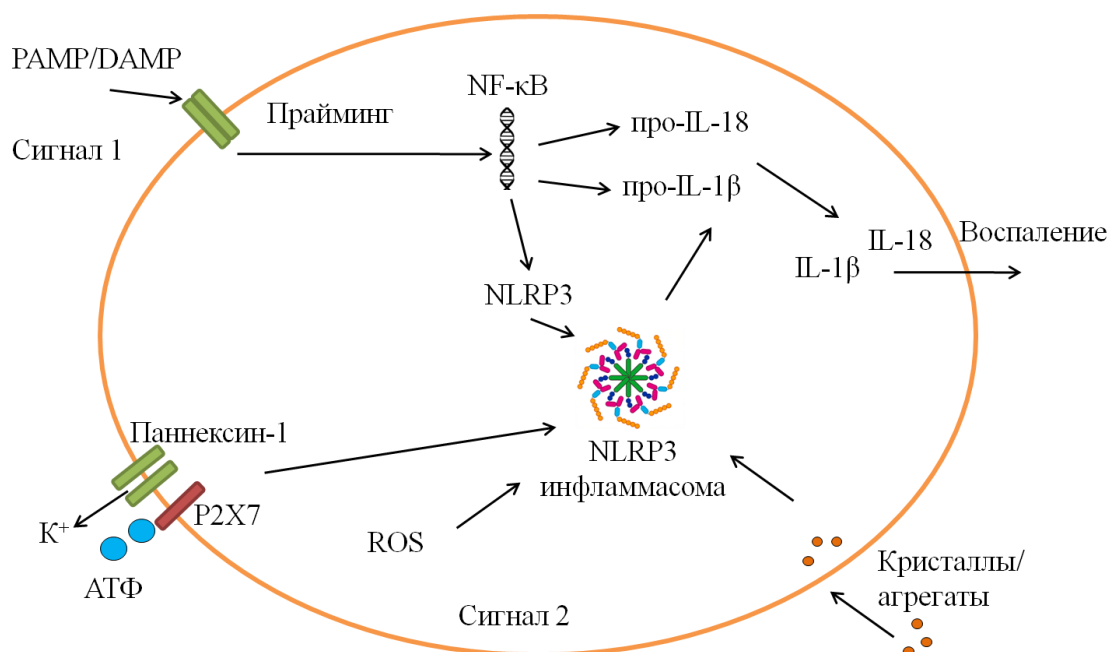


Рисунок 2 - схема сборки и активации NLRP3-инфламмасомы

1.4. Метаболические механизмы регуляции воспалительного ответа

1.4.1. Связь метаболизма и иммунных функций (*immunometabolism*)

В последние годы связь метаболизма и иммунных функций становится все более изучаемой, выявляя сложные взаимосвязи между метаболическими механизмами, регулирующими клеточные провоспалительные и противовоспалительные реакции. Т-лимфоциты, макрофаги и другие иммунокомпетентные клетки демонстрируют исключительную метаболическую пластичность, позволяющую им адаптироваться к динамически изменяющимся воспалительным условиям и поддерживать эффективный иммунный ответ. Критическое значение имеет способность этих клеток переключаться между различными метаболическими путями (гликолизмом, окислительным фосфорилированием (OXPHOS), метаболизмом аминокислот и жирных кислот) в ответ на изменения доступности питательных веществ и метаболические

изменения в микроокружении. Кроме того, эффекторные функции иммунных клеток могут меняться на протяжении иммунного ответа, тем самым создавая необходимость адаптации их метаболизма для поддержки изменяющейся клеточной активности. Фагоцитоз, миграция, пролиферация и/или высвобождение цитокинов из лейкоцитов требуют перепрограммирования баланса между гликолизом и OXPHOS [27].

Клетки микроглии в ЦНС обладают значительной гибкостью в использовании метаболических путей. Под влиянием воспалительных сигналов они способны динамически переключаться между различными источниками энергии – гликолизом, окислительным фосфорилированием (OXPHOS) и катаболизмом жирных кислот. При поляризации в провоспалительный M1-фенотип в клетках доминируют гликолиз и глутаминолиз. Напротив, противовоспалительный M2-фенотип поддерживается за счет активации OXPHOS и β -окисления липидов. Ключевые молекулярные механизмы метаболического перепрограммирования включают в себя повышение экспрессии GLUT1 и метаболических ферментов (гексокиназ, 6-фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бифосфатаза (PFKFB)) при активации, положительную регуляцию через mTOR и HIF-1 α , зависимость провоспалительных функций от гликолитического потока [106].

Метаболическое перепрограммирование не просто сопровождает, но и активно определяет функциональное состояние микроглии. Исследования показывают, что ингибирование гликолиза (посредством блокады GLUT1 или гексокиназ) подавляет провоспалительную активацию, что подтверждает причинную роль метаболических сдвигов в нейровоспалении. Возрастные изменения иммунометаболизма создают предпосылки для дисфункции микроглии при нейродегенеративных заболеваниях, делая метаболические пути перспективными терапевтическими мишенями [27].

Ещё одним ключевым фактором, который следует учитывать, является доступность глюкозы. Как при физиологическом, так и при патологическом старении, наблюдаются снижение церебрального кровотока и уменьшение

утилизации глюкозы [148], а также развитие метаболического дисбаланса на клеточном уровне [90]. Однако исследования показывают, что старение ассоциировано со смещением микроглии в сторону провоспалительного праймированного состояния, что сопровождается усилением гликолитической активности и повышением экспрессии ключевого регуляторного фермента PFKFB [151, 172].

1.4.2. Метафламация: взаимодействие энергетического статуса клетки и воспалительных сигналов

Механистическая мишень рапамицина (mTOR) и АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК) представляют собой эволюционно консервативные киназы, играющие ключевую роль в регуляции клеточного роста, метаболизма и энергетического баланса. Их активность интегрирует многочисленные сигналы, включая изменения уровня питательных веществ, энергетический статус клетки, гормональные влияния и различные формы стресса, такие как окислительный стресс, гипоксия и повреждение ДНК. В мозге передача сигналов АМРК и mTOR регулируется нейротрансмиттерами и сигналами нейротрофина.

В условиях дефицита энергии (истощения запасов АТФ и повышения уровня АМФ) Функционируя в качестве центрального сенсора энергетического статуса клетки, АМРК регулирует метаболические потоки, подавляя АТФ-затратные анаболические процессы (липогенез, синтез белков) и одновременно активируя АТФ-генерирующие катаболические пути, включая β -окисление жирных кислот и ОХРНOS [161]. АМРК способствует утилизации глюкозы посредством фосфорилирования Akt и других компонентов, необходимых для транслокации транспортера глюкозы 4 типа (GLUT4), и играет сложную роль в повышении чувствительности к инсулину. АМРК также стимулирует окисление жирных кислот, фосфорилируя и инактивируя ацетил-КоА-карбоксилазу, которая превращает ацетил-КоА в малонил-КоА, который является регулятором переключения между синтезом и окислением жирных кислот [100]. Инактивация

ацетил-КоА-карбоксилазы посредством AMPK приводит к увеличению транспорта жирных кислот в митохондрии и их окислению, которое поддерживает уровни НАДФН и GSH. Более того, AMPK активирует некоторые антиоксидантные гены (супероксиддисмутаза, разобщающий белок 2) путем активации фактора 2, связанного с ядерным фактором E2 (Nrf2), который является главным регулятором антиоксидантного ответа. AMPK также подавляет липогенез через ингибирование SREBP-1c [214].

Противовоспалительные эффекты AMPK опосредованы ингибированием NF-κB сигнального пути через активацию SIRT1, FOXO и PGC1α. Также AMPK способна фосфорилировать NLRP3 по серину 791, что препятствует его олигомеризации и сборке инфламмосомы. Дисрегуляция этого механизма наблюдается при инсулинорезистентности, где снижение активности AMPK ассоциировано с повышенной экспрессией провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF-α) [161].

Важнейшим аспектом регуляции является реципрокное взаимодействие между AMPK и mTOR. AMPK ингибирует активность mTORC1 через фосфорилирование комплекса TSC1/TSC2 и белка-раптора, что приводит к подавлению синтеза белка и активации аутофагии. Активация mTORC1 происходит с помощью питательных веществ и Akt, которые фосфорилируют TSC2 и ингибируют его. Пролонгированная активация mTORC1 в присутствии высокоэнергетической диеты ингибирует IRS через p70S6K, блокируя GLUTs внутри клеток, повышая уровень глюкозы в крови, что приводит к развитию сахарного диабета 2 типа [213]. Нарушение аутофагии, ключевым регулятором которой выступает комплекс mTORC1, считается одним из факторов развития ряда нейродегенеративных патологий, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона и боковой амиотрофический склероз. Кроме того, mTOR усиливает трансляцию провоспалительных цитокинов (pro-IL-1β) и способствует метаболическому перепрограммированию клетки на аэробный гликолиз, что создает провоспалительный метаболический фон (накопление сукцината, лактата), дополнительно праймируя NLRP3 [190].

Таким образом, взаимодействие сигнальных путей AMPK и mTOR выступает в качестве ключевого механизма метаболической адаптации. Расстройство этого перекрестного регулирования играет ключевую роль в развитии нейродегенеративных заболеваний, метаболического синдрома и ряда возраст-ассоциированных патологий.

1.4.3. Метаболические инфламмасомы («метафламмасомы»): компоненты, их активация в мозге

Метаболические инфламмасомы («метафламмасомы») представляют собой специфические сигнальные комплексы, активируемые при метаболическом дисбалансе. Их формирование опосредует развитие хронического системного воспаления, лежащего в основе развития метаболических нарушений, в частности ожирения и инсулинорезистентности. Метафламмасомы преимущественно реагируют на эндогенные сигналы опасности (DAMPs), генерируемые в условиях метаболического стресса [101, 102, 127]. В структуру метафламмасомного комплекса входят фосфорилированные формы ключевых сигнальных молекул — IKK β (ингибитор каппа-B киназы), JNK (с-Jun N-терминальная киназа), PKR (двухцепочечная РНК-зависимая протеинкиназа), а также адапторный белок IRS1 (субстрат инсулинового рецептора 1). Наличие и активация этих компонентов подтверждены в том числе в ЦНС [219]. Инициацию провоспалительных каскадов способны вызывать как внеклеточные триггеры (цитокины (TNF- α , IL-6), насыщенные жирные кислоты, LPS), так и внутриклеточные триггеры (стресс эндоплазматического ретикулума, митохондриальная дисфункция, избыток липидов).

Активированные киназы JNK, IKK β , PKR фосфорилируют IRS-1 по сериновым остаткам (Ser307, Ser312), что нарушает его взаимодействие с инсулиновым рецептором и подавляет сигнальный путь PI3K/Akt. Параллельно эти киназы активируют транскрипционные факторы NF- κ B и AP-1, что приводит к усилению экспрессии провоспалительных генов (TNF- α , IL-6, IL-1 β), индукции

The diagram illustrates the insulin signaling pathway and its downstream effects. At the top, 'глюкоза' (glucose) leads to the 'инсулиновый рецептор' (insulin receptor). This activates 'IRS1' (phosphorylated), which then activates 'PI3K' (phosphorylated), leading to 'Akt' (phosphorylated) and 'mTOR' (phosphorylated). A red dashed line indicates that mTOR inhibits IRS1. From mTOR, the pathway branches into several outcomes: 1) 'аутофагия' (autophagy) leading to 'агрегация белков' (protein aggregation); 2) 'синтез белков' (protein synthesis); 3) 'NF-κB' leading to 'праймирование NLRP3' (NLRP3 priming); 4) 'HIF-1' leading to '↑ гликолиз' (increased glycolysis), which results in 'провоспалительная активация (M2-фенотип)' (pro-inflammatory activation, M2 phenotype). Additionally, 'AMPK' is activated by '↑ AMP/АТР, физическая активность' (increased AMP/ATP, physical activity). AMPK inhibits mTOR (indicated by a red T-bar) and promotes 'ацетил-КоА-карбоксилаза' (acetyl-CoA carboxylase), which leads to '↓ малонил-КоА' (decreased malonyl-CoA), resulting in 'β-окисление жирных кислот' (fatty acid β-oxidation) and 'противовоспалительная активация (M1-фенотип)' (anti-inflammatory activation, M1 phenotype). AMPK also promotes 'NLRP3 P-Ser791', which leads to '↓ воспаление' (decreased inflammation).

Рисунок 3 - Схема пересечения метаболизма и воспаления

1.5. Инсулиновая сигнализация и мозг

1.5.1. Церебральная инсулинорезистентность: механизмы и последствия

Церебральная инсулинорезистентность представляет собой состояние нарушения физиологического ответа клеток центральной нервной системы на действие инсулина, характеризующееся системной дисрегуляцией инсулиновых сигнальных путей. Данный патологический феномен признан ключевым интегрирующим звеном между метаболическими нарушениями и нейродегенеративными процессами. В основе развития инсулинорезистентности лежит каскад взаимосвязанных молекулярных нарушений. Первичным звеном может выступать дисфункция инсулиновых рецепторов, проявляющаяся

снижением их плотности на мембранах нейронов и глиальных клеток или нарушением их аффинности, а также нарушение пострецепторной сигнализации [11, 41].

Критическое значение в развитии церебральной инсулинорезистентности имеет изменение фосфорилиционного статуса субстратов инсулинового рецептора, в первую очередь IRS-1. Преобладание сериновой фосфорилиции над тирозиновой приводит к дезактивации IRS-1, нарушению его взаимодействия с инсулиновым рецептором и последующей блокировке передачи инсулинового сигнала. Этот механизм, в значительной степени, опосредуется активацией провоспалительных сигнальных путей, включая JNK и IKK β /NF- κ B, которые фосфорилируют IRS-1 по сериновым остаткам. В результате подавляется активация нисходящих компонентов инсулинового каскада, в частности PI3K/Akt, что способствует развитию метаболической дисфункции и формированию устойчивой инсулинорезистентности в головном мозге [32, 155].

Дополнительным важным патогенетическим фактором, способствующим развитию церебральной инсулинорезистентности, является митохондриальная дисфункция, характеризующаяся нарушением окислительного фосфорилирования, накоплением активных форм кислорода и снижением продукции АТФ [197]. Также значимость в патогенезе имеет конкурентное взаимодействие инсулина и β -амилоида (A β) за инсулин-деградирующий фермент (IDE, insulin-degrading enzyme), что приводит к параллельному накоплению как β -амилоидных пептидов, так и инсулина в межклеточном пространстве [36].

Инсулинорезистентность в центральной нервной системе инициирует каскад нейрометаболических нарушений, лежащих в основе когнитивной дисфункции. Ключевыми проявлениями являются снижение утилизации глюкозы нейронами, нарушение энергетического гомеостаза и дисфункция астроцитарно-нейронального метаболического взаимодействия, при котором нарушается обмен лактата и других энергетических субстратов, необходимых для поддержания синаптической активности. На синаптическом уровне инсулинорезистентность приводит к ослаблению механизмов долговременной потенциации (LTP) и

долговременной депрессии (LTD), снижению плотности дендритных шипиков и нарушению структурной и функциональной синаптической пластичности - фундаментальных процессов обучения и памяти [209]. Патологические последствия носят прогрессирующий характер и включают активацию проапоптотических сигнальных путей, накопление β -амилоида, что создает предпосылки для развития нейродегенерации [18, 73].

Церебральная инсулинорезистентность рассматривается как патофизиологическая основа широкого спектра неврологических и метаболических расстройств. Наиболее изучена её роль в патогенезе болезни Альцгеймера, которую в современной литературе всё чаще определяют как «диабет 3 типа» — состояние, при котором нарушение инсулинового сигналинга в мозге сочетается с характерными признаками нейродегенерации. Кроме того, церебральная инсулинорезистентность тесно ассоциирована с метаболическим синдромом, сахарным диабетом 2 типа и возрастным снижением когнитивных функций, подчёркивая важность метаболического контроля для поддержания здоровья центральной нервной системы [21].

1.5.2. IRS1, JNK, PKR, IKK β – молекулярные маркеры нарушенной сигнализации

Развитие инсулинорезистентности в условиях метаболического стресса и хронического воспаления опосредовано сложной сетью белковых взаимодействий, где центральными узлами выступают молекулы IRS1, JNK, PKR и IKK β . Эти белки образуют взаимосвязанную сигнальную сеть, способную интегрировать метаболические, воспалительные и клеточные стрессовые сигналы, что лежит в основе формирования инсулинорезистентности как в периферических тканях, так и в центральной нервной системе [24, 193].

IRS1 является центральным посредником передачи сигнала от инсулинового рецептора (IR) и рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) к внутриклеточным эффекторам, включая каскад PI3K/Akt,

регулирующий утилизацию глюкозы, синтез гликогена, выживание клеток и синаптическую пластичность. При патологических условиях, таких как хроническое воспаление, избыток свободных жирных кислот или окислительный стресс, происходит фосфорилирование IRS1 по остаткам серина, а не тирозина, что нарушает связывание с инсулиновым рецептором и способствует последующей деградации IRS1 через убиквитин-протеасомную систему. В результате ослабляется передача сигнала по пути PI3K/Akt, что рассматривается как один из центральных механизмов формирования инсулинорезистентности. [130].

Активация киназы JNK происходит под воздействием широкого спектра стрессовых факторов. К числу таких стимулов относятся провоспалительные медиаторы (такие как TNF- α и IL-1 β), окислительный стресс, нарушения функционирования эндоплазматического ретикулума, а также липотоксичность, вызванная избытком свободных жирных кислот. Активированная JNK фосфорилирует IRS1 по сериновым остаткам, тем самым усиливая инсулинорезистентность и формируя порочный круг взаимного усиления воспаления и метаболических нарушений [88]. Помимо этого, JNK участвует в регуляции апоптоза через фосфорилирование белков Bcl-2-семейства и c-Jun, а также модулирует процессы воспаления и клеточной дифференцировки [49].

PKR, изначально известная как компонент противовирусного иммунного ответа, в последние годы признана важным регулятором метаболической сигнализации. В условиях метаболического стресса PKR активируется независимо от вирусной инфекции, например, под действием насыщенных жирных кислот или стрессовых сигналов. Активированная PKR способна фосфорилировать IRS1 по сериновым остаткам, а также напрямую активировать JNK и IKK β , тем самым интегрируя стрессовые и воспалительные сигналы с нарушением инсулинового сигналинга. PKR вносит значительный вклад в контроль воспалительных реакций и апоптоза, активируя транскрипционный фактор NF- κ B и каспазы, что приводит к экспрессии широкого спектра провоспалительных цитокинов, включая TNF- α , IL-6 и IL-1 β . [167].

При активации IKK β фосфорилирует ингибитор I κ B, что приводит к его убиквитинированию и деградации, позволяя NF- κ B транслоцироваться в ядро и инициировать транскрипцию генов воспаления. Параллельно IKK β фосфорилирует IRS1 по сериновым остаткам, напрямую связывая воспалительную сигнализацию с нарушением инсулинового ответа [253].

Вместе эти четыре белка - IRS1, JNK, PKR и IKK β - образуют взаимосвязанную сигнальную сеть, в которой активация одного компонента может инициировать каскад патологических изменений, приводящих к таким состояниям, как ожирение, сахарный диабет 2 типа, болезнь Альцгеймера и возрастная когнитивная дисфункция [29].

1.5.3. Роль инсулинорезистентности в когнитивной дисфункции и ускоренном старении

Стабильность когнитивного резерва во многом определяется процессами нейрогенеза - образованием новых нейронов в нейрогенных нишах взрослого мозга, преимущественно в субгранулярной зоне и субвентрикулярной зоне гиппокампа. Эти процессы регулируются комплексом метаболических и трофических факторов, среди которых инсулин и инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) играют ключевую роль. При умеренных концентрациях инсулин проявляет нейротрофические свойства, способствуя развитию мозга, поддержанию функциональной активности нейрогенных ниш и модуляции возрастных изменений [210]. Сигнальный путь инсулин/IGF-1 активирует каскад PI3K/Akt, который регулирует выход нейробластов из состояния покоя, стимулирует пролиферацию, дифференцировку и выживание нейральных стволовых клеток. В условиях здорового метаболизма кратковременные повышения уровня инсулина могут улучшать когнитивные функции, особенно память и обучение. Однако при хронической гиперинсулинемии, характерной для инсулинорезистентности и сахарного диабета 2 типа, происходит десенсибилизация инсулиновых рецепторов, что приводит к снижению

эффективности сигналинга и утрате нейропротективных эффектов [171]. Более того, длительная активация пути инсулин/IGF-1 может способствовать преждевременному истощению пула стволовых клеток, нарушая долгосрочную способность мозга к самовосстановлению [210]. Таким образом, инсулин может оказывать как трофическое, так и патогенное влияние на нейрогенез - эффект, зависящий от концентрации, продолжительности воздействия и метаболического статуса организма.

Эти данные подтверждаются как экспериментальными, так и клиническими исследованиями: животные модели сахарного диабета 2 типа демонстрируют нарушения обучения и памяти, а у пациентов с этим заболеванием часто выявляются когнитивные дефициты, включая снижение исполнительных функций, скорости обработки информации и когнитивной гибкости [154, 264].

В последние годы всё чаще используется термин «диабет 3 типа» для описания болезни Альцгеймера, подчёркивая патогенетическую роль церебральной инсулинорезистентности в её развитии [7, 103]. При болезни Альцгеймера формируется патологическая петля обратной связи: инсулинорезистентность способствует аккумуляции A β и гиперфосфорилированного тау-белка, в то время как сам A β подавляет экспрессию инсулина в астроцитах, тем самым усугубляя метаболические нарушения. Эта взаимосвязь демонстрирует тесную интеграцию между нейродегенеративными процессами и дисфункцией инсулиновой сигнализации [210].

Глюкоза служит критически важным энергетическим субстратом для головного мозга, в связи с чем любые нарушения её метаболизма оказывают существенное влияние на когнитивные функции [3]. У пациентов пожилого возраста с нарушением толерантности к глюкозе наблюдается уменьшение объема гиппокампа - ключевой структуры, ответственной за консолидацию памяти. Данные структурные изменения коррелируют со снижением показателей в когнитивных тестах [228]. Длительное повышение концентрации глюкозы в крови натощак и уровня гликозилированного гемоглобина ассоциировано с

прогрессирующим когнитивным дефицитом, который проявляется преимущественно в виде ухудшения памяти и способности к усвоению новой информации. Согласно данным нейровизуализации наиболее значительное снижение утилизации глюкозы головным мозгом наблюдается в проекции лобных, теменных и височных долей [228]. Однако современные данные указывают на более сложную динамику: на ранних стадиях нейродегенеративных процессов может наблюдаться компенсаторный гиперметаболизм глюкозы, отражающий активацию нейронных сетей в ответ на стресс или повреждение, этот временный всплеск метаболической активности сменяется прогрессирующим гипометаболизмом по мере истощения компенсаторных механизмов [170].

На фоне снижения утилизации глюкозы мозг может переходить к использованию альтернативных источников энергии. В астроцитах накапливается гликоген, расщепление которого сопровождается выделением лактата, доставляемого нейронам через монокарбоксилатные транспортёры (МСТ). Эта астроцитарно-нейрональная метаболическая связь играет ключевую роль в поддержании синаптической пластичности, обучении и формировании памяти [188].

При длительном дефиците глюкозы (например, при голодании или на кетогенной диете) кетоновые тела (ацетоацетат, β -гидроксибутират), образующиеся в печени из жирных кислот, становятся предпочтительным энергетическим субстратом для нейронов. Интересно, что метаболиты жирных кислот могут также модулировать воспаление, окислительный стресс и экспрессию нейротрофических факторов, что делает их потенциальной мишенью для диетических и фармакологических вмешательств при нейродегенеративных заболеваниях [247].

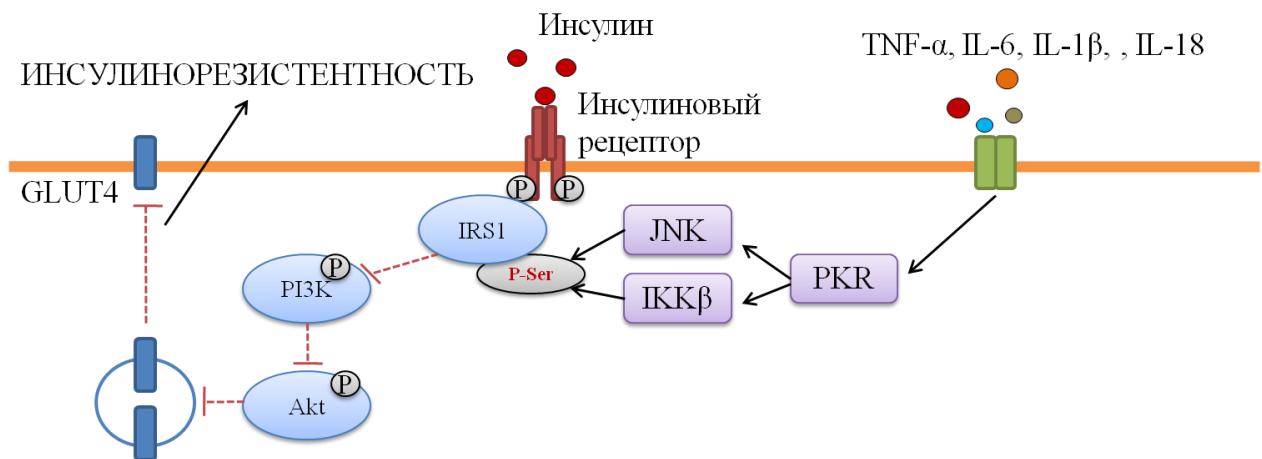


Рисунок 4 - Схема пути инсулиновой сигнализации и его нарушения при старении мозга

1.6. Молекулярные и клеточные механизмы когнитивной дисфункции

1.6.1. Нарушение нейропластичности

Нейропластичность представляет собой способность мозга адаптироваться к изменениям за счёт реорганизации нейронных сетей в ответ на внешние стимулы, обучение, опыт, травмы и патологические процессы. Она охватывает широкий спектр механизмов, включая модуляцию силы синаптических связей, образование и элиминацию синапсов, структурные и функциональные изменения нейронов, а также взрослый нейрогенез. Нейропластичность играет ключевую роль в поддержании когнитивных функций, включая обучение и память, а также в компенсаторных процессах после повреждений мозга и адаптации к изменяющейся среде [146].

Однако с возрастом наблюдается прогрессирующее снижение нейропластичности, что достоверно показано у пожилых людей и животных [160]. Эти изменения ограничивают способность мозга к самовосстановлению и компенсации возрастных или патологических повреждений, что способствует когнитивному ухудшению. В то же время, многочисленные исследования демонстрируют, что активные вмешательства, такие как обучение новым навыкам, когнитивная стимуляция и регулярные физические упражнения —

способны поддерживать или даже усиливать нейропластичность, замедляя когнитивное старение [138]. Эти данные указывают на потенциал терапевтических стратегий, направленных на модуляцию нейропластичности, для профилактики или замедления нейродегенерации.

Гиппокамп является одной из наиболее пластичных и уязвимых к старению структур мозга. Он критически важен для формирования эпизодической памяти и пространственной навигации, и его функциональная эффективность напрямую зависит от уровня синаптической и структурной пластичности. С возрастом в гиппокампе накапливаются множественные патологические изменения: повышенный окислительный стресс, хроническое нейровоспаление, дисрегуляция экспрессии генов, гормональный дисбаланс (включая снижение уровня нейротрофических факторов и половых гормонов) и нарушение энергетического метаболизма [28]. Эти факторы в совокупности приводят к снижению нейрогенеза и нарушению синаптической пластичности.

Особое значение имеет ослабление долговременной потенциации (LTP). Исследования показывают, что LTP в гиппокампе демонстрирует возрастзависимое снижение, причем выраженность этого нарушения напрямую связана с дефицитом памяти [20]. У стареющих крыс это нарушение ассоциировано также с пониженной экспрессией рецепторов эстрогена в гиппокампе, что подчёркивает роль гормональной регуляции в поддержании пластичности [208]. Кроме того, у пожилых животных выявлено снижение синаптической эффективности в путях от энторинальной коры к зубчатой извилине и уменьшение нейрональной возбудимости пирамидных нейронов в поле CA1 [17, 37].

Важно отметить, что модуляция молекулярных механизмов, лежащих в основе пластичности, может частично обратить возрастные дефекты. Например, усиление активности CREB (белка, связывающего элемент ответа циклического АМФ), ключевого регулятора экспрессии генов, связанных с памятью и выживанием нейронов, приводило к улучшению когнитивных функций у стареющих животных [252].

Помимо функциональных изменений, старение сопровождается выраженной структурной деградацией нейронных сетей. Наблюдается сокращение длины и ветвления дендритов, снижение плотности дендритных шипиков в гиппокампе и коре. Это напрямую связано с уменьшением синаптогенеза и общей синаптической плотности [52].

Взрослый нейрогенез также значительно снижается с возрастом. Число нейрональных стволовых клеток, способных к пролиферации, дифференцировке и интеграции в существующие сети, резко падает, а выживаемость новых нейронов уменьшается. Эксперименты на мышах показали, что это снижение влияет на когнитивные стратегии, включая гибкость обучения и пространственную память [77].

У человека данные нейровизуализации подтверждают эти находки: с возрастом наблюдается уменьшение объёма серого вещества и толщины коры, особенно в префронтальных и медиальных височных областях, включая гиппокамп [69]. Эти структурные изменения, вероятно, отражают потерю синапсов и нейронов, а также снижение нейропластических возможностей мозга.

1.6.2. Влияние глиальной дисфункции и сенесцентных клеток

Глиальные клетки играют ключевую роль в поддержании нейронального гомеостаза, обеспечивая метаболическую поддержку, модуляцию синапсов, клиренс белковых агрегатов и защиту от повреждений. Однако при хронических метаболических, окислительных или протеотоксических стрессах, сопутствующих старению, эти клетки приобретают дисфункциональные фенотипы, способствуя развитию нейровоспаления и нейродегенерации [203].

Известно, что в мозге с возрастом накапливаются сенесцентные клетки, которые способствуют индукции хронического нейровоспаления. Исследования показали, что астроциты, микроглия, олигодендроцитные предшественники и даже нейрональные клетки-предшественники могут демонстрировать клеточное старение и сенесцентный фенотип [183].

В ответ на травму, воспаление или развитие нейродегенерации астроциты активируются, вступая в состояние реактивного астроглиоза. Этот процесс включает гипертрофию, пролиферацию и увеличение экспрессии промежуточных филаментов, в первую очередь глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) [234]. Интересно, что повышенная экспрессия GFAP наблюдается не только при патологии, но и при нормальном старении, что указывает на хроническую активацию астроцитов с возрастом.

Кроме GFAP, с возрастом возрастает экспрессия другого промежуточного филамента - виментина, который традиционно ассоциируется с незрелыми и развивающимися астроцитами, что может свидетельствовать о частичной дедифференцировке или нарушении цитоскелетной организации в стареющем мозге [192].

Транскриптомные исследования выявили широкий спектр возрастных изменений в астроцитах, включая нарушение экспрессии генов, участвующих в цитоскелетной динамике, пролиферации, иммунном ответе, апоптозе и убиквитин-опосредованном протеолизе. Эти молекулярные сдвиги сопровождаются функциональной дисфункцией, включая снижение экспрессии транспортёров глутамата (GLT-1/EAAT2), что нарушает клиренс глутамата и повышает риск эксайтотоксичности; уменьшение контактов с синапсами, ведущее к ослаблению астроцитарно-нейронального взаимодействия; снижение метаболической поддержки нейронов, включая утилизацию глюкозы и доставку лактата [204].

В результате формируется провоспалительное и прооксидантное микроокружение, характеризующееся повышенным окислительным и протеолитическим стрессом, митохондриальной дисфункцией и нарушением синаптической пластичности. Особенно уязвим к этим изменениям гиппокамп - структура, критически важная для обучения и памяти. Дисфункция астроцитов в этой области напрямую связана с нарушением процессов консолидации и восстановления памяти у пожилых особей [174].

С возрастом микроглия также претерпевает значительные структурные, распределённые и функциональные изменения, которые свидетельствуют о переходе в дисрегулированное, гиперактивированное и частично дистрофическое состояние [212].

Дистрофическая микроглия широко распространена в стареющем человеческом мозге и особенно выражена при нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера и синдром Дауна. При этом она часто колокализуется с участками нейрофибриллярной дегенерации и амилоидными бляшками, что указывает на её патологическую интеграцию в очаги повреждения [215]. Функционально стареющая микроглия демонстрирует снижение подвижности и миграционной способности в ответ на очаговое повреждение, а также замедление динамики отростков, что ограничивает её способность к оперативному реагированию на повреждения тканей [240].

Более того, дистрофические формы микроглии проявляют устойчивую провоспалительную реакцию даже при минимальных стимулах, что может способствовать хроническому нейровоспалению и усугублять нейродегенерацию [124]. На молекулярном уровне стареющая микроглия характеризуется повышенной экспрессией провоспалительных медиаторов, включая цитокины IL-1 β , TNF- α и IL-6, как в *in situ* исследованиях, так и в *ex vivo* и *in vitro* моделях [240]. Эта сенесцентная фенотипическая поляризация способствует формированию воспалительного микроокружения в мозге, нарушая нейрональный гомеостаз и синаптическую пластичность.

1.6.3. Вклад митохондриальной дисфункции и окислительного стресса

Энергетический гомеостаз является фундаментальным условием для нормального функционирования мозга и поддержания когнитивных процессов. ЦНС чрезвычайно зависима от стабильного поступления АТФ, который в основном синтезируется в митохондриях путём окислительного фосфорилирования (OXPHOS). Нарушение этого процесса приводит к дефициту

энергии, что особенно критично для нейронов, обладающих высокими энергетическими потребностями сросом [22]. Одним из ключевых факторов, повреждающих митохондрии и нарушающих энергетический баланс, является окислительный стресс - состояние, возникающее при дисбалансе между образованием активных форм кислорода (ROS) и возможностями антиоксидантной системы по их нейтрализации. Митохондрии одновременно являются основным источником ROS (в частности, супероксид-аниона, образующегося при утечке электронов в дыхательной цепи) и их мишенью. Особенно уязвимы комплексы I и III электрон-транспортной цепи: при снижении их эффективности возрастает утечка электронов, что приводит к избыточному образованию ROS и инициирует порочный цикл повреждения [76].

Мозг особенно чувствителен к окислительному стрессу из-за высокого потребления кислорода, богатого липидами состава мембран (предрасполагающего к перекисному окислению липидов) и относительно слабой антиоксидантной защиты по сравнению с другими органами [191]. Когда продукция ROS превышает компенсаторные возможности антиоксидантных систем — таких как глутатион, супероксиддисмутаза и каталаза — это запускает каскад окислительного стресса. В результате происходит масштабное окисление белков, пероксидация липидов и повреждение нуклеиновых кислот, что ведёт к структурным и функциональным нарушениям в клетке, вплоть до некроза. Нарушение целостности клеточной мембраны сопровождается высвобождением митохондриального содержимого, включая ионы кальция, свободные гемовые группы, кардиолипин и мтДНК [256]. При высвобождении эти молекулы действуют как DAMP, которые воспринимаются рецепторами распознавания образов, инициируя воспалительный ответ, в том числе путем активации инфламасомы NLRP3 [238, 256].

Эти изменения оказывают прямое негативное влияние на функции ЦНС. Окислительный стресс нарушает синаптическую передачу, подавляет долговременную потенцию (LTP) и снижает нейронную пластичность, что

клинически проявляется когнитивным ухудшением и повышенным риском нейродегенеративных заболеваний [61].

Также установлена роль митохондрий в регуляции нейрогенеза. Митохондриальная динамика (слияние, деление, транспорт, митофагия) активно участвует в определении судьбы нейрональных стволовых клеток (НСК), включая их самообновление, пролиферацию и дифференцировку [112]. Исследования на мышинных моделях показали, что удаление ключевых митохондриальных белков (например, TFAM) в НСК приводит к потере самообновления НСК, aberrантной пролиферации, дефектам в выходе из клеточного цикла и дефектной дифференцировке нейронов. Эти нарушения сопровождались выраженными когнитивными дефектами, особенно в задачах, зависящих от гиппокампа (обучение, пространственная и эпизодическая память), а также двигательными и немоторными дисфункциями. Таким образом, митохондрии выступают не только как энергетические станции, но и как сигнальные органеллы, регулирующие судьбу стволовых клеток и, следовательно, структурную и функциональную целостность нейронных сетей [113].

1.7. Возможности модуляции NLRP3 и метаболических путей

1.7.1. Генетическая модуляция NLRP3-инфламماسомы: фенотипическая характеристика мышей с нокаутом гена *Nlrp3*

Генетически модифицированные мыши с нокаутом гена *Nlrp3* представляют собой фундаментальную модель для изучения роли инфламмасомного комплекса в патогенезе воспалительных, метаболических и нейродегенеративных заболеваний. Моделирование нокаута осуществляется методами CRISPR/Cas9 или гомологичной рекомбинации, что приводит к полному отсутствию функционального белка NLRP3 и нарушению формирования инфламмасомного комплекса [244].

Мыши с дефицитом NLRP3 демонстрируют комплексный защитный фенотип при различных патологических состояниях. В контексте системного воспаления наблюдается значительное снижение продукции IL-1 β и IL-18 в ответ на стандартные активаторы (LPS, АТФ, кристаллы мочевой кислоты) вследствие нарушения активации каспазы-1. Это обуславливает устойчивость к сепсису, индуцированному введением летальных доз LPS, что связано с подавлением цитокинового шторма [145].

В моделях метаболических нарушений *Nlrp3*^{-/-} мыши проявляют резистентность к развитию инсулинорезистентности и стеатоза печени при диете с высоким содержанием жиров. Механизмы защиты включают подавление воспаления в печени и жировой ткани, а также сохранение чувствительности к инсулину через модуляцию сигнального пути инсулин-PI3K-Akt [230].

При нейродегенеративных патологиях (например, на модели APP/PS1 мышей) нокаут *Nlrp3* ассоциирован со снижением нейровоспаления, уменьшением накопления А β -бляшек и сохранением когнитивных функций. Эти эффекты опосредованы подавлением активации микроглии и усилением синаптической пластичности [84].

В кардиоваскулярных моделях отмечается стабилизация атеросклеротических бляшек у мышей ApoE^{-/-} с нокаутом *Nlrp3*, что проявляется уменьшением размера бляшек и воспаления в стенке аорты [59]. Также демонстрируется снижение фиброза миокарда в условиях гипертензии вследствие подавления активации фибробластов [262]. Важно отметить, что у *Nlrp3*^{-/-} мышей сохраняется активность альтернативных инфламмасом (AIM2, NLRC4) и TLR-сигналинг, что подчеркивает специфичность наблюдаемых эффектов [107].

Данные, полученные на модели *Nlrp3*^{-/-} мышей, подтвердили обоснованность разработки селективных ингибиторов NLRP3 (таких как MCC950) для лечения широкого спектра заболеваний. Перспективные направления включают терапию аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит), метаболического синдрома и нейродегенеративных патологий [45].

1.7.2. Фармакологическая модуляция инфламмасом

Связь инфламмасы NLRP3 с широким спектром патологий — от метаболических нарушений до нейродегенеративных и аутоиммунных заболеваний — вызывает устойчивый интерес исследователей к разработке эффективных ингибиторов этого мультибелкового комплекса. Многоэтапный процесс активации NLRP3 инфламмасы открывает широкие возможности для направленного ингибирования на различных стадиях этого каскада. Стратегии подавления варьируются от блокировки иницирующих стимулов и препятствования сборке комплекса до ингибирования каспазы-1, предотвращения процессинга гасдермина D и нейтрализации конечных провоспалительных продуктов, таких как IL-1 β и IL-18 [254].

В ряду перспективных ингибиторов выделяется глибенкламид — представитель класса сульфонилмочевины, используемый в терапии сахарного диабета 2-го типа. Помимо основного гипогликемического эффекта, было обнаружено, что это соединение обладает значительной противовоспалительной активностью. Показана его способность ослаблять нейровоспаление и улучшать неврологический статус после повреждений ЦНС посредством подавления активации NLRP3 инфламмасы, уменьшение продукции провоспалительных медиаторов, а также ограничение рекрутирования иммунокомпетентных клеток в зону воспаления. Установлено, что механизм действия глибенкламида включает блокаду КАТР-каналов и Sur1-Trpm4-комплекса. Несмотря на обнадеживающие данные, противовоспалительные эффекты глибенкламида нуждаются в дальнейшем углубленном изучении [129].

Следует отметить, что для достижения ингибирующего эффекта на NLRP3 *in vivo* необходимы относительно высокие дозы глибенкламида, что неизбежно сопряжено с риском выраженной гипогликемии. Это существенно ограничивает его применение вне контекста диабетической терапии. Кроме того, остаётся неясным, связаны ли наблюдаемые противовоспалительные эффекты

глибенкламида с модуляцией экспрессии компонентов метафламмасомного комплекса [254].

β -Гидроксibuтират - одно из кетонных тел, которые образуются в ходе метаболизма жиров, во время голодания или кетогенной диеты, также сокращает отток K^+ , тем самым снижая олигомеризацию ASC и высвобождение IL-1 β и IL-18. Проведенные исследования показывают, что β -гидроксibuтират облегчает приступы подагры и симптомы и криопирин-ассоциированных периодических синдромов [251]. Недавние исследования также изучали противовоспалительные свойства β -гидроксibuтирата в моделях нейродегенеративных заболеваний, выявляя его потенциальные нейропротекторные эффекты [200, 241]. Хотя регуляция каналов Cl^- и Na^+/K^+ для подавления активации NLRP3 и продукции IL-1 β является многообещающей, разработка терапевтических средств, нацеленных на основные ионные каналы, требует тщательного баланса между противовоспалительной эффективностью и потенциальной цитотоксичностью [55].

Диметилфумарат способен модулировать mtROS, восходящий путь, связанный с активацией NLRP3, и был клинически одобрен для лечения псориаза и рассеянного склероза, при которых он уменьшает нейровоспаление, опосредованное NLRP3 [156]. Ингибитор моноаминоксидазы В-разагилин ингибирует выработку mtROS и активацию инфламмасы NLRP3 [194]. Метформин ингибирует активацию инфламмасы NLRP3, блокируя синтез мтДНК и высвобождение цитозольной окисленной мтДНК, тем самым уменьшая воспаление легких [243].

Несколько низкомолекулярных прямых ингибиторов NLRP3 в настоящее время находятся на стадии доклинической или ранней клинической разработки и предназначены для связывания с доменом NACHT и вмешательства в конформационные изменения или этапы олигомеризации, необходимые для сборки инфламмасы [231].

MCC950 (также известный как CP-456,773) представляет собой высокоспецифичный низкомолекулярный ингибитор NLRP3 инфламмасы,

демонстрирующий значительный терапевтический потенциал при различных патологических состояниях. MCC950, соединение, содержащее диарилсульфонилмочевину, впервые было идентифицировано как антагонист IL-1 β и классифицировано как антагонист высвобождения цитокинов [179]. Дальнейшие исследования показали, что MCC950 снижает созревание и высвобождение IL-1 β , ингибируя активацию инфламмосомы NLRP3 [45]. В настоящее время MCC950 считается специфическим низкомолекулярным ингибитором, селективно блокирующим активацию инфламмосомы NLRP3. Опубликованы результаты фармакологических исследований MCC950, и были продемонстрированы его терапевтические эффекты при аутоиммунных, сердечно-сосудистых, метаболических и других заболеваниях [134, 164, 258]. Экспериментальные исследования на животных моделях болезни Альцгеймера выявили нейропротекторное действие препарата MCC950, выражающееся в подавлении NLRP3-зависимого нейровоспаления, улучшении когнитивных функций, снижении патологической аутофагии путем селективной блокады активации NLRP3, ингибирования сборки инфламмосомного комплекса и снижения продукции IL-1 β и IL-18[165].

OLT1177 (дапансутрил) блокатор АТФазы NLRP3 с доказанной эффективностью против IL-1 β -зависимого воспаления при подагре, сердечной недостаточности и энцефаломиелите [140, 227, 231]. В доклинических исследованиях с использованием модели перитонита у мышей NP3-562, являясь селективным блокатором NACHT-домена NLRP3, существенно подавлял экспрессию IL-1 β [232]. Еще один ингибитор, CY-09, показал способность связываться с доменом NACHT и ингибировать активность АТФазы, что препятствует сборке инфламмосомы [95]. Доклинические исследования CY-09 показали его преимущества в моделях сахарного диабета 2 типа за счет улучшения резистентности к инсулину и сохранения функции бета-клеток поджелудочной железы, а также в моделях подагры за счет уменьшения воспаления, вызванного кристаллами уратов [95]. ZYIL1 (Usnoflast) является

селективным ингибитором инфламмасомы NLRP3, который, как было показано, улучшает симптомы в мышинной модели болезни Паркинсона [39].

В целом прямые ингибиторы NLRP3 обещают более широкое терапевтическое применение и потенциально меньше побочных эффектов, чем другие кандидаты, нацеленные на не прямые пути и/или регуляцию вышестоящего и нижестоящего звена комплекса инфламмасомы NLRP3. Однако для полного установления долгосрочной безопасности, эффективности и применения этих препаратов при заболеваниях человека необходимы надежные клинические данные [175].

1.7.3. Перспективы в коррекции возраст-ассоциированной когнитивной дисфункции

Возраст-ассоциированная когнитивная дисфункция представляет собой комплексное нарушение высших нервных функций, характеризующееся прогрессирующим снижением памяти, обучаемости, скорости обработки информации и исполнительного контроля. Эти изменения обусловлены множественными патогенетическими процессами, включая хроническое нейровоспаление, метаболическую дисфункцию, окислительный стресс и нарушение протеостаза. Современные терапевтические подходы направлены на модуляцию этих ключевых механизмов с целью замедления или обратного развития нейродегенеративных изменений [186].

Перспективным направлением является модуляция нейровоспалительных процессов с таргетингом на NLRP3 инфламмасому - ключевой компонент врожденного иммунитета, активирующийся при старении. Ингибиторы NLRP3 инфламмасомы демонстрируют способность подавлять активацию микроглии и снижать уровни провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 в мозге стареющих животных, о чем было подробно изложено выше [39, 95, 231]. Кроме того, антагонисты рецепторов P2X7 способны модулировать пуринергическую сигнализацию, участвующую в активации нейровоспалительных каскадов [68].

Также рассматривается возможность метаболической модуляции возраст-ассоциированных изменений, влияющих на когнитивные функции. Многие исследования направлены на изучение эффектов активаторов AMPK. Показано, что метформин улучшает чувствительность к инсулину и проявляет нейропротективные свойства через активацию аутофагии [229]. Ресвератрол также активирует AMPK и сиртуины, улучшая митохондриальную функцию [246].

Сообщается, что лираглутид и семаглутид, агонисты GLP-1, показывают нейропротективное действие через активацию AMPK и нормализацию метаболизма глюкозы [224]. Также нейропротекторный эффект и улучшение когнитивных функций были показаны при применении интраназального инсулина [133].

Окислительный стресс также играет ключевую роль в возрастном снижении когнитивных функций. Исследования антиоксидантов MitoQ и SkQ1 показывают, что они способны селективно накапливаться в митохондриях, уменьшать оксидативный стресс, подавлять перекисное окисление липидов, улучшать энергетический метаболизм, что позволяет также рассматривать данные препараты в роли кандидатов в профилактике и терапии когнитивных дисфункций и нейродегенеративных заболеваний [47].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В исследовании использовали самцов мышей линии C57BL/6, разделённых на три возрастные группы: молодые (4–5 месяцев, масса тела 25–30 г, $n = 15$), зрелые (14–15 месяцев, 25–30 г, $n = 25$) и стареющие (24–25 месяцев, 25–30 г, $n = 20$). Также были задействованы NLRP3-нокаутные мыши (линия B6.129S6-*Nlrp3*^{tm1Bhk/J}) в возрасте 4–5 месяцев ($n = 12$) и 14–15 месяцев ($n = 15$), с аналогичной массой тела (25–30 г). Часть экспериментов проводили *in vitro* на органотипических культурах гиппокампа и клеточных культурах астроцитов и нейронов.

Содержание животных осуществляли в условиях вивария. Мыши группами по 5–6 особей размещались в индивидуально вентилируемых клетках при постоянной температуре 21–22°C. Им был обеспечен свободный доступ к воде и стандартному гранулированному корму. Световой режим поддерживался в режиме 12-часового цикла (12 часов света/12 часов темноты), при этом все экспериментальные процедуры проводились в светлой фазе. Исследование проводилось в строгом соответствии с нормами биоэтики и принципами гуманного обращения с лабораторными животными, включая применение стратегий, направленных на минимизацию их страданий и сокращение численности (в соответствии с принципами «3R» — Replacement, Reduction, Refinement). Исследования выполняли после утверждения заявки на использование лабораторных животных на заседании локального этического комитета ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (выписка из протокола № 115/2022 от 28.11.2022 г.). Все процедуры, связанные с использованием животных, соответствовали требованиям законодательства Российской Федерации, положениям Базельской декларации, а также Директиве Европейского парламента и Совета ЕС 2010/63/EU по защите животных, используемых в научных целях.

2.2. Дизайн эксперимента и группы животных

Настоящее исследование состояло из четырех блоков:

Блок I. Исследование особенностей инсулиновой сигнализации, нейровоспаления и развития связанного со старением секреторного фенотипа клеток в головном мозге, оценка изменения когнитивных функций у мышей дикого типа и NLRP3-нокаутных мышей.

Блок II. Исследование эффектов фармакологической модуляции NLRP3-инфламмасом с использованием LPS.

Блок III. Исследование эффектов фармакологической модуляции NLRP3-инфламмасом с использованием неспецифического блокатора глибенкламида.

Блок IV. Исследование эффектов фармакологической модуляции NLRP3-инфламмасом с использованием специфического блокатора MCC950.

ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

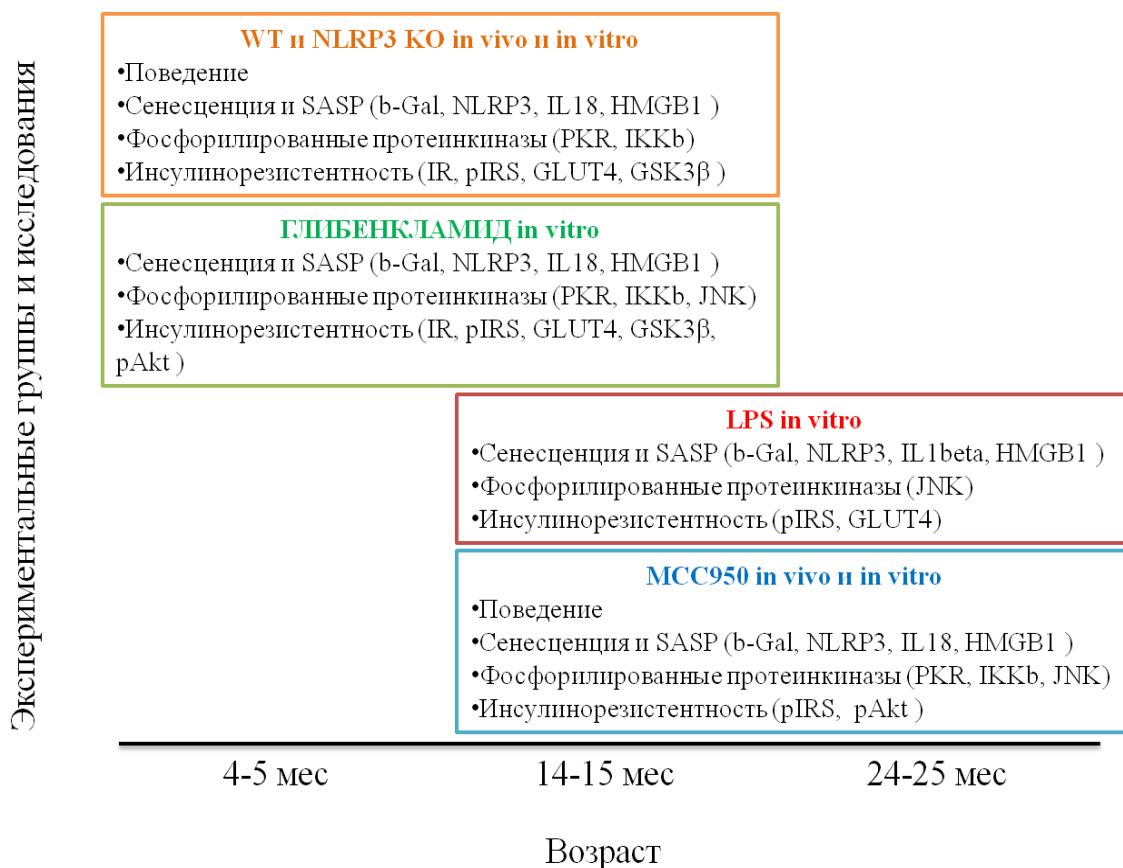


Рисунок 5 - Дизайн диссертационного исследования.

2.3. Исследования на животных

2.3.1. Фармакологическая модуляция инфламмасом

Введение блокатора MCC950 *in vivo* экспериментальным группам мышей (дикого типа C57Bl6 в возрасте 12 месяцев и 24-25 месяцев) проводилось интраперитонеально в дозировке 1 мг/кг в течение трех дней до исследования в тесте кондиционирования страха, затем за час до проведения теста с 1 по 3 день. В качестве контроля применялись животные, которым вводился DMSO (использованный для растворения MCC950) в те же сроки с целью минимизации влияния стресса и самого растворителя [263].

2.3.2. Поведенческое тестирование

2.3.2.1. Тест «Условно-рефлекторного замирания» (Fear conditioning)

Для проведения теста на условный страх (fear conditioning, FC) использовалась акриловая квадратная камера с решётчатым электрифицируемым полом, позволяющим подавать безусловный раздражитель (unconditioned stimulus, US) в виде кратковременного электрического тока. Условным раздражителем (conditioned stimulus, CS) служил аудиальный сигнал — белый шум (55 дБ). Камера размещалась внутри звуконепроницаемого бокса (Ugo Basile, Италия) [6]. Эксперимент проводился в соответствии с описанной методикой в течение трёх последовательных дней [201].

День 1: Этап формирования условного рефлекса (conditioning day).

Мышь помещали в незнакомую камеру и позволяли свободно исследовать её в течение 120 секунд. Затем трижды подавали пару стимулов: сначала в течение 30 секунд звучал белый шум (CS), а в последние 2 секунды этого периода одновременно с ним подавался слабый электрический ток (0,3 мА, US). Такая CS–US-пара предъявлялась на 120-й, 240-й и 360-й секунде от начала

сессии. Поведенческую реакцию — замирание (freezing) — регистрировали отдельно в четырёх временных интервалах: 0–120, 120–240, 240–360 и 360–480 секунд, что позволяло оценить динамику формирования ассоциативной памяти.

День 2: Тест на контекстуальный страх (context day).

Через 24 часа после этапа кондиционирования животное возвращали в ту же самую камеру, но без предъявления каких-либо стимулов (ни CS, ни US). Поведение мыши фиксировалось в течение 300 секунд. Продолжительность замирания в этом случае отражала сохранение памяти о контексте, связанном с негативным опытом.

День 3: Тест на вызванный стимулом страх (cued day).

На третий день тест проводился в модифицированной камере: изменялись цвет стен, текстура пола (гладкий, без решётки) и уровень освещённости (30 люкс), чтобы создать новый, нейтральный контекст. Сначала мышь в течение 180 секунд исследовала новую обстановку (этап оценки неспецифического контекстуального страха), после чего в течение следующих 180 секунд подавался только условный стимул — белый шум (CS) без электрического тока (US). Уровень замирания в этот период служил показателем приобретённого ассоциативного страха, специфичного к аудиальному сигналу.

Замирание (полное отсутствие движений, кроме дыхания) считается ключевым поведенческим маркером страха у грызунов и широко используется для количественной оценки памяти в тесте на условный страх [6, 159, 201]. Весь процесс тестирования фиксировался с помощью системы видеоанализа за животными ANY MAZE (Behavior Tracking Software, Stoelting, USA).

2.3.2.2.Трехкамерный тест (социализация)

Оценка социальности и социальных предпочтений у тестируемых мышей проводилась с использованием трехкамерного бокса, как описано ранее [121]. Этот аппарат состоит из трех соединенных между собой поликарбонатных камер с небольшими дверными проемами, обеспечивающими доступ в каждую секцию.

Количество животных, используемых для теста, составляло 6-8 особей на экспериментальную группу.

Тест состоял из трех этапов. Вначале проводился 5-минутный период привыкания, в течение которого подопытная мышь свободно исследовала все камеры. В последующей фазе социальности подопытной мыши предоставлялся выбор между новой особью, помещенной в цилиндр из металлических прутьев (для возможности контакта, но не возможности свободно перемещаться), и пустым аналогичным цилиндром. Оба цилиндра (пустой и с особью) находятся в двух отдельных камерах. Продолжительность времени, проведенного подопытной мышью в камере, с новой особью, по сравнению с камерой с новым объектом, регистрировалась в течение 10 минут с помощью видеозаписывающего оборудования и анализировалась с помощью программного обеспечения ANY MAZE.

После фазы социальности оценивалось предпочтение социальной новизны. Для этого экспериментальной мыши предлагалось выбрать между первоначально представленной мышью (незнакомец 1) и второй незнакомой мышью (незнакомец 2) в левой и правой камерах, соответственно. Подопытной мыши давали 10 минут на исследование камер и фиксировали время, проведенное в каждой из них. Предпочтение социальной новизны определяли по продолжительности времени, проведенного в камере с незнакомцем 2, по отношению к времени, проведенному в камере с незнакомцем 1.

Между каждыми экспериментальными испытаниями аппарат тщательно мыли и высушивали. Целью этих тестов была оценка социализации и предпочтения социальной новизны у мышей в стандартных условиях. Предпочтение к новой мыши рассчитывалось как $[(\text{время, проведенное за исследованием новой мыши}) / (\text{общее время, проведенное за исследованием новой мыши и нового объекта})] \times 100\%$; предпочтение к мыши-незнакомца 2 рассчитывалось как $[(\text{время, потраченное на изучение мыши-незнакомца 2}) / (\text{общее время, потраченное на изучение мыши-незнакомца 1 и мыши-незнакомца 2})] \times 100\%$.

2.3.3. Иммуногистохимия и конфокальная микроскопия

После достижения глубокой анестезии животных подвергали транскардиальной перфузии 4% параформальдегидом (PFA) в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (PBS; Sigma, США). Извлечённый мозг дополнительно фиксировали в том же 4 % PFA при 4 °C в течение ночи, после чего инкубировали 48 часов при 4 °C в 20 % растворе сахарозы в PBS (pH 7,4), содержащем 0,01 % азид натрия (Sigma, США). Сагиттальные срезы толщиной 50 мкм получали с помощью вибратома (Thermo Scientific) с ориентацией по стереотаксическому атласу для определения локализации гиппокампа. Свободно плавающие срезы мозга подвергали блокировке в течение 1 часа при комнатной температуре в PBS, содержащем 10% нормальной козьей сыворотки (Sigma), 2% альбумина бычьей сыворотки (BSA) (Sigma), 1% Triton X-100 (Sigma) и 0,1% азид натрия (Sigma).

Для иммуногистохимического окрашивания использовали первичные антитела в разведении 1:500: анти-GFAP (644702, Biolegend, США), анти-NeuN (ab134014, Abcam, Великобритания), анти-NLRP3 (ab51952, Abcam, Великобритания), анти-JNK (J4750, Sigma-Aldrich, США), анти-IRS1 (phosphor S312) (ab66154, Abcam, Великобритания), анти-IL18 (sc6177-4, Santa Cruz Biotechnology, США), анти-IKKbeta (ab178870, Abcam, Великобритания), анти-PKR (ab32506, Abcam, Великобритания). На следующий день после инкубации с антителами срезы промывали в PBS, а затем инкубировали с вторичными антителами в разведении 1:1000 в течение 2 ч при комнатной температуре. Были использованы вторичные антитела Alexa Fluor 555 (ab150078, Abcam, Великобритания), Alexa Fluor 488 (ab150117, Abcam, Великобритания). После инкубации срезы промывали в PBS и монтировали на предметные стекла с водной монтажной средой Fluoromount (Sigma), после чего закрывали покровным стеклом. Изображения получали с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа Olympus FV 10i с 60-кратным объективом и обрабатывали с помощью программного обеспечения Olympus FluoView

(Ver.4.0a) и программы ImageJ. Репрезентативные изображения гиппокампа в соответствии со стереотаксическим атласом Paxinos и Franklin [178] были взяты по крайней мере из двух срезов от семи мышей на группу.

2.3.4. Исследование сенесценции

Для оценки клеточной сенесценции использовали коммерческий набор Senescence Detection Kit (K320, BioVision, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Сагиттальные срезы гиппокампа толщиной 50 мкм фиксировали в специальном фиксирующем растворе (Fixative Solution) в течение 15 минут, после чего однократно промывали PBS. Затем срезы инкубировали в течение ночи при 37 °C в растворе для окрашивания (Staining Solution Mix). Появление характерной голубой окраски, свидетельствующей о сенесцентном фенотипе клеток, визуализировали с помощью светового микроскопа Olympus BX45. Полученные изображения анализировали в программном обеспечении ImageJ, при этом количественная оценка проводилась как минимум по пяти случайным полям зрения на каждый образец.

2.4. Исследование клеточных культур

2.4.1. Выделение и культивирование нейросфер

Выделение нейросфер осуществляли по описанному ранее протоколу [12]. Животных эвтаназировали методом декапитации, после чего проводили извлечение головного мозга. Извлечённый мозг немедленно помещали в охлаждённый до 4°C раствор PBS, содержащий 2% глюкозы (ПанЭко, Россия). Из мозга выделяли гиппокамп, который механически измельчали стерильным скальпелем до получения фрагментов объёмом приблизительно 1 мм³. Полученные кусочки переносили с помощью пастеровской пипетки в центрифужную пробирку с 2% глюкозой в PBS и выдерживали в течение 1

минуты для их осаждения. После удаления супернатанта к ткани добавляли 3 мл пролиферативной среды NeuroCult NS-A Proliferation (StemCell Technologies, США) и проводили механическую диссоциацию с помощью стерильной серологической пипетки до получения однородной клеточной суспензии. Суспензию центрифугировали при 150g в течение 5 минут, после чего супернатант удаляли и ресуспендировали клеточный осадок в 3 мл свежей среды NeuroCult NS-A Proliferation. Далее клеточную суспензию переносили в культуральные флаконы площадью 75 см² (T-75), содержащие 25 мл питательной среды NeuroCult NS-A Proliferation. Культивирование осуществляли в CO₂ -инкубаторе при 37 °C и 5% CO₂. Формирование нейросфер наблюдали через 48 часов после посева. Пассаж и замену среды проводили каждые 4–5 дней.

На третьем пассаже культуральную среду собирали из флакона, а нейросферы осаждали центрифугированием при 300g в течение 5 минут. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в дифференцировочной среде на основе DMEM (ПанЭко, Россия), дополненной 20 % фетальной бычьей сывороткой (FBS, HyClone, США), 0,58 мг/мл L-глутамина, а также 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все компоненты ПанЭко, Россия). Полученную клеточную суспензию засевали в культуральные флаконы площадью 75 см² (T-75).

В течение 5–7 дней в культуре происходила спонтанная дифференцировка нейросфер с формированием смешанной популяции астроцитов и нейронов. По истечении 10 дней дифференцированные клетки пассажировали и переносили в 24-луночные или 96-луночные планшеты для последующих экспериментальных исследований.

2.4.2. Фармакологическая модуляция инфламмасом

Фармакологическую модуляцию инфламмасом *in vitro* проводили с использованием двух ингибиторов. Непрямой ингибитор NLRP3-инфламмасы

глибенкламид вносили в культуральную среду в конечной концентрации 200 мкМ с последующей инкубацией в стандартных условиях (37 °C, 5% CO₂) в течение 1 часа. Специфический ингибитор NLRP3-инфламмосомы MCC950 добавляли в среду в конечной концентрации 1 мкМ и инкубировали в течение 6 часов в стандартных условиях (37 °C, 5% CO₂).

2.4.3. Исследование иммуносенесценции

Оценку клеточной сенесценции осуществляли с использованием коммерческого набора Senescence Detection Kit (K320, BioVision, США) в соответствии с инструкцией производителя. Клетки фиксировали в течение 15 минут с помощью Fixative Solution, после чего однократно промывали PBS. Затем к образцам добавляли Staining Solution Mix и инкубировали при 37°C в течение ночи. Появление характерной для сенесцентных клеток голубой окраски регистрировали визуально и оценивали спектрофотометрически при длине волны 620 нм с использованием планшетного спектрофотометра Anthos (Biochrom, Великобритания).

2.4.4. Иммуноцитохимическое окрашивание

Для регистрации целевых молекул-маркеров использовали метод двойного непрямого иммуноцитохимического окрашивания в соответствии с инструкцией фирм-изготовителей антител. Были использованы первичные антитела к NLRP3 (ab2307396, Abcam, Великобритания), IL18 (Santa Cruz Biotechnology, США), pIKK β (Abcam, Великобритания), PKR (ab32506, Abcam, Великобритания), IRS1 (phospho S312) (ab66154, Abcam, Великобритания), HMGB1 (ab77302, Abcam, Великобритания), JNK (J4750, Sigma, США), phospho Akt (AF0016, Affinity Bioscience, США).

Первичные антитела использовали в рабочем разведении 1:300. Длительность инкубации с первичными антителами составляла 18 часов при 4°C.

Вторичные антитела использовали в разведении 1:500, время инкубации составляло 2 часа при 37°C. Использовались антитела Alexa Fluor 555 (ab150078, Abcam, Великобритания), Alexa Fluor 488 (ab150117, Abcam, Великобритания).

Визуализацию клеток проводили с использованием флуоресцентного микроскопа ZOE (Bio-Rad, США). Количественный анализ включал подсчёт числа клеток, экспрессирующих целевой антиген, а также оценку интенсивности флуоресцентного сигнала соответствующих маркеров, выполненные с помощью программного обеспечения ImageJ.

2.5. Исследование органотипических культур гиппокампа

2.5.1. Получение органотипических культур гиппокампа

После эвтаназии лабораторных животных извлекали головной мозг, выделяли гиппокамп и готовили срезы толщиной 250 мкм с использованием тканевого чоппера (McIlwain Tissue Chopper, Ted Pella). Срезы помещали в 6-дуночные культуральные планшеты на культуральную вставку (Biorpore CM hydrophylized PTFE; Millipore) и инкубировали в среде DMEM с добавлением 25% FBS, 2 mM L-глутамин, 10000 ЕД/мл антибиотика-антимикотика при 37°C 5% CO₂.

2.5.2. Фармакологическая модуляция NLRP3 инфламмасом

Для создания модели индукции нейровоспаления *in vitro* использовали Lipopolysaccharide from Escherichia coli (LPS) в конечной концентрации 10 мкМ. Длительность воздействия составила 6 часов.

2.5.3. Исследование иммуносенесценции

Оценку иммуносенесценции выполняли с использованием коммерческого набора Senescence Detection Kit (K320, BioVision, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Органотипические срезы фиксировали в течение 15 минут с помощью Fixative Solution, после чего однократно промывали PBS. Образцы инкубировали в течение ночи при 37 °C в Staining Solution Mix. По завершению инкубации наблюдали появление голубой окраски клеток. Анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения ImageJ, при этом количественную оценку выполняли как минимум по пяти случайным полям зрения на каждый образец.

2.5.4. Иммуноцитохимический анализ

Идентификацию целевых маркеров проводили методом двойной непрямой иммуноцитохимии в соответствии с инструкциями фирм-производителя антител. Использовали первичные антитела к NLRP3 (ab270449, Abcam, Великобритания), IL1beta (sc-7884, Santa Cruz, США), IRS1 (phosphor S312) (ab66154, Abcam, Великобритания), HMGB1 (ab77302, Abcam, Великобритания), JNK (J4750, Sigma-Aldrich, США), GLUT4 (ab654, Abcam, Великобритания).

Органотипические срезы фиксировали 4% PFA в PBS в течение 30 минут, после чего проводили блокировку в PBS, содержащем 10% BSA и 1% Triton X-100 в течение 1 часа при 37°C.

Инкубацию с первичными антителами в разведении 1:300 проводили в течение 18 часов при 4°C. Вторичные антитела, меченные Alexa Fluor 555 (ab150078, Abcam, Великобритания), Alexa Fluor 488 (ab150117, Abcam, Великобритания), использовали в разведении 1:500, время инкубации составляло 2 часа при 37°C.

Визуализацию клеток проводили с использованием флуоресцентного микроскопа ZOE (Bio-Rad, США). На полученных изображениях оценивали

долю клеток, положительно экспрессирующих целевой антиген (в % от общего числа клеток) и интенсивность флуоресцентного сигнала исследуемых маркеров с помощью программного обеспечения ImageJ.

2.5.5. Проведение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Суммарную РНК выделяли из субрегионов мозга мыши с использованием реагента «РНК-Экстран» (НПФ Синтол, ЕХ-515, Россия) в соответствии со стандартным протоколом производителя. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора MMLV RT (Евроген, №SK021, Россия) при 40 °С в течение 1 ч. Полученную кДНК использовали для количественной ПЦР в реальном времени с применением набора qPCRmix-HS (Евроген, №PK145L, Россия). Для оценки количества фрагментов кДНК гена инсулина, а также референсных генов *Gapdh* и *Actb* использовали готовые коммерческие наборы («ДНК-Синтез», Россия), включающие два праймера и зонд, меченный флуорофором FAM. ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 96 (Roche); относительный количественный анализ экспрессии генов выполняли с помощью программного обеспечения LightCycler 96 Software. Результаты представлены в условных единицах (y.e.).

2.6. Статистический анализ

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с применением методов описательной статистики с использованием программного обеспечения GraphPad Prism7 (GraphPad Software, LaJolla, CA, USA). Для оценки нормальности распределения использовали Критерий Колмогорова-Смирнова. Для оценки влияния двух факторов применяли двухфакторный ANOVA (two-way ANOVA). Последующее попарное сравнение групп проводили с помощью Tukey's теста множественных сравнений. Уровень значимости при проверке

гипотез принимали $p \leq 0,05$. Все результаты представлены в виде $M \pm SE$, где M – среднее значение, SE – ошибка среднего, p – уровень значимости.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Изучение молекулярных механизмов метаболических нарушений и развития стареющего фенотипа клеток в головном мозге мышей дикого типа и мышей с делецией гена *Nlrp3*

3.1.1. Результаты поведенческого тестирования молодых и зрелых мышей дикого типа и мышей с делецией гена *Nlrp3*

Нокаутных мышей в возрасте 4-6 месяцев сравнивали с мышами в возрасте 12-14 месяцев. Контролем были мыши дикого типа соответствующие по возрасту. Все животные прошли тестирование локомоторной активности в установке «открытое поле». Сравнительный анализ показал отсутствие статистически значимых различий в общей дистанции, преодоленной в тесте "открытое поле", между контрольной группой и линией *Nlrp3*^{-/-}. Полученные данные свидетельствуют о сопоставимых показателях общей двигательной активности у всех животных, участвовавших в эксперименте. (Рисунок 6).

Однако у NLRP3-нокаутных мышей зрелого возраста зафиксировали статистически значимое увеличение времени, проведенного в центральной части арены ($42,95 \pm 6,845$ с) по сравнению с контрольными мышами соответствующего возраста ($17,05 \pm 4,157$ с) ($p=0,0120$, Tukey's multiple comparisons test). При двухфакторном дисперсионном анализе (Two-way ANOVA) было выявлено значимое влияние генотипа $F(1,18)=5,837$, $p=0,0265$. Время по периметру открытого поля не отличалось между группами.

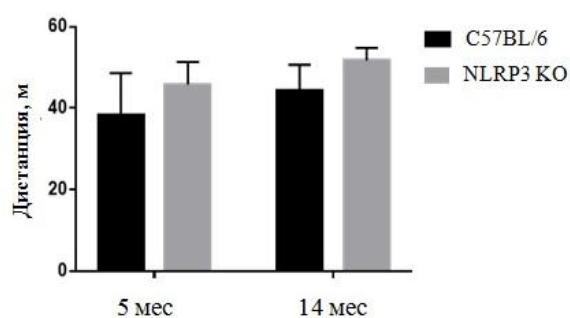
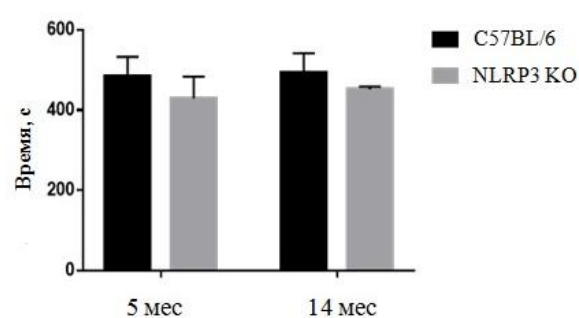
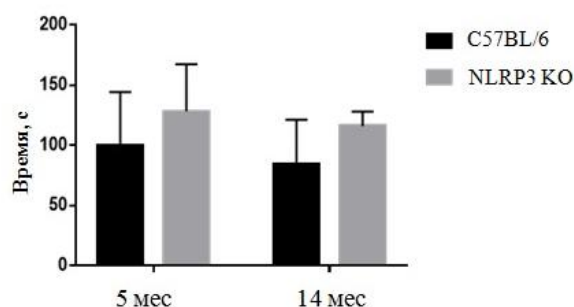
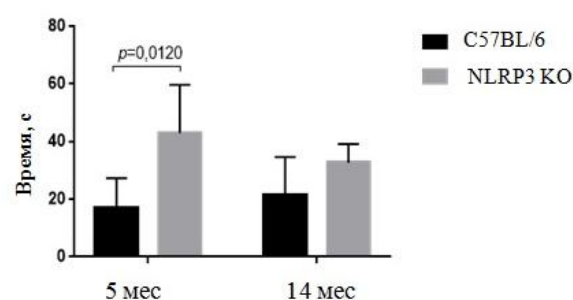
А**Б****В****Г**

Рисунок 6 - Первая сессия теста «Открытое поле». (А) – Пройденная дистанция, м; (Б) – Время, проведенное на периферии, с; (В) – Время в средней зоне, с; (Г) – Время в центральной зоне, с. C57BL/6 – контрольные мыши дикого типа; NLRP3 KO – нокаутные мыши по гену *Nlrp3*

В рамках тестирования реакции на новые несоциальные стимулы использовалась установка "открытое поле". Незнакомый неживой объект размещался в центральной точке, после чего фиксировалось время, затраченное на обследование объекта, общее время в центральной зоне и частота посещения зоны его расположения (Рисунок 7).

Интересным наблюдением было то, что дистанция, пройденная в арене при наличии объекта в центре, различалась между группами. А именно: зрелые мыши дикого типа проявляют значительно меньшую активность в открытом поле ($26,778 \pm 2,068$ м) по сравнению с нокаутными мышами того же возраста ($40,267 \pm 2,336$ м) ($p=0,0079$, Tukey's multiple comparisons test) и по сравнению с молодыми мышами дикого типа ($36,531 \pm 2,091$ м) ($p=0,0079$, Tukey's multiple comparisons test). При двухфакторном дисперсионном анализе (Two-way ANOVA) было выявлено значимое влияние генотипа $F(1,17)=6,342$, $p=0,0221$, а также

взаимодействия факторов (генотипа и возраста) $F(1,17)=9,987$, $p=0,0057$. Также контрольные зрелые мыши проводили больше времени по периферии ($383,620 \pm 66,169$ с), чем молодые мыши того же генотипа ($237,317 \pm 9,270$ с) ($p=0,0352$, Tukey's multiple comparisons test). Время в центральной части арены было также дольше у зрелых мышей при делеции *Nlrp3* гена ($290,725 \pm 10,802$ с) по сравнению с контрольными мышами соответствующего возраста ($160,060 \pm 46,458$ с) ($p=0,0207$, Tukey's multiple comparisons test). При анализе времени, проведенного в зоне с объектом выявлено значимое влияние генотипа $F(1,17)=8,237$, $p=0,0106$, а также фактора возраста $F(1,17)=6,58$, $p=0,0201$.

Животные контрольной группы молодого возраста значимо больше времени проводят с новым объектом ($123,333 \pm 18,123$ с) при сравнении с нокаутными мышами ($43,150 \pm 13,966$) ($p=0,0111$, Tukey's multiple comparisons test) и при сравнении с зрелыми мышами дикого типа ($48,380 \pm 20,858$) ($p=0,0248$, Tukey's multiple comparisons test). При этом также выявлено значимое влияние генотипа $F(1,17)=9,196$, $p=0,0075$. Таким образом, мыши контрольной группы молодого возраста более активны и проявляют интерес к несоциальному объекту. С возрастом эта активность снижается. Тем не менее у мышей нокаутного типа не было такой закономерности: отличий в разных возрастных группах не было. Такой фенотип может указывать на повышенную боязнь у *Nlrp3*^{-/-} мышей при сохраняющейся высокой двигательной активности.

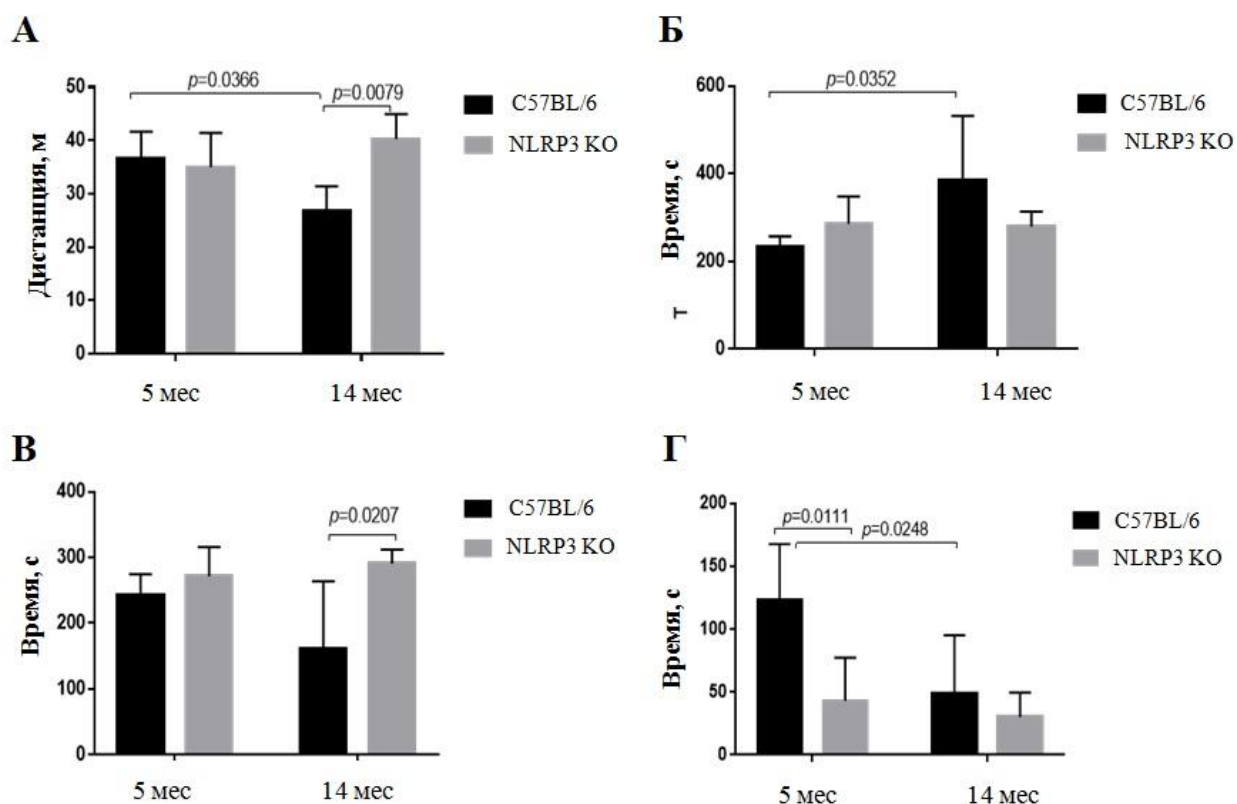


Рисунок 7 - Вторая сессия теста «Открытое поле» с несоциальным неодушевленным предметом в тесте. (А) – Пройденная дистанция, м; (Б) – Время, проведенное на периферии, с; (В) – Время в средней зоне, с; (Г) – Время в центральной зоне, с. C57BL/6 – контрольные мыши дикого типа; NLRP3 KO – нокаутные мыши по гену *Nlrp3*.

С целью анализа социального интереса в эксперименте использовали арену "открытого поля", куда в центральную зону помещали другую особь (социальный стимул). Анализ поведения выявил схожую тенденцию взаимодействия с живым объектом по сравнению с тестом, в котором использовался несоциальный объект. При старении мышей (дикий тип) общая дистанция в тесте сокращается ($17,29 \pm 0,893$) по сравнению с нокаутными мышами ($31,029 \pm 2,145$ м) ($p=0,0004$, Tukey's multiple comparisons test). Выявлено значимое влияние генотипа $F(1,17)=31,96$, $p<0,0001$, а также взаимодействия факторов (генотипа и возраста) $F(1,17)=5,512$, $p=0,0313$. Также с возрастом увеличивается у мышей дикого типа время, проведенное на периферии ($403,067 \pm 46,922$ м) по сравнению с молодыми мышами ($208,733 \pm 26,031$) ($p=0,0059$, Tukey's multiple comparisons test). Это может свидетельствовать о развитии тревожности и боязни социального объекта. Влияние фактора возраста достоверно $F(1,18)=15,39$, $p=0,0010$. Также отличалось

и время, проведенное с социальным объектом. При старении у мышей дикого типа время с другой особью значительно снижалось ($40,883 \pm 10,143$ с) в сравнении с молодыми мышами ($161,633 \pm 21,765$ с) ($p=0,0029$, Tukey's multiple comparisons test). Нокаутные мыши молодого возраста проводили меньше времени с объектом ($73,450 \pm 13,766$ с), чем мыши дикого типа ($161,633 \pm 21,765$ с) ($p=0,0001$, Tukey's multiple comparisons test) (Рисунок 8). Таким образом, мы можем предположить, что при старении у мышей наблюдается развитие тревожности и нарушение социальной активности, но при этом у мышей с делецией гена *Nlrp3*^{-/-} таких изменений выявлено не было.

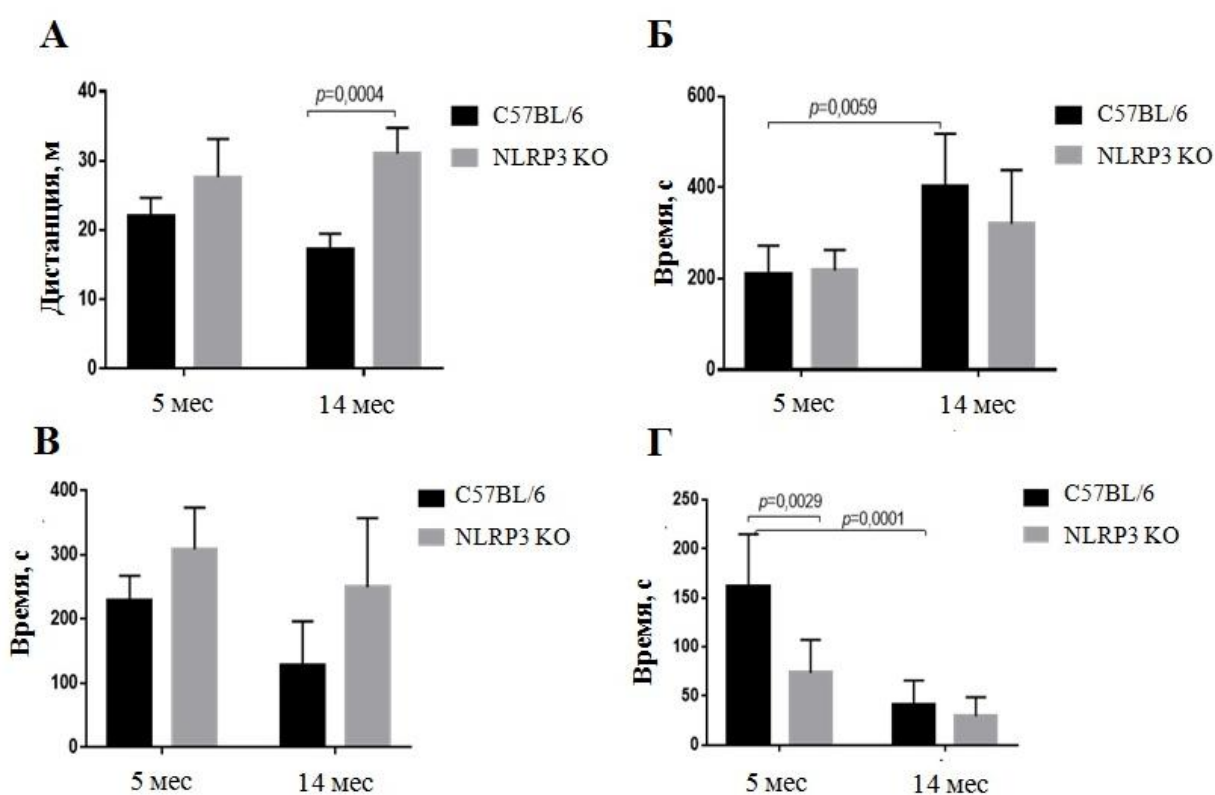


Рисунок 8 - Третья сессия теста «Открытое поле» с социальным живым объектом. (А) – Пройденная дистанция, м; (Б) – Время, проведенное на периферии, с; (В) – Время в средней зоне, с; (Г) – Время в центральной зоне, с. C57BL/6 – контрольные мыши дикого типа; NLRP3 KO – нокаутные мыши по гену *Nlrp3*.

Также мы изучили память страха в тесте кондиционирования страха у мышей исследуемых групп разного возраста. В первый день кондиционирования страха не было выявлено значимого влияния взаимодействия факторов ($F(9, 87) = 0,7239$, $p=0,6857$), а также фактора группы ($F(3, 29) = 1,909$, $p=0.1501$) при

сравнении мышей молодого возраста и зрелых особей. Значимое влияние фактора времени ($F(3, 87) = 112,9$, $p < 0,0001$) и соответствие объектов ($F(29, 87) = 3,844$, $p < 0,0001$) (Рисунок 9А).

На вторые сутки эксперимента в рамках оценки контекстной памяти был выполнен сравнительный анализ длительности замирания между четырьмя группами: молодыми и зрелыми мышами дикого типа, а также молодыми и зрелыми мышами с нокаутом гена *Nlrp3*. Статистический анализ зафиксировал статистически значимое влияние фактора возраста ($F(1, 26) = 8,17$, $p = 0,0083$), влияния фактора генотипа ($F(1, 26) = 0,04482$, $p = 0,8340$) и влияния взаимодействия двух факторов не было выявлено ($F(1, 26) = 0,8936$, $p = 0,3532$). Статистически значимые различия были отмечены между молодыми ($86,447 \pm 2,03$ процента) и стареющими ($65,206 \pm 5,153$ процента) мышами дикого типа ($p = 0,0492$, критерий Тьюки). Таким образом, у зрелых животных дикого типа замирания было сокращено. Данный феномен можно объяснить снижением способности распознавать контекстуальные сигналы как угрожающие, что отражает нарушение контекстно-зависимых механизмов памяти. Подтверждением этому служит отсутствие статистически значимых различий в продолжительности реакции замирания между разновозрастными группами *Nlrp3*^{-/-}. Этот факт позволяет предположить, что у данных линий мышей возрастной фактор не оказывает значимого влияния на формирование контекстуальной памяти (Рисунок 9Б).

На третий день тестирования (сигнальный) в новой среде выявлено статистически значимое влияние фактора группы ($F(3, 30) = 4,662$, $p = 0,0086$), а также фактора Тона ($F(3, 30) = 92,85$), $p < 0,0001$), и соответствие объектов ($F(30, 30) = 3,634$, $p = 0,0003$). Аналогично наблюдениям на вторые сутки было зафиксировано сокращение времени замирания у зрелых животных дикого типа ($74,84 \pm 5,68\%$) по сравнению с молодыми мышами ($98,74 \pm 0,94\%$) за счет отсутствия формирования условного страха после подачи белого шума в новой обстановке ($p = 0,0207$, тест Тьюки). При этом продолжительность реакции замирания у молодых и зрелых мышей линии *Nlrp3*^{-/-} оставалась на

сопоставимом уровне как в новом контексте, так и на вторые сутки тестирования. Отсутствие межгрупповых различий по возрастному признаку позволяет предположить, что у NLRP3-нокаутных мышей возраст не оказывает модулирующего влияния на сигнальную память (Рисунок 9В). Таким образом, NLRP3 имеет защитный генотип при старении.

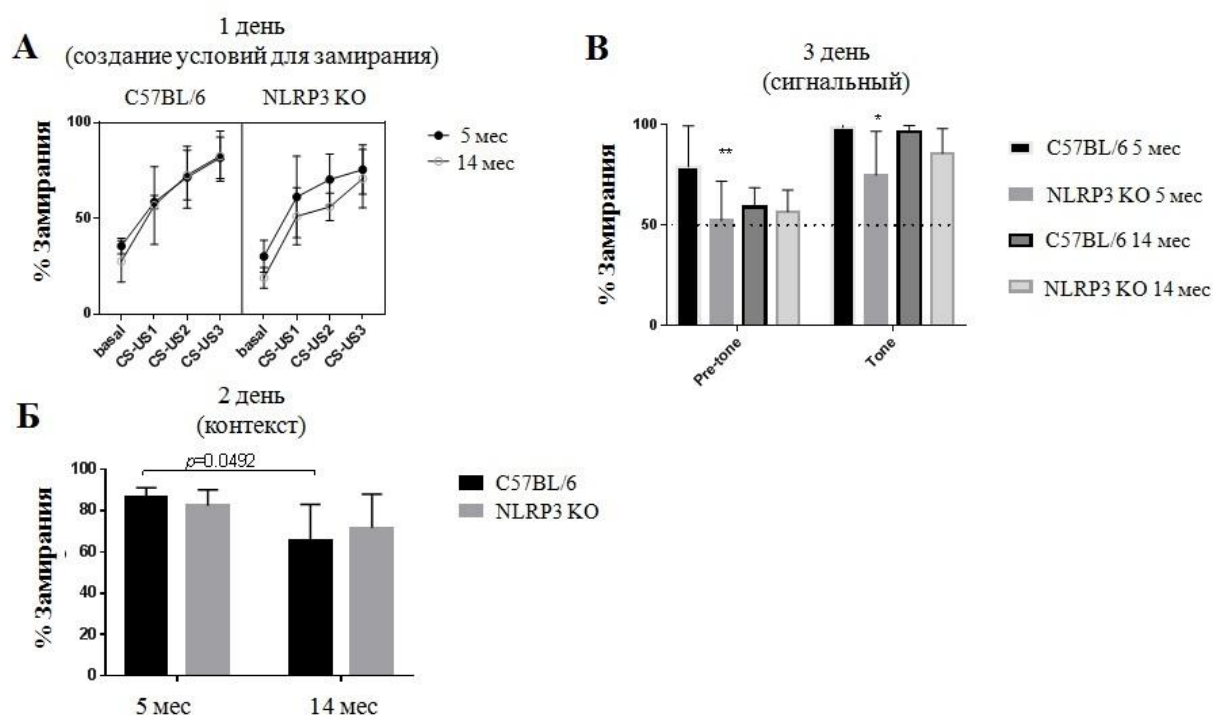


Рисунок 9 – (А) Процент времени замирания в первый день создания условий для запоминания в тесте «Условно-рефлекторного замирания». Basal – до подачи белого шума, CS-US1 – первая пара стимулов, CS-US2 – вторая пара стимулов, CS-US3 – третья пара стимулов. (Б) Число эпизодов замирания в первый день создания условий для запоминания в тесте «Условно-рефлекторного замирания». (В) Процент времени замирания в контекстный день. C57BL/6 – мыши дикого типа, NLRP3 KO – нокаутные мыши по гену *Nlrp3*.

3.1.2. Изучение сенесценции и развития SASP фенотипа с возрастом у мышей дикого типа и мышей с делецией гена *Nlrp3*

Для подавляющего большинства соматических клеток в норме характерна ограниченная способность к делению, которая окончательно исчерпывается по достижении состояния сенесценции. Клетки, вступившие в этот этап, перестают пролиферировать даже в присутствии стимулирующих факторов сыворотки или

при субкультивировании, что служит проявлением необратимой остановки клеточного цикла. Данное состояние также характеризуется комплексом морфофункциональных изменений, в том числе возникновением активности бета-галактозидазы, выявляемой при определенном pH (SA- β -Gal). В рамках проведенного исследования активность SA- β -Gal изучалась на срезах гиппокампа и в сокультуре астроцитов и нейронов, полученных от мышей разных возрастных групп. Количественный анализ подтвердил индукцию SA-beta-Gal в гиппокампе при старении мышей дикого типа, но не у животных, нокаутных по гену *Nlrp3*. Статистический анализ выявил значимое влияние взаимодействия факторов возраста и генотипа $F(1,14)=7.51$, $p=0.0159$. При множественном сравнении с помощью критерия Tukey's подтверждено, что в гиппокампе зрелых мышей доля сенесцентных клеток значимо выше (3.56 ± 0.84 % площади сенесцентных клеток) по сравнению с группой молодых животных (1.02 ± 0.23 % площади сенесцентных клеток) ($p=0.0281$, Tukey's критерий) (Рисунок 10). При сравнении между собой групп зрелых мышей разного генотипа показано, что площадь сенесцентных клеток при старении у *Nlrp3* $-/-$ мышей ниже (0.83 ± 0.15 % площади сенесцентных клеток) по сравнению с NLRP3 $+/+$ контролем (WT) (3.56 ± 0.84 % площади сенесцентных клеток) ($p=0.0269$, Tukey's критерий).

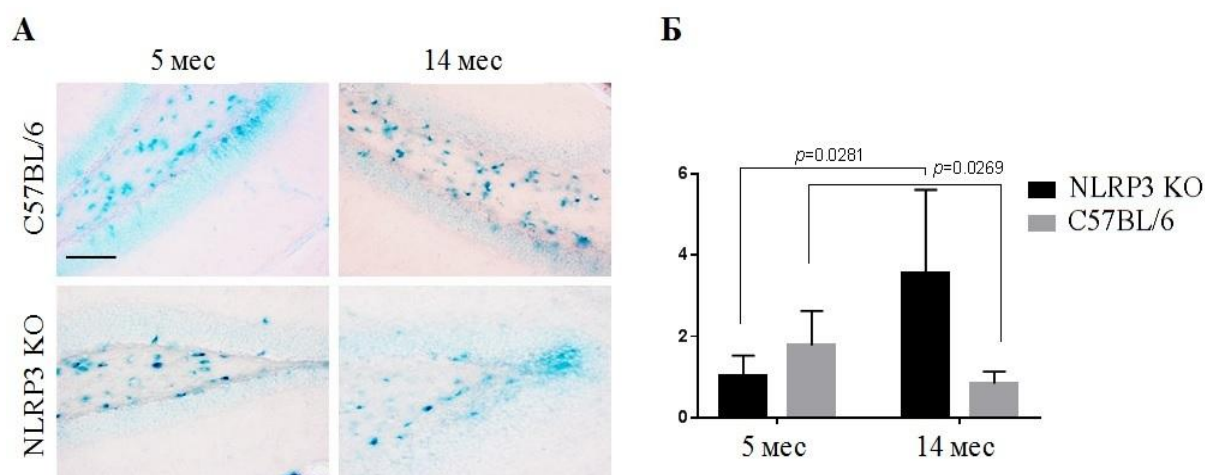


Рисунок 10 – (А) Репрезентативные снимки окраски SA- β -gal in vivo. Голубое окрашивание идентифицирует сенесцентные клетки. (Б) Количественный анализ SA- β -gal + клеток, представленный в виде занимаемой площади на срезах. C57BL/6 - мыши дикого типа, NLRP3 KO – нокаутные мыши по гену *Nlrp3*. Шкала - 100 мкм.

Данные, полученные в эксперименте на сокультуре нейронов и астроцитов (Рисунок 11), изолированных от животных экспериментальных групп, полностью согласуются с этими результатами.

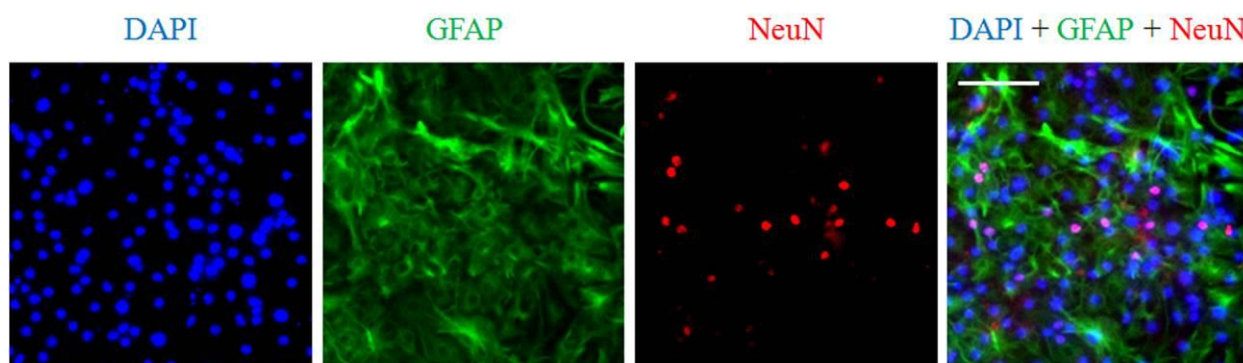


Рисунок 11 - Сокультура астроцитов и нейронов, полученных от мышей в возрасте 14 месяцев: ядра клеток окрашены DAPI (голубой), показана экспрессия маркера астроцитов GFAP (зеленый) и маркера нейронов NeuN (красный). Шкала - 50 мкм.

Выявлено значимое влияние взаимодействия факторов возраста и генотипа $F(1,20)=11.3$, $p=0.0031$, а также фактора возраста $F(1,20)=41.69$, $p<0.0001$ и генотипа $F(1,20)=31.39$, $p<0.0001$. При множественном сравнении подтверждено, что клетки, полученные от зрелых мышей демонстрируют более высокую активность SA-beta-Gal (оптическая плотность 0.083 ± 0.005 у.е.) по сравнению с группой молодых животных (оптическая плотность 0.052 ± 0.001 у.е.) ($p<0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 12). Сравнительный анализ клеточных культур, полученных от зрелых животных с разным генотипом, выявил достоверно сниженную активность β -галактозидазы у мышей с нокаутом гена *Nlrp3* (оптическая плотность 0.082 ± 0.001 0.055 ± 0.002 у.е.) относительно контроля дикого типа (*Nlrp3*^{+/+}) (оптическая плотность 0.082 ± 0.001 у.е.) ($p<0.0001$, Tukey's критерий).

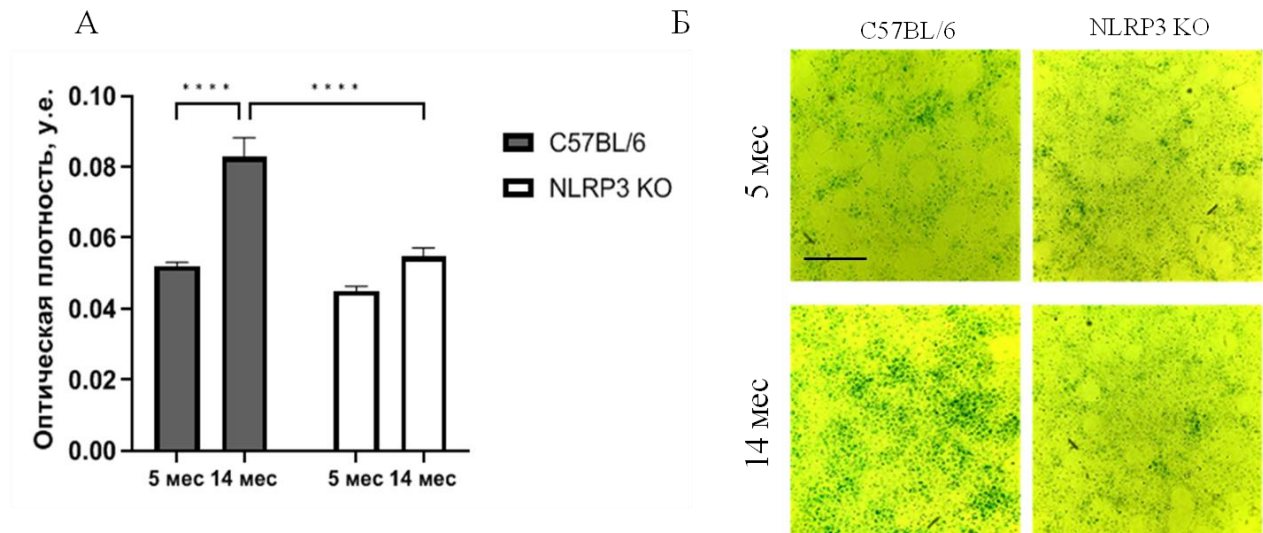


Рисунок 12 – (А) Количественный анализ SA-β-gal + клеток, представленный в виде оптической площади в у.е. в сокультуре клеток. (Б) Репрезентативные снимки окраски SA-β-gal *in vitro*. C57BL/6 - мыши дикого типа, NLRP3 KO – нокаутные мыши по гену *Nlrp3*. Шкала - 100 мкм.

Таким образом, у зрелых животных наблюдалась повышенная активность β-галактозидазы, что отражает накопление сенесцентных клеток с возрастом. Известно, что ключевыми компонентами секреторного фенотипа сенесцентных клеток (SASP) являются провоспалительные цитокины — в частности, IL-1β, TNF-α и IL-6 [120]. Учитывая, что мультибелковый комплекс NLRP3 инфламмосомы играет центральную роль в протеолитическом созревании и секреции IL-1β и IL-18, в дальнейшем было проведено исследование экспрессии компонентов инфламмосомы. При анализе экспрессии IL-18 было выявлено значимое влияние взаимодействия факторов возраста и генотипа $F(1,16)=328$, $p<0.0001$, а также фактора возраста $F(1,16)=317.3$, $p<0.0001$ и генотипа $F(1,16)=478.4$, $p<0.0001$. При множественном сравнении было обнаружено, что в гиппокампе 14-месячных мышей дикого типа площадь экспрессии IL-18 существенно превышала таковую у 5-месячных животных (2038 ± 89.24 мкм² против 283.1 ± 35.55 мкм²); ($p<0.0001$, Tukey's критерий)(Рисунок 13). В гиппокампе зрелых WT-мышей площадь экспрессии IL-18 была статистически значимо выше (2038 ± 89.24 мкм²), чем у NLRP3-нокаутных особей того же

возраста (84.9 ± 14.9 мкм²; $p < 0.0001$, Tukey's критерий). При анализе экспрессии NLRP3 в гиппокампе животных дикого типа было выявлено статистически значимое увеличение площади экспрессии маркера у зрелых WT мышей (2789 ± 531 мкм²) по сравнению с молодыми (1063 ± 19.12 мкм²) ($p = 0.0476$, критерий Манна-Уитни) (Рисунок 13). В группах NLRP3 нокаутных мышей разного возраста экспрессии NLRP3 методом ИГХ не зафиксировано.

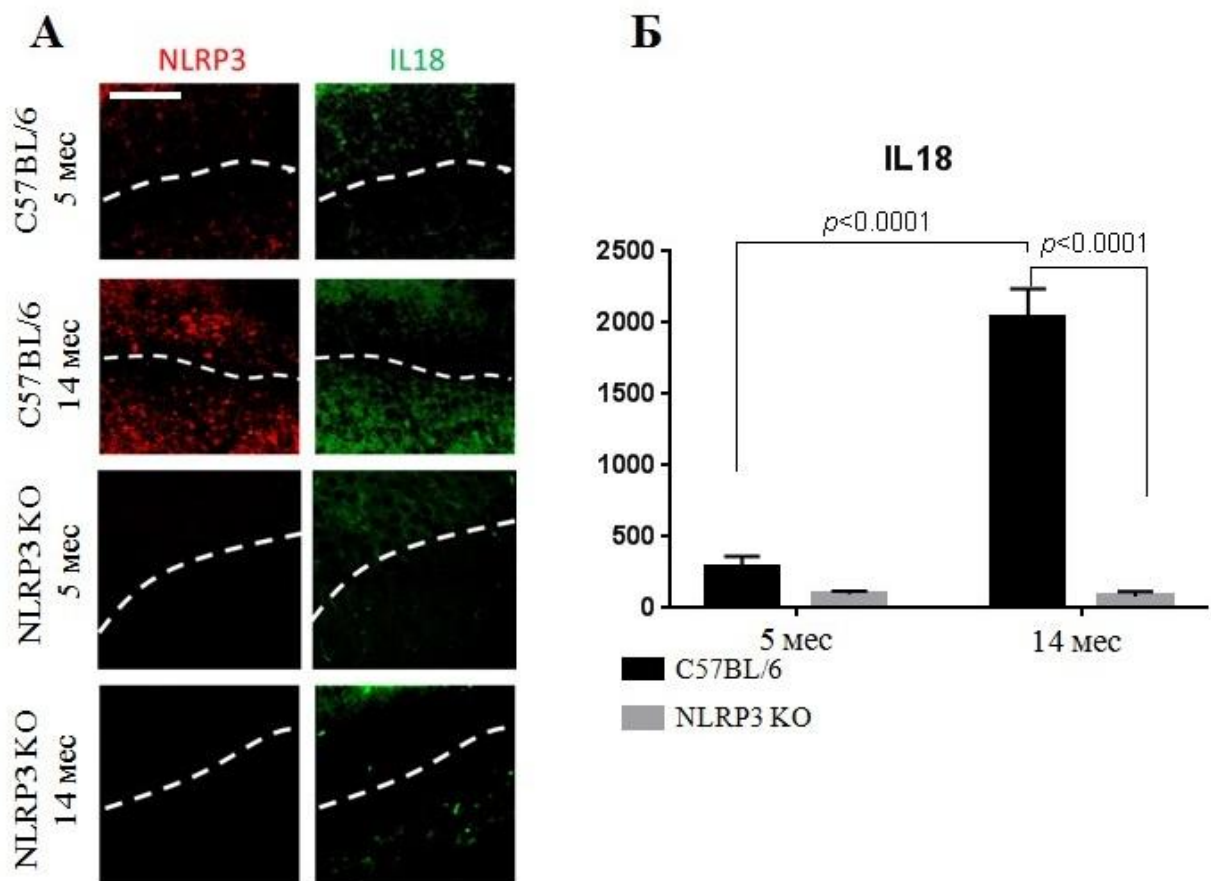


Рисунок 13 - (А) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах мышей в возрасте 5 и 14 месяцев: в первой колонке – экспрессия NLRP3 (красный), во второй колонке – экспрессия IL1 β (зеленый). SGZ – субгранулярная зона указана пунктирной белой линией. Масштабная шкала – 100мкм. (Б) Площадь экспрессии IL1 β , мкм. C57BL/6 - мыши дикого типа, NLRP3 KO – нокаутные мыши по гену *Nlrp3*

При анализе экспрессии NLRP3 и IL-18 в культуре клеток *in vitro* были получены аналогичные данные. Так, при анализе экспрессии IL-18 было выявлено значимое влияние взаимодействия факторов возраста и генотипа $F(1,16)=60.32$,

$p < 0.0001$, а также фактора возраста $F(1,16)=64.53$, $p < 0.0001$ и генотипа $F(1,16)=546.0$, $p < 0.0001$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от зрелых животных дикого типа интенсивность флуоресценции IL-18 была статистически значимо выше (9.86 ± 0.41 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от молодых мышей (5.12 ± 0.34 у.е.) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 14), в экспериментальных группах клеток, полученных от зрелых мышей разного генотипа также были выявлены статистически значимые различия: в клетках дикого типа значимо большая интенсивность флуоресценции IL18 (9.86 ± 0.41 у.е.), чем у клеток нокаутных мышей (0.44 ± 0.19 у.е.) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий).

Также в культурах клеток были подтверждены данные по изменению экспрессии NLRP3 в экспериментальных группах. В культурах клеток, полученных от NLRP3 нокаутных мышей разного возраста, экспрессии NLRP3 зафиксировано не было. В клетках, полученных от зрелых мышей дикого типа интенсивность флуоресценции NLRP3 значимо выше (15.64 ± 1.06 у.е.), чем в клетках, выделенных от молодых животных (5.92 ± 0.32 у.е.) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 14).

Таким образом, при старении отмечается увеличение сенесцентных клеток, которые характеризуются секреторным фенотипом, сопровождающимся увеличением экспрессии NLRP3 и IL-18.

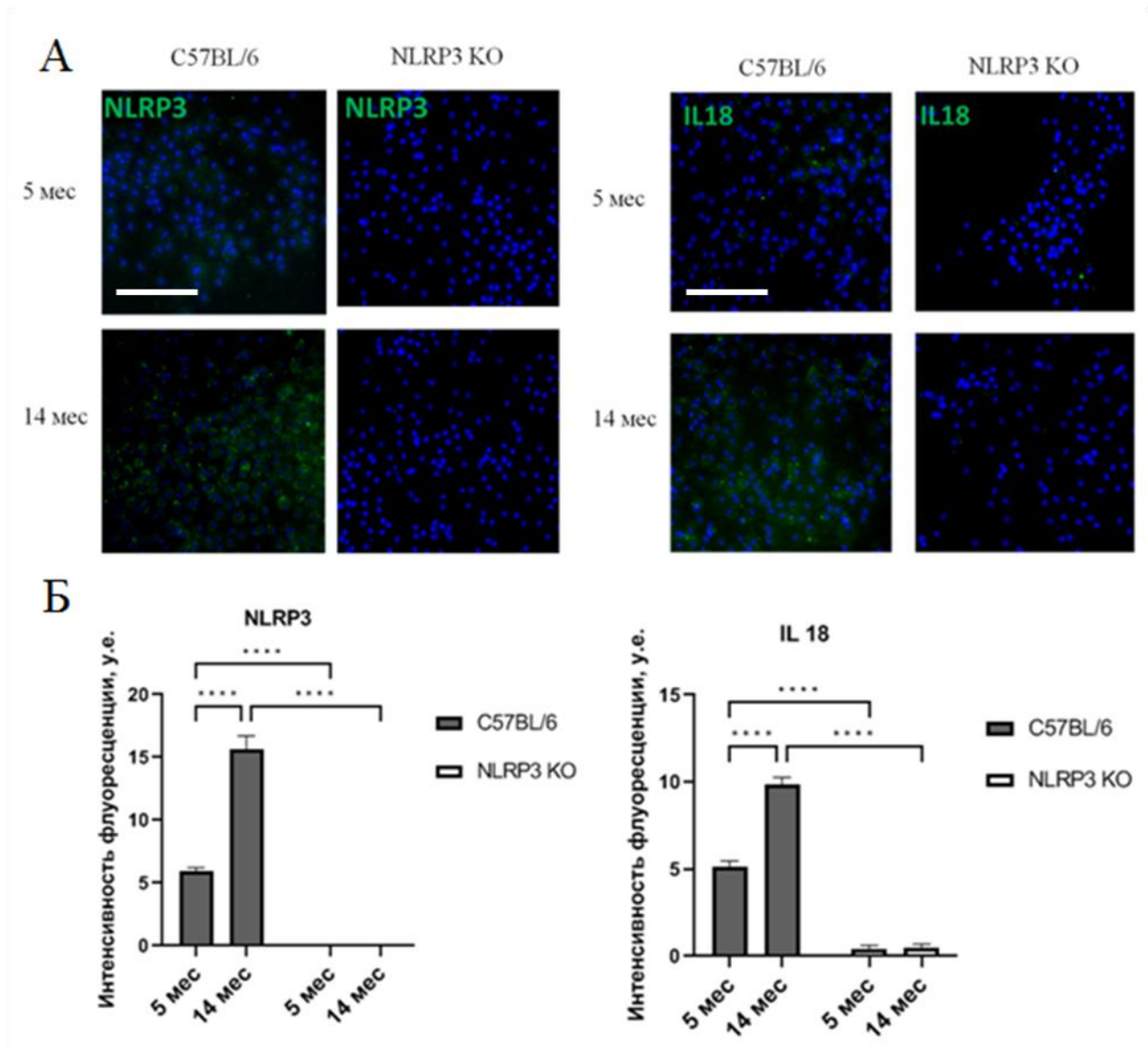


Рисунок 14 – (А) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия NLRP3 и IL1beta (зеленый). Шкала 100мкм. (Б) Количественный анализ экспрессии NLRP3 и IL1beta в культурах клеток.

Параллельно изучалась экспрессия белка HMGB1 (high mobility group box 1). Несмотря на свою первичную ядерную локализацию и функцию ДНК-шаперона, этот белок также относится к числу наиболее известных DAMPs-молекул [116]. Нами было выявлено фактора возраста $F(1,16)=35.29$, $p<0.0001$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от животных среднего возраста интенсивность флуоресценции HMGB1 была статистически значимо выше (6.30 ± 0.59 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от молодых мышей (1.92 ± 0.37 у.е.) ($p=0.0011$, Tukey's

критерий) (Рисунок 15). В клетках, полученных от нокаутных животных разного возраста, не было выявлено статистически значимых отличий в экспрессии HMGB1.

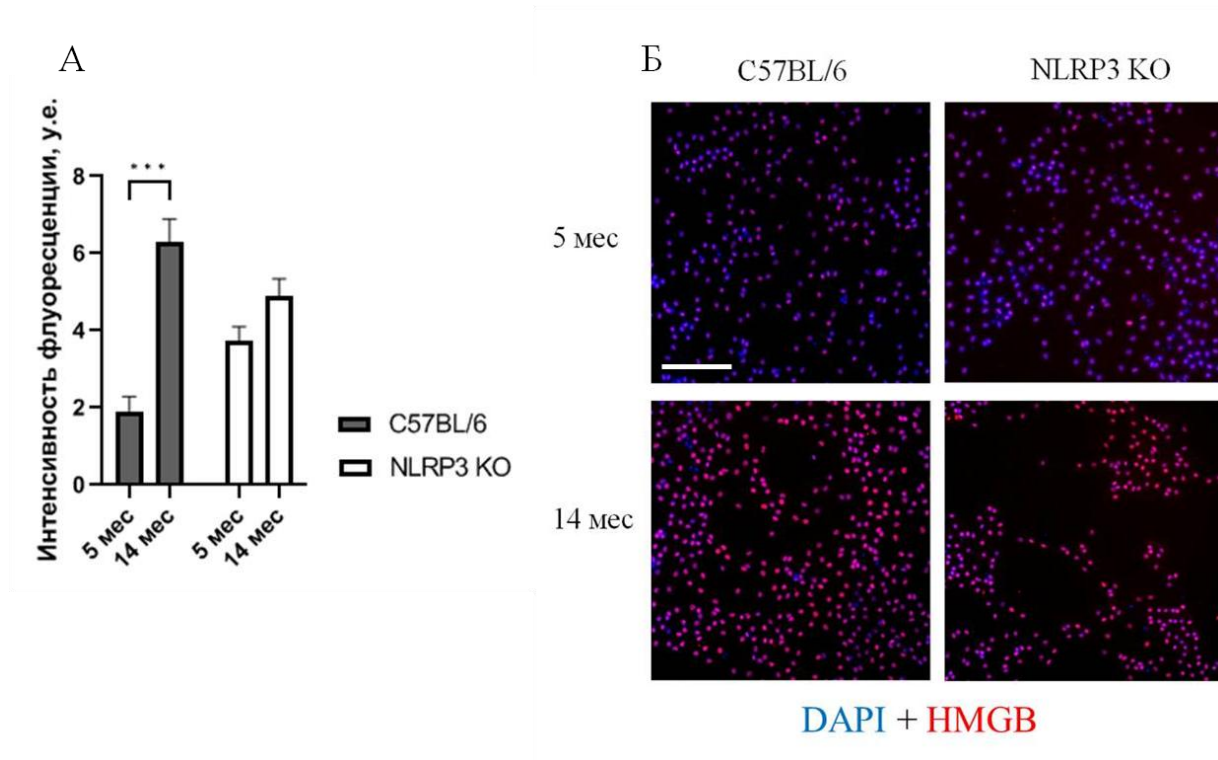


Рисунок 15 - (А) Количественный анализ экспрессии HMGB1 в культурах клеток. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия HMGB1 (красный). Шкала 100 мкм.

3.1.3. Изучение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламماسом у молодых и зрелых мышей дикого типа и мышей с делецией гена *Nlrp3*

Согласно литературным данным, существует устойчивая связь между возрастными изменениями в ЦНС и нарушениям метаболизма глюкозы, развитие инсулинорезистентности считается фактором риска когнитивного дефицита [211]. Важным звеном этой патологической цепи выступает метафламماسома - внутриклеточная сигнальная система, которая при активации инициирует провоспалительный метаболический ответ с последующей цитокиновой

секрецией [128]. В связи с этим в настоящей работе была проведена оценка экспрессии ключевых компонентов метафламмасомного комплекса в головном мозге мышей, принадлежащих к разным возрастным категориям.

В ходе исследования были выявлены статистически значимое влияние взаимодействия двух факторов (генотипа и возраста) $F(1,15)=18.23$, $p=0.0007$, а также каждого фактора в отдельности – влияние генотипа $F(1,15)=35.98$, $p<0.0001$, влияние возраста $F(1,15)=11.92$, $p=0.0036$. При множественном сравнении увеличение экспрессии фосфорилированной формы IKKbeta *in vivo* IKKbeta в группе зрелых мышей дикого типа составила 12780 ± 890 мкм² по сравнению с молодыми животными того же генотипа 5920 ± 943.9 мкм² ($p=0.0003$, Tukey's критерий) (Рисунок 16). При сравнении нокаутных зрелых мышей (3658.14 ± 686.42 мкм²) и нокаутных молодых мышей (4384.125 ± 686.42 мкм²) установлено, что старение в отсутствие инфламмасом не приводит к изменению площади экспрессии киназы IKKbeta ($p=0.9419$, Tukey's критерий).

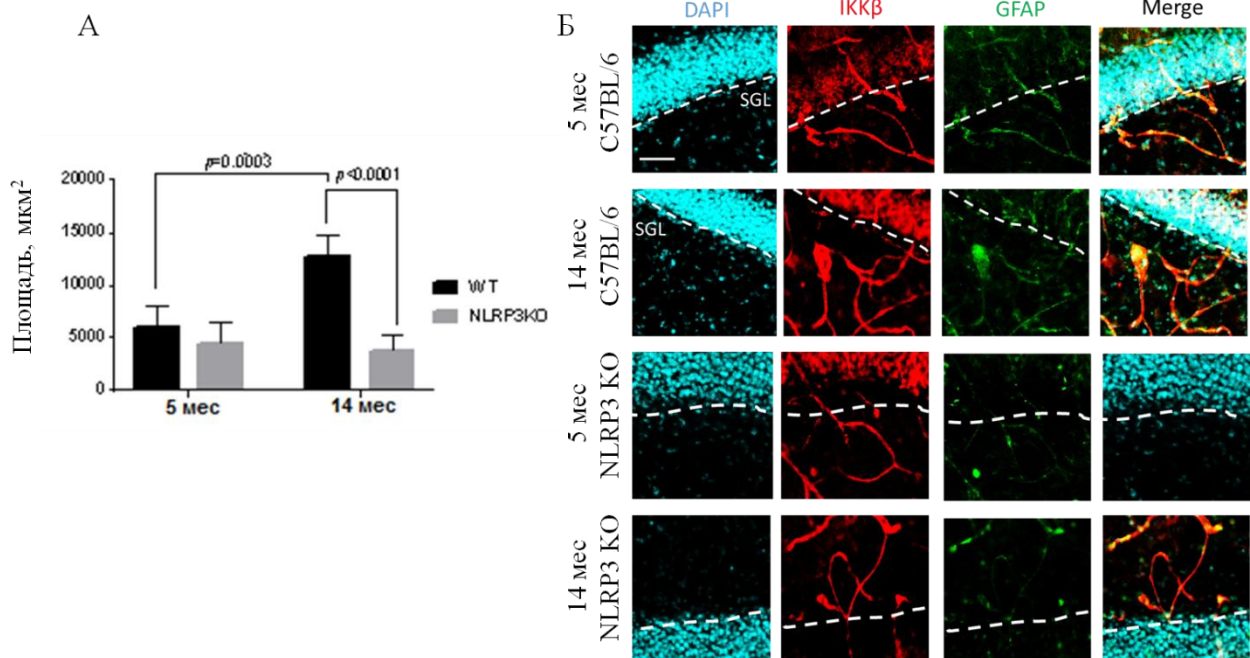


Рисунок 16 - (А) Площадь экспрессии IKKβ в срезах головного мозга, мкм. WT - мыши дикого типа, NLRP3 KO – нокаутные мыши по гену *Nlrp3*. (Б) Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах мышей в возрасте 5 и 14 месяцев разного генотипа: ядра клеток прокрашены DAPI (голубой), показана экспрессия IKKβ (красный) и экспрессия GFAP (зеленый). SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

При анализе интенсивности флуоресценции фосфорилированной формы ИККbeta в культурах клеток *in vitro* также было выявлено статистически значимое влияние генотипа $F(1,16)=35.78$, $p<0.0001$, влияние возраста $F(1,16)=20.45$, $p=0.0003$. Установлено также, что в сокультуре клеток, выделенных от зрелых животных дикого типа, уровень экспрессии киназы ИККbeta статистически значимо выше (12.3 ± 0.69 у.е.), чем в клетках, полученных от молодых животных (8.36 ± 0.51 у.е.) ($p=0.0006$, критерий Tukey's) (Рисунок 17). При сравнении уровня экспрессии фосфорилированной ИККbeta в клетках, полученных от нокаутных зрелых мышей (7.56 ± 0.64 у.е.) и нокаутных молодых мышей (6.5 ± 0.22 у.е.) различий не было установлено ($p=0.56$, Tukey's критерий), что соотносится с данными, полученными на срезах гиппокампа. Таким образом, старение сопровождается увеличением фосфорилированной формы ИККbeta у мышей дикого типа, но не у нокаутных мышей.

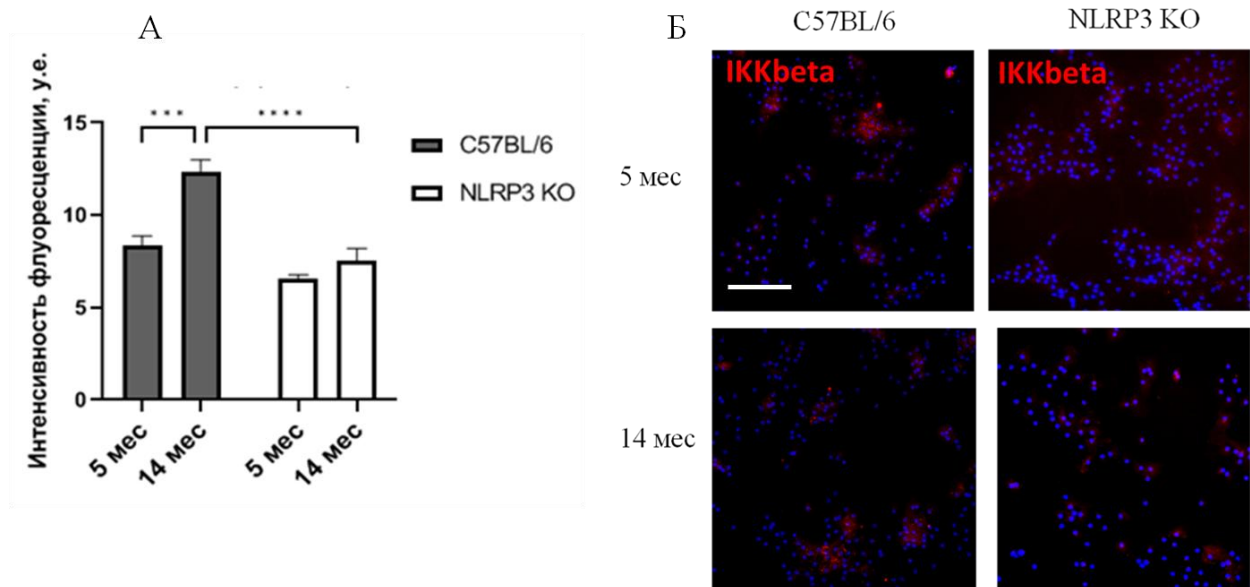


Рисунок 17 - (А) Количественный анализ экспрессии ИККbeta в культуре клеток *in vitro*. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия ИККbeta (красный). Шкала 100 мкм.

При анализе экспрессии протеинкиназы PKR было также установлено значимое влияние фактора генотипа ($F(1,16)=26.65$, $p<0.0001$), фактора возраста ($F(1,16)=7.067$, $p=0.0172$), а также взаимодействия этих двух факторов ($F(1,16)=10.81$, $p=0.0046$). Площадь экспрессии PKR в гиппокампе зрелых животных дикого типа была статистически значимо выше (8343 ± 1856.21 мкм²) по сравнению с 5-месячными мышами (2566.26 ± 559.33 мкм²) ($p=0.0034$, Tukey's критерий) (Рисунок 18). Также были установлены статистически значимые различия в экспрессии PKR при сравнении зрелых мышей разного генотипа. У нокаутных мышей площадь экспрессии PKR статистически значимо ниже (133.67 ± 27.42 мкм²), чем у мышей дикого типа (8343 ± 1856.21 мкм²) ($p=0.0001$, Tukey's критерий).

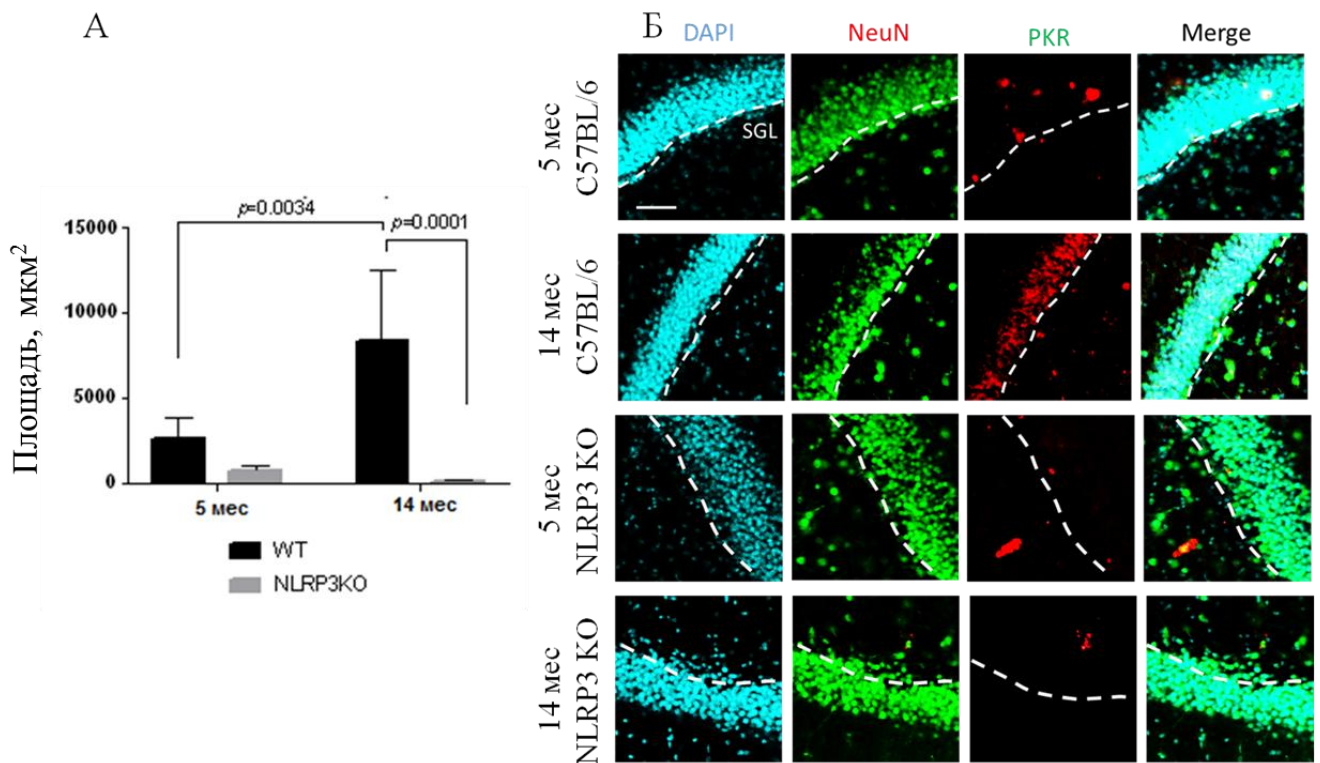


Рисунок 18 - (А) Площадь экспрессии PKR в срезах головного мозга, мкм. WT - мыши дикого типа, NLRP3^{-/-} – нокаутные мыши по гену *Nlrp3*. (Б) Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах мышей в возрасте 5 и 14 месяцев разного генотипа: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (голубой), во второй колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в третьей колонке – экспрессия PKR (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). SGZ – субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм.

Сравнительный анализ клеточных культур показал пятикратное увеличение количества PKR-позитивных клеток в популяции, полученной от зрелых животных, по сравнению с культурой от молодых особей ($6.42 \pm 0.26\%$ против $1.22 \pm 0.21\%$ соответственно, $p < 0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 19). В культуре клеток, выделенных от NLRP3-нокаутных мышей, также было выявлено увеличение экспрессии PKR с возрастом ($1.2 \pm 0.14\%$ в группе молодых, $3.7 \pm 0.23\%$ в группе зрелых, $p < 0.0001$, Tukey's критерий). Однако количество клеток, экспрессирующих PKR в группе, полученной от зрелых NLRP3-нокаутных мышей было значительно ниже, чем в группе, полученной от животных дикого типа: $3.7 \pm 0.23\%$ клеток от зрелых нокаутных животных, $6.42 \pm 0.26\%$ клеток от зрелых животных дикого типа ($p < 0.0001$, Tukey's критерий). В целом было выявлено статистически значимое влияние фактора генотипа ($F(1,16)=38.41$, $p < 0.0001$), фактора возраста ($F(1,16)=328.6$, $p < 0.0001$), а также взаимодействия этих двух факторов ($F(1,16)=37.27$, $p < 0.0001$). Таким образом, при старении наблюдается увеличение экспрессии фосфорилированных протеиназ метафламмасом у животных дикого типа, но не при нокаутировании гена *Nlrp3*.

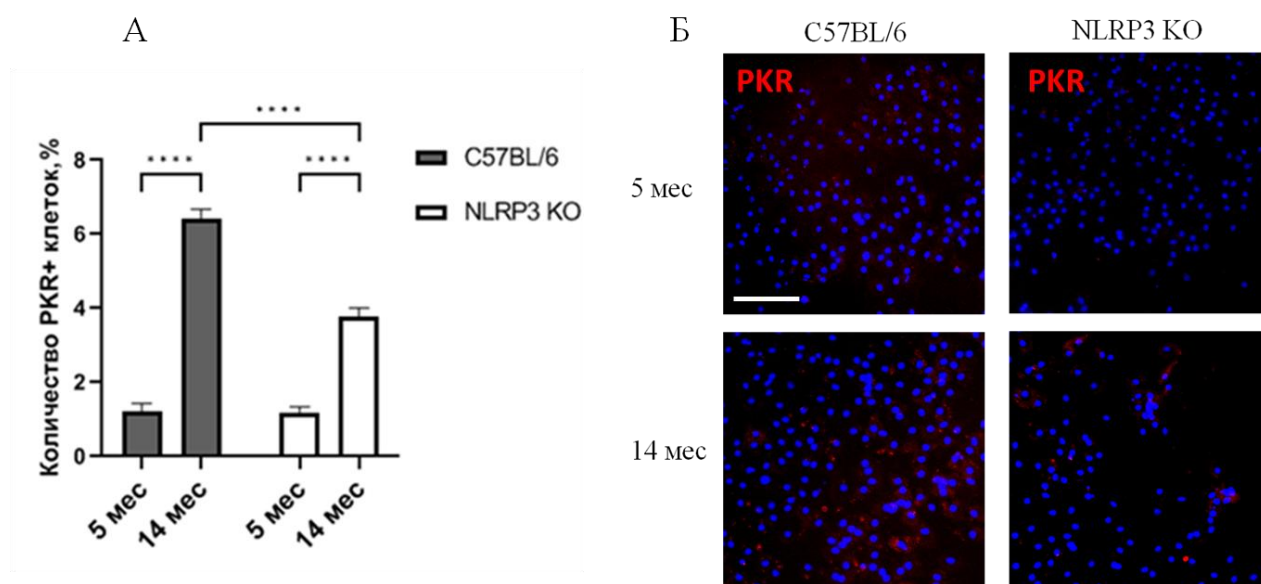


Рисунок 19 - (А) Количественный анализ экспрессии PKR в культуре клеток *in vitro*. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия PKR (красный). Шкала 100 мкм.

3.1.4. Изучение экспрессии маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности у молодых и зрелых мышей дикого типа и мышей с делецией гена *Nlrp3*

Инсулинорезистентность определяется как состояние, при котором нормальные или повышенные уровни инсулина вызывают сниженный биологический ответ, характеризующийся нарушением чувствительности к инсулин-опосредованной утилизации глюкозы [98]. В связи с этим было проведено исследование экспрессии маркеров инсулинового сигнального пути — транспортёра глюкозы GLUT4, инсулиновых рецепторов, патологически фосфорилированного IRS1, а также уровня мРНК инсулина у животных, лишённых экспрессии инфламماسомы NLRP3, с целью оценки вклада нейровоспаления в развитие инсулинорезистентности.

Анализ интенсивности флуоресценции инсулиновых рецепторов (IR) в сокультурах астроцитов и нейронов от мышей разных экспериментальных групп выявил тенденцию к росту данного показателя у зрелых особей (9.94 ± 0.91 у.е.) относительно молодых животных (8.56 ± 0.23 у.е.). Однако статистическая значимость межгрупповых различий в уровне экспрессии IR достигнута не была ($p=0.26$, Tukey's критерий) (Рисунок 20).

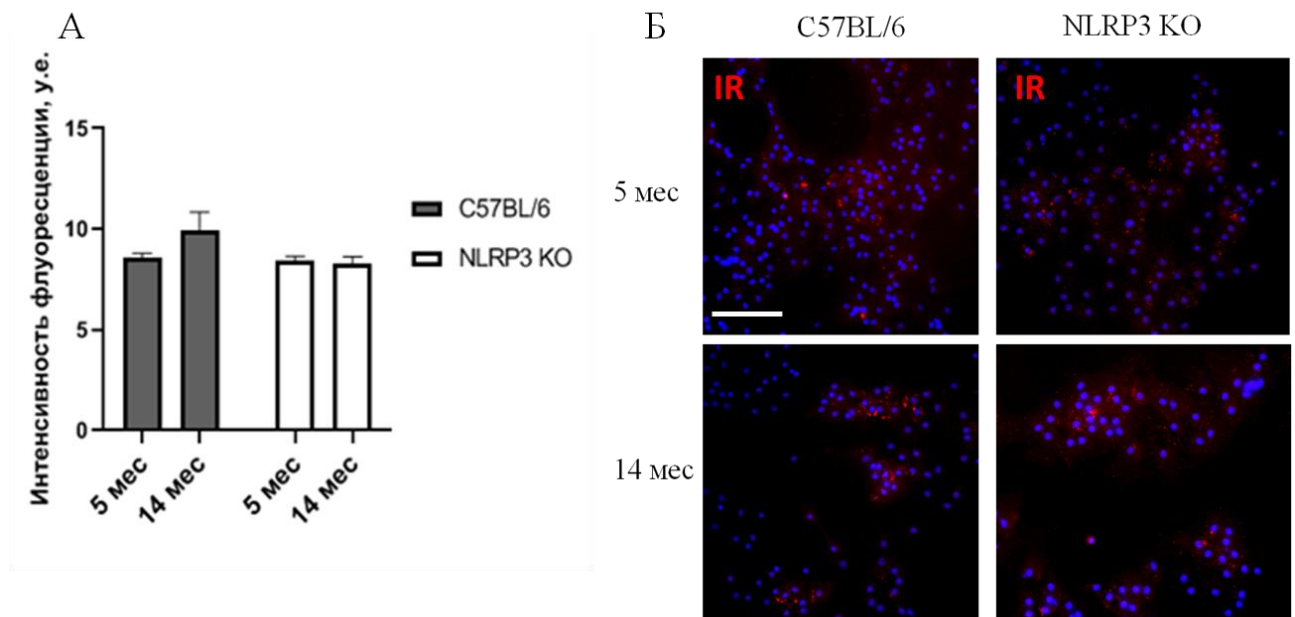


Рисунок 20 - (А) Количественный анализ экспрессии в культуре клеток *in vitro*. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия IR (красный). Шкала 100 мкм.

При иммуногистохимическом исследовании площади экспрессии патологически фосфорилированного IRS1 не было выявлено статистически значимых различий в исследуемых группах. В группе зрелых (3118 ± 391.32 мкм²) и молодых мышей (2809 ± 367.33 мкм²) ($p=0.9546$, Tukey's критерий) дикого типа; у нокаутных мышей молодых возраста площадь экспрессии (3781.83 ± 488.86 мкм²), зрелых (2519.3 ± 579.75 мкм²) нокаутных мышей ($p=0.2810$, Tukey's критерий) (Рисунок 21).

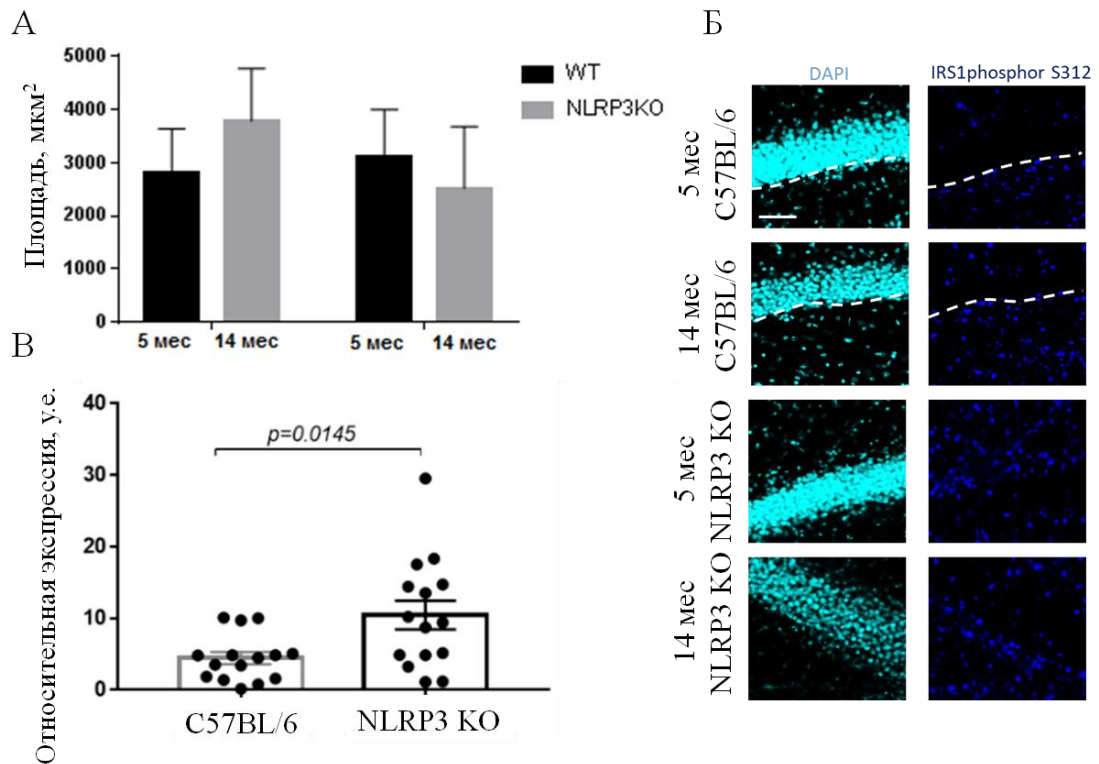


Рисунок 21 – (А) Площадь экспрессии IRS1phospho-S312, мкм. WT - мыши дикого типа, NLRP3^{-/-} – нокаутные мыши по гену *Nlrp3*. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание в группах мышей в возрасте 5 и 14 месяцев разного генотипа: в первой колонке ядра клеток покрашены DAPI (голубой), во второй колонке – экспрессия IRS1phospho-S312 (синий). Пунктиром указана субгранулярная зона. Масштабная шкала – 100мкм. (В) Оценка мРНК инсулина в базолатеральной миндалине мозга мышей.

В то же время в мозге нокаутных по *Nlrp3* животных была выявлена статистически значимо более высокая экспрессия мРНК инсулина в миндалине ($10,44 \pm 1,996$ против $4,435 \pm 0,843$ у диких животных; $p = 0,0145$, критерий Манна–Уитни) (Рисунок 22В). Этот результат может отражать компенсаторное усиление синтеза инсулина на фоне отсутствия инфламмосомы NLRP3 и сниженной активности провоспалительных каскадов, обычно сопровождающих развитие инсулинорезистентности.

Также не было выявлено статистически значимых различий в интенсивности флуоресценции фосфорилированного IRS1 в культурах клеток *in vitro*, полученных от животных разных экспериментальных групп: в группе зрелых (10.72 ± 1.13 у.е.) и молодых мышей (13.36 ± 1.02 у.е.) ($p = 0.28$, Tukey's критерий) дикого типа; у нокаутных мышей молодого возраста (10.84 ± 0.98 у.е.),

зрелых (11.68 ± 0.85 у.е.) нокаутных мышей ($p=0.93$, Tukey's критерий) (Рисунок 22).

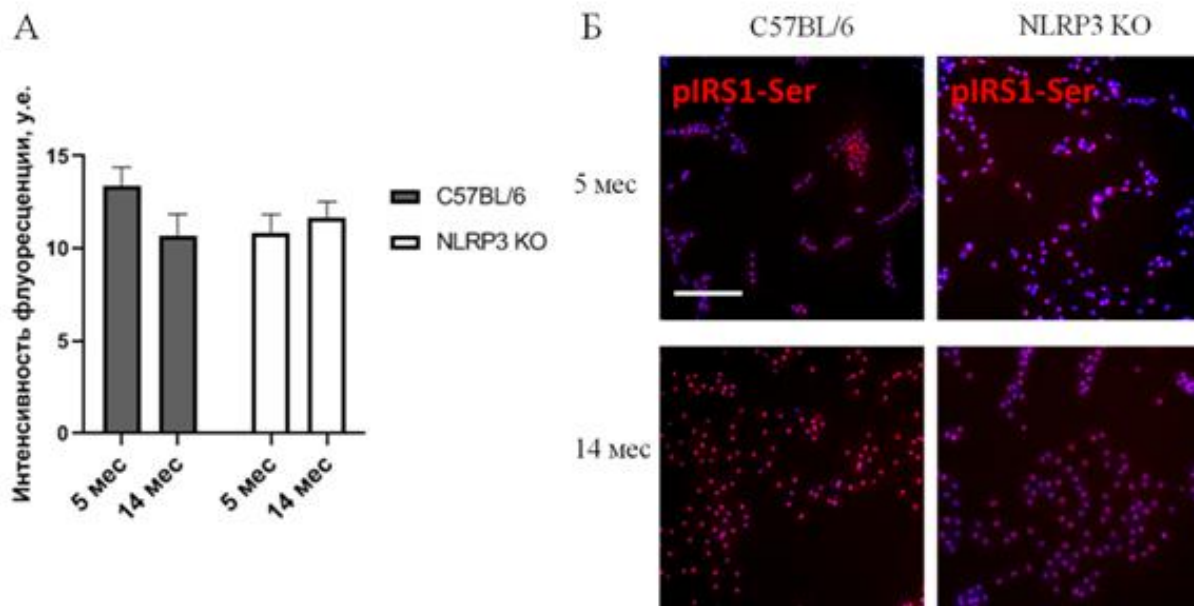


Рисунок 22 - (А) Количественный анализ экспрессии pIRS1-Ser в культуре клеток *in vitro*. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия pIRS1-Ser (красный). Шкала 100 мкм.

Таким образом, полученные данные указывают, что при отсутствии NLRP3-инфламмосомы наблюдаются признаки сохранения инсулиновой чувствительности и предотвращения развития метаболической дисрегуляции в нейронах. Нормальный уровень экспрессии IR и отсутствие гиперфосфорилирования IRS1 при одновременном повышении транскрипции инсулина свидетельствуют о потенциальной роли NLRP3 в нарушении инсулинзависимых сигнальных путей в мозге при старении и воспалении.

Отмечено снижение экспрессии GLUT4 при старении во всех исследуемых группах, что может указывать на развитие изменений инсулиновой сигнализации с возрастом (Рисунок 23). Так, интенсивность флуоресценции GLUT4 в клетках, полученных от зрелых мышей контрольной группы (24.2 ± 2.22 у.е.) статистически значимо ниже, чем группе молодых животных (30.8 ± 1.5 у.е) ($p < 0,005$, Tukey's критерий). При этом у нокаутов экспрессия инсулин-зависимого переносчика

GLUT4 была снижена (16.0 ± 1.3 у.е. в группе молодых и 20.4 ± 1.43 у.е. в группе зрелых животных) по сравнению с контролем (24.2 ± 2.22 у.е. в группе молодых и 30.8 ± 1.5 у.е. в группе зрелых животных) ($p < 0,0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 23).

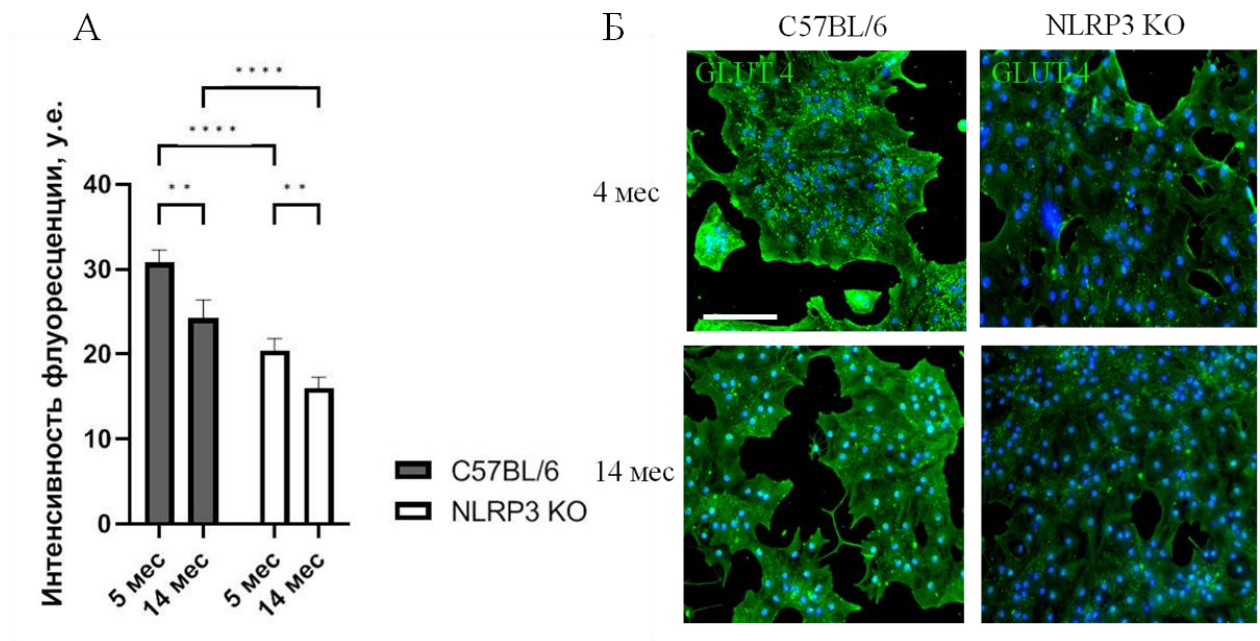


Рисунок 23 - (А) Количественный анализ экспрессии GLUT4 в культуре клеток *in vitro*. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия GLUT4 (зеленый). Шкала 100 мкм.

В данном исследовании было обнаружено, что в контрольной группе старение приводит к сверхэкспрессии GSK3 β в культуре клеток ($13.2 \pm 0.86\%$ в группе зрелых животных и $4.6 \pm 0.68\%$ в группе молодых животных) ($p < 0,0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 24). В клетках от NLRP3-нокаутных животных наблюдается слабый флуоресцентный сигнал GSK3 β ($2.6 \pm 0.4\%$ и $2.8 \pm 0.58\%$ в группах молодых и зрелых животных, соответственно). Старение у этих мышей не увеличивает экспрессию GSK3 β ($p = 0,99$, Tukey's критерий).

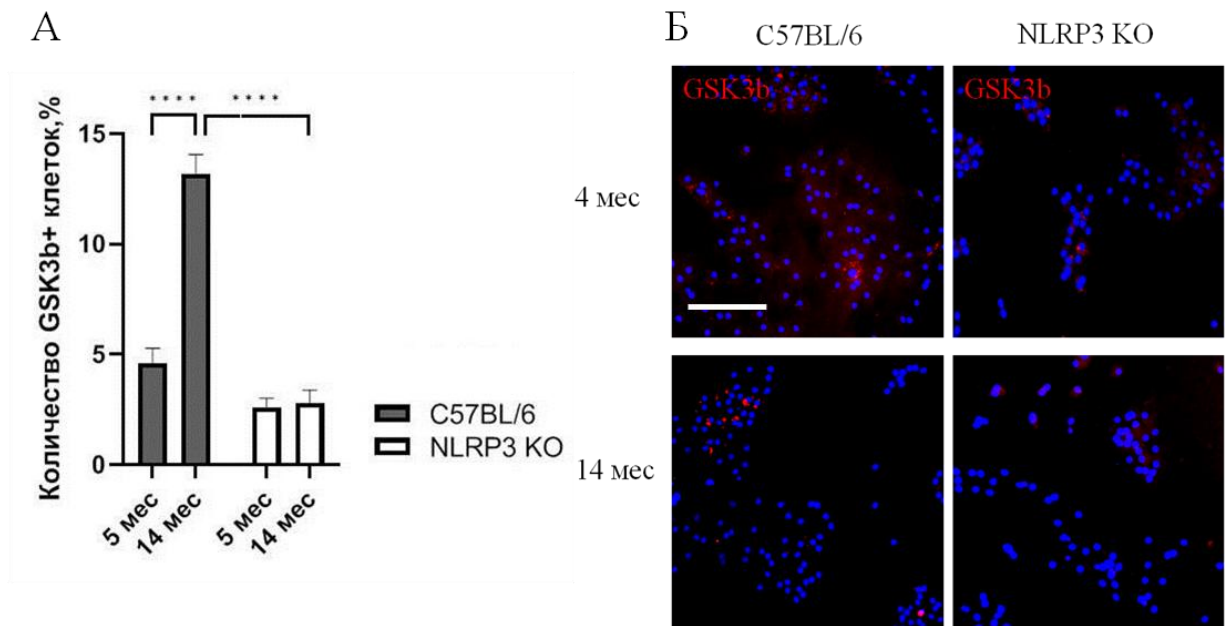


Рисунок 24 - (А) Количественный анализ экспрессии в культуре клеток *in vitro*. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия GSK3beta (красный). Шкала 100 мкм.

3.2. Исследование эффектов фармакологической модуляции NLRP3-инфламмасом *in vitro* с использованием LPS

3.2.1. Изучение сенесценции и развития SASP фенотипа в культурах клеток при аппликации LPS

Была изучена активность beta-галактозидазы в клетках органотипических срезов гиппокампа с использованием SA-beta-Gal набора. Полученные данные представлены на Рисунке 25. При множественном сравнении было выявлено значимое увеличение доли сенесцентных клеток в органотипических срезах гиппокампа у 24-месячных мышей дикого типа ($8.18 \pm 0.32\%$ площади сенесцентных клеток) по сравнению с 14-месячными животными ($5.44 \pm 0.2\%$ площади сенесцентных клеток) ($p \leq 0,001$, Tukey's критерий). Воздействие LPS на срезы приводит к значимому увеличению площади сенесцентных клеток в старшей возрастной группе до $10,46 \pm 0.59\%$ с $8.18 \pm 0.32\%$ площади ($p \leq 0,01$, Tukey's критерий).

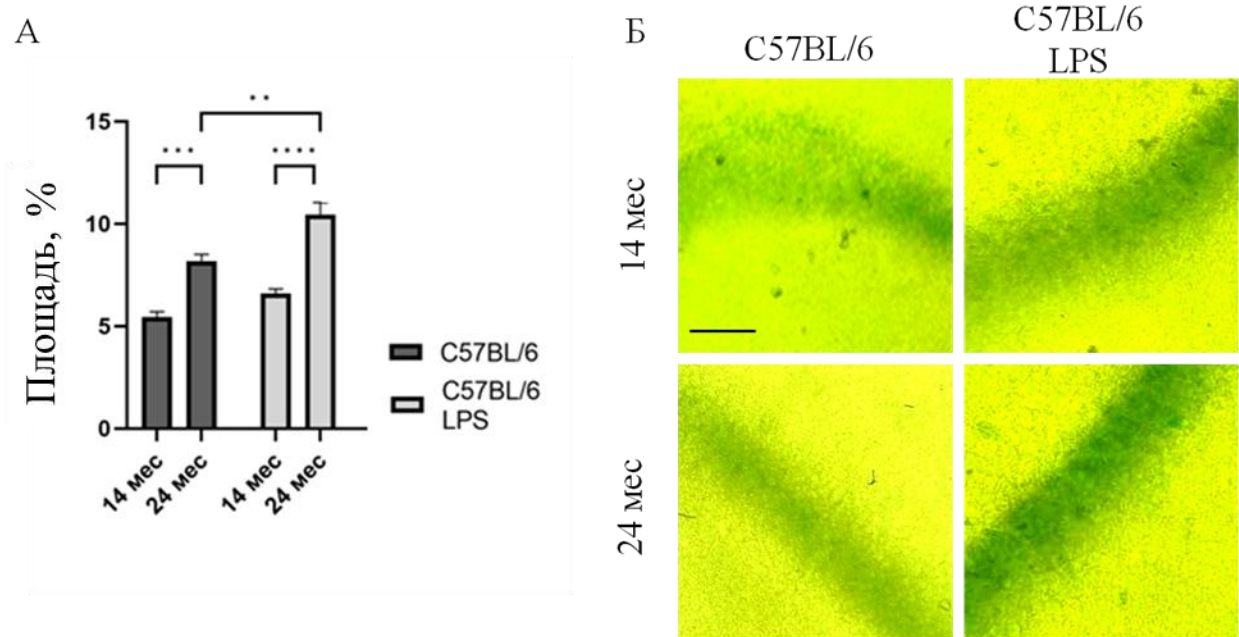


Рисунок 25 - (А) Количественный анализ SA-β-gal+ клеток, представленный в виде занимаемой площади на срезах. (Б) Репрезентативные снимки окраски SA-β-gal *in vitro*. Шкала 100 мкм.

Также проведено исследование изменения экспрессии мультибелкового комплекса инфламماسомы NLRP3, которая участвует в созревании и секреции IL-1beta и IL-18. В группе мышей дикого типа добавление LPS в среду культивирования вызвало значимое увеличение числа клеток, экспрессирующих NLRP3. Так, в срезах, полученных от животных в возрасте 14 месяцев число NLRP3+ клеток выросло с $12.08 \pm 1.03\%$ до $24.18 \pm 0.79\%$ ($p < 0.0001$, Tukey's критерий); в срезах, полученных от животных в возрасте 24 месяцев - с $23.18 \pm 1.65\%$ до $36.64 \pm 1.7\%$ ($p < 0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 26).

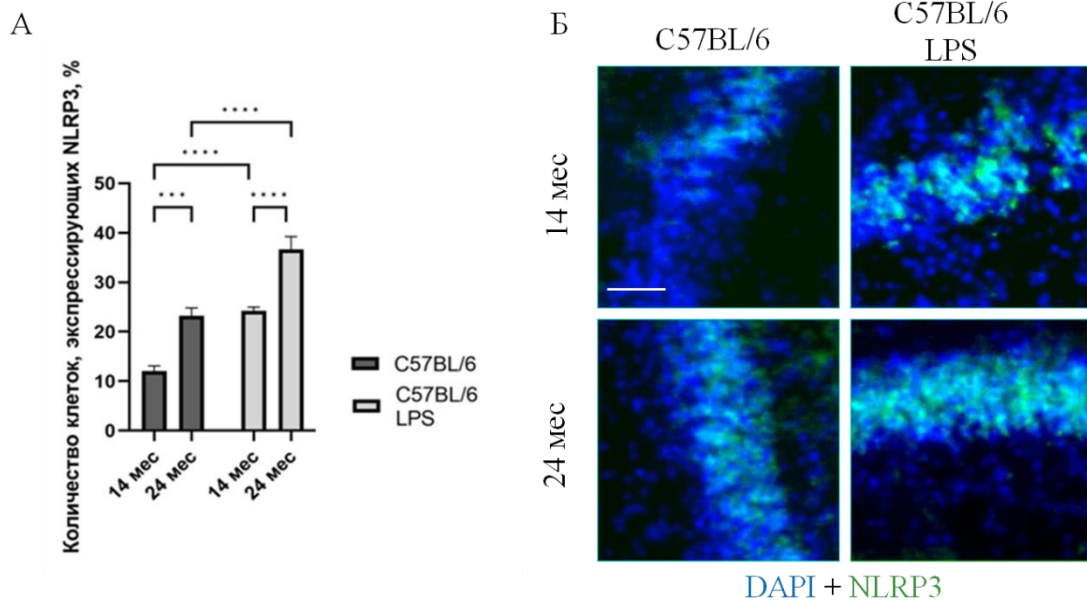


Рисунок 26 - (А) Количественный анализ экспрессии NLRP3 в органотипических срезах гиппокампа мышей. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия NLRP3 (зеленый). Шкала 100 мкм.

При анализе экспрессии IL-1beta при множественном сравнении в группе животных дикого типа было обнаружено, что добавление LPS в среду культивирования вызывает значимое увеличение числа клеток, экспрессирующих IL-1beta. Так, в срезах, полученных от животных в возрасте 14 месяцев число IL-1beta+ клеток выросло с $15.26 \pm 0.92\%$ до $29.86 \pm 1.16\%$ ($p < 0.0001$, Tukey's критерий); в срезах, полученных от животных в возрасте 24 месяцев - с $25.6 \pm 2.29\%$ до $36.78 \pm 0.87\%$ ($p < 0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 27).

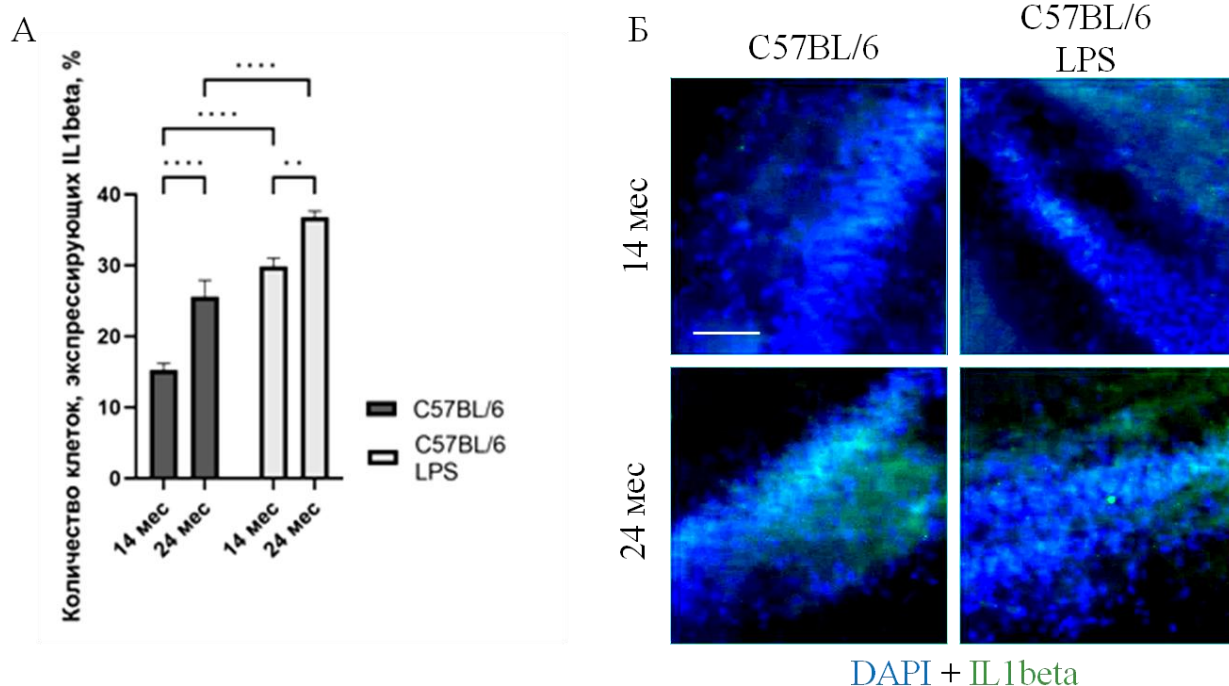


Рисунок 27 - (А) Количественный анализ экспрессии IL1-beta в органотипических срезах гиппокампа. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия IL1beta (зеленый). Шкала 100 мкм.

При анализе экспрессии HMGB1 при множественном сравнении в группе животных дикого типа было обнаружено, что добавление LPS в среду культивирования вызывает значимое увеличение числа клеток, экспрессирующих HMGB1. Так, в срезах, полученных от животных в возрасте 14 месяцев число HMGB1+ клеток выросло с $7.24 \pm 1.28\%$ до $17.26 \pm 0.72\%$ ($p < 0.0001$, Tukey's критерий); в срезах, полученных от животных в возрасте 24 месяцев - с $12.62 \pm 0.96\%$ до $22.52 \pm 1.06\%$ ($p < 0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 28).

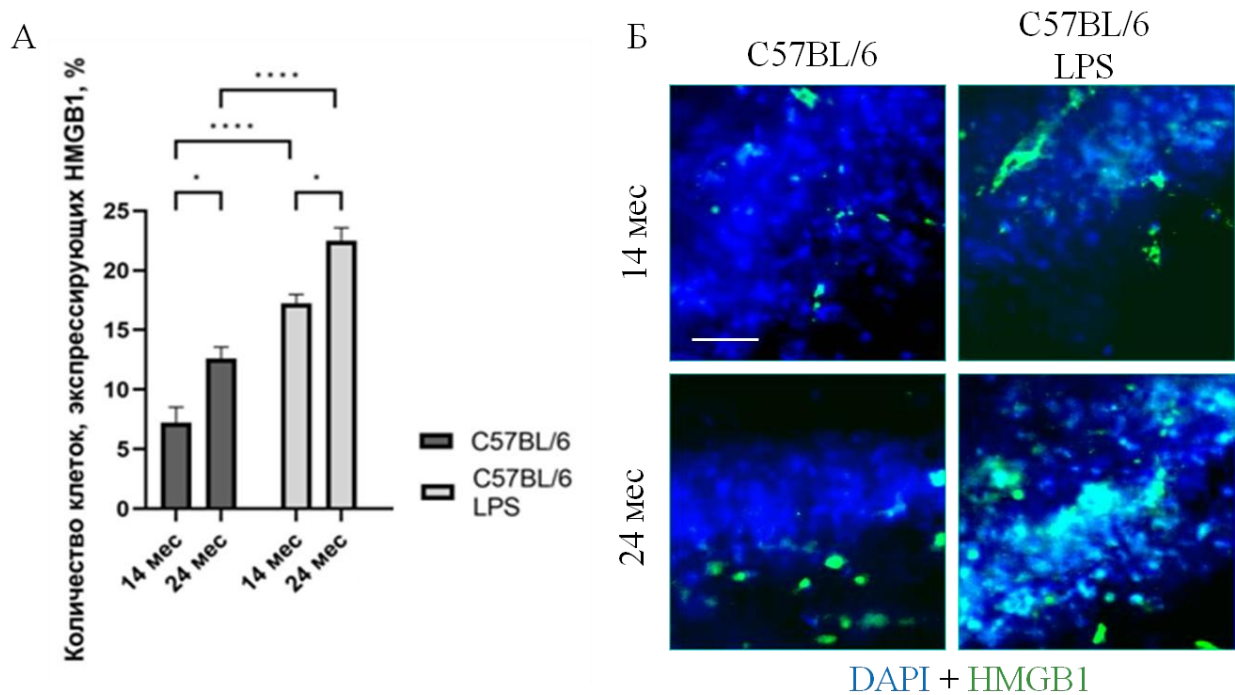


Рисунок 28 - (А) Количественный анализ экспрессии HMGB1 в органотипических срезах гиппокампа. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия HMGB1 (зеленый). Шкала 100 мкм.

3.2.2. Изучение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом и маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности в культурах клеток при аппликации LPS

При оценке экспрессии JNK при множественном сравнении было обнаружено, что добавление LPS в среду культивирования вызывает значимое увеличение числа клеток, экспрессирующих JNK. В срезах, полученных от животных в возрасте 14 месяцев число JNK⁺ клеток выросло с $5.02 \pm 0.37\%$ до $19.60 \pm 1.05\%$ ($p < 0.0001$, Tukey's критерий); в срезах, полученных от животных в возрасте 24 месяцев - с $9.22 \pm 0.33\%$ до $22.74 \pm 1.61\%$ ($p < 0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 29).

При анализе экспрессии фосфорилированного IRS1 при множественном сравнении статистически значимые отличия обнаружены не были. Полученные данные представлены на Рисунке 30.

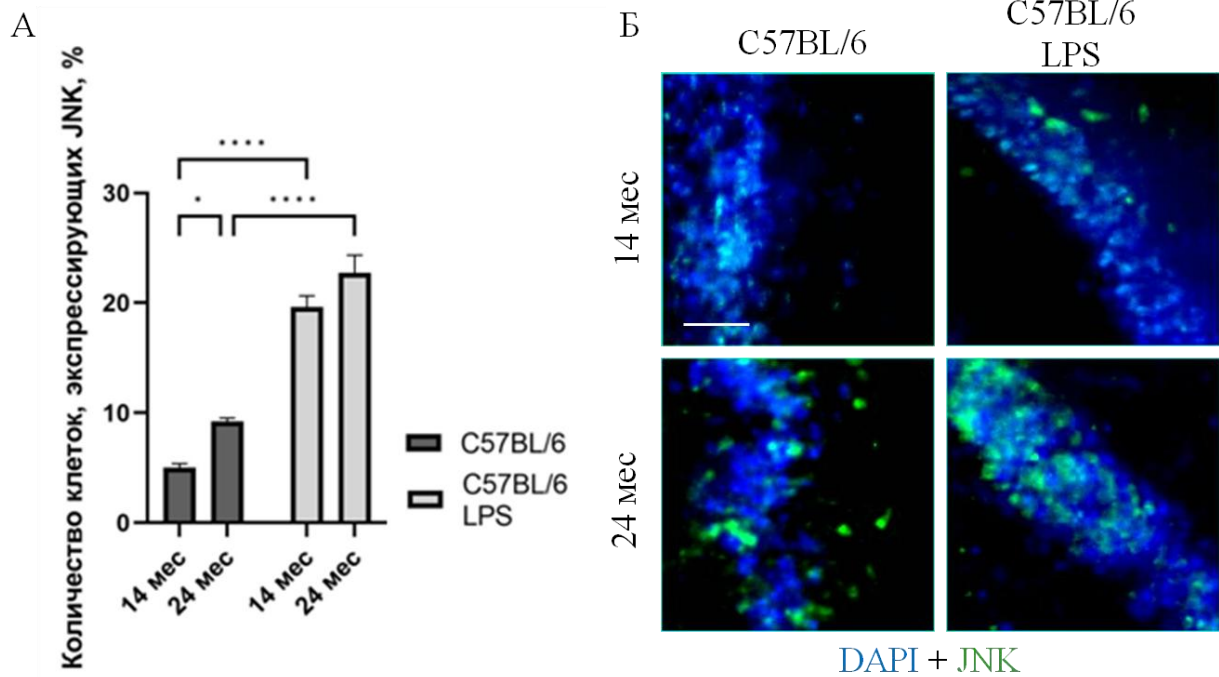


Рисунок 29 - (А) Количественный анализ экспрессии JNK в органотипических срезах гиппокампа. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия JNK (зеленый). Шкала 100 мкм.

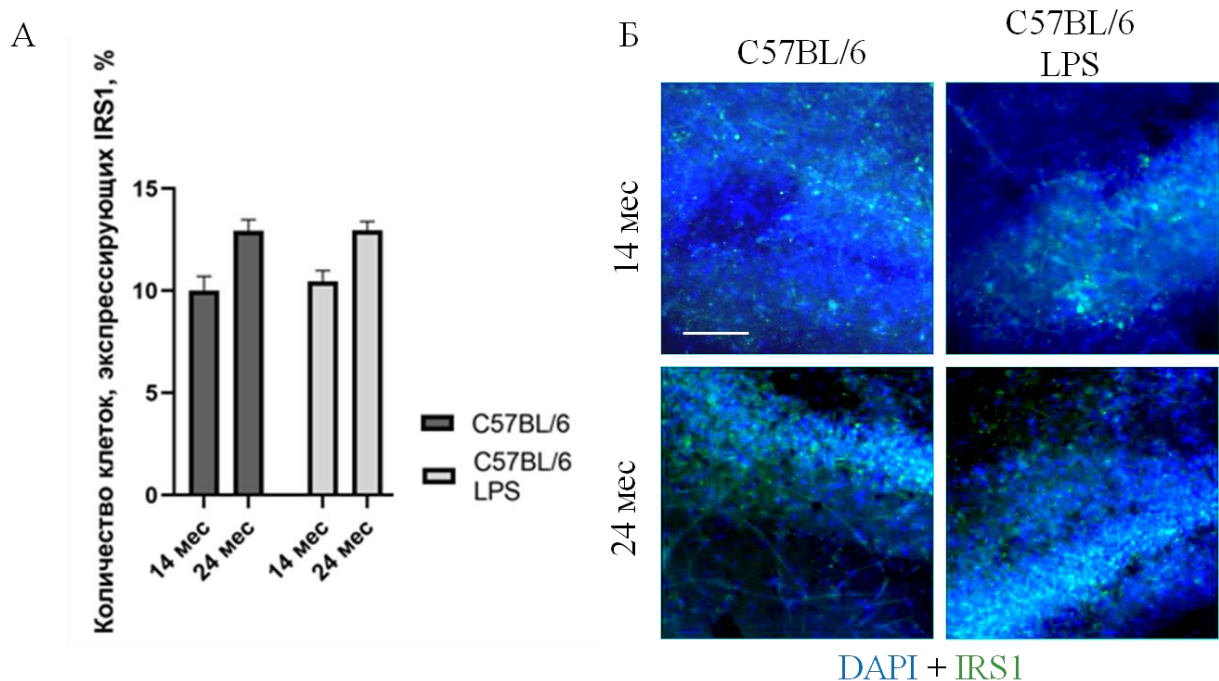


Рисунок 30 - (А) Количественный анализ экспрессии IRS1 в органотипических срезах гиппокампа. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия pIRS1-Ser – субстрата инсулиновых рецепторов (зеленый). Масштабная шкала – 100мкм.

При анализе экспрессии GLUT4 при множественном сравнении было обнаружено статистически значимое увеличение количества GLUT4+ клеток в срезах, полученных от 24-месячных мышей и культивированных в присутствии LPS ($27.84 \pm 0.91\%$) по сравнению с группой контроля ($23.04 \pm 1.01\%$) ($p=0.012$, Tukey's критерий) (Рисунок 31).

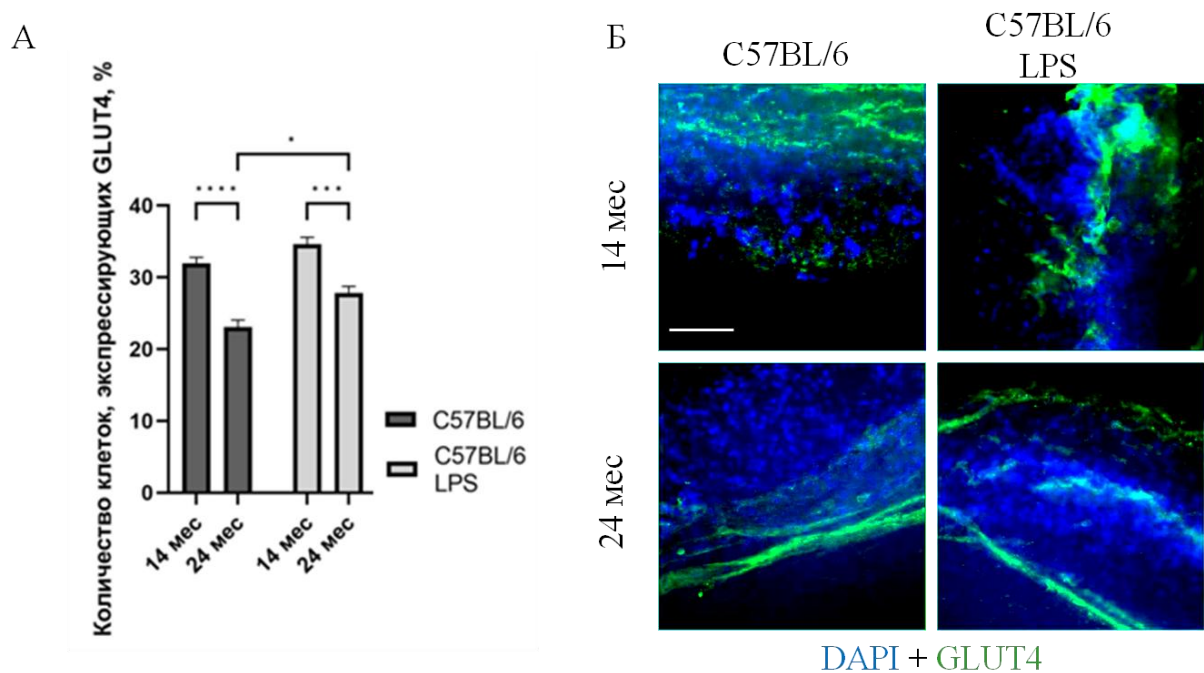


Рисунок 31 - (А) Количественный анализ экспрессии GLUT4 в органотипических срезах гиппокампа. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия GLUT4 (зеленый). Масштабная шкала – 100мкм.

3.3. Исследование эффектов фармакологической модуляции NLRP3-инфламмасом *in vitro* с использованием неспецифического блокатора глибенкламида на молекулярные механизмы метаболических нарушений и развития стареющего фенотипа клеток в головном мозге мышей дикого типа

3.3.1. Изучение сенесценции и развития SASP фенотипа в культурах клеток при аппликации глибенкламида

Способность глибенкламида ингибировать активацию NLRP3 инфламмасы и подавлять нисходящие воспалительные каскады, в том числе продукцию провоспалительных медиаторов клетками микроглии, определила целесообразность исследования его функциональных эффектов в клетках головного мозга, полученных от животных различных возрастных групп.

В первую очередь был проанализирован эффект глибенкламида на экспрессию компонентов NLRP3 инфламмасы, уровень IL-18 и HMGB1, а также формирование SASP-фенотипа. Результаты показали, что глибенкламид достоверно снижал экспрессию NLRP3 и секрецию IL-18, в то время как показатели SASP, включая экспрессию HMGB1 и активность SA- β -gal, оставались статистически неизменными. При анализе данных, полученных в сокультуре нейронов и астроцитов от животных разных возрастных групп, выявлено значимое влияние фактора возраста $F(1,20)=60.04$, $p<0.0001$. При множественном сравнении подтверждено, что клетки, полученные от мышей среднего возраста демонстрируют более высокую активность SA-beta-Gal (оптическая плотность 0.083 ± 0.005 у.е.) по сравнению с группой молодых животных (оптическая плотность 0.052 ± 0.001 у.е.) ($p<0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 32). При сравнении между собой экспериментальных групп клеток, культивируемых в отсутствии и в присутствии глибенкламида, статистически значимых отличий зафиксировано не было. Так, в группе молодых животных активность beta-галактозидазы составила 0.052 ± 0.001 у.е. в группе контроля и 0.046 ± 0.002 у.е. в группе глибенкламида ($p=0.7$, Tukey's критерий); в группе животных среднего

возраста- 0.083 ± 0.005 у.е. в группе контроля и 0.067 ± 0.003 у.е. в группе глибенкламида ($p=0.06$, Tukey's критерий).

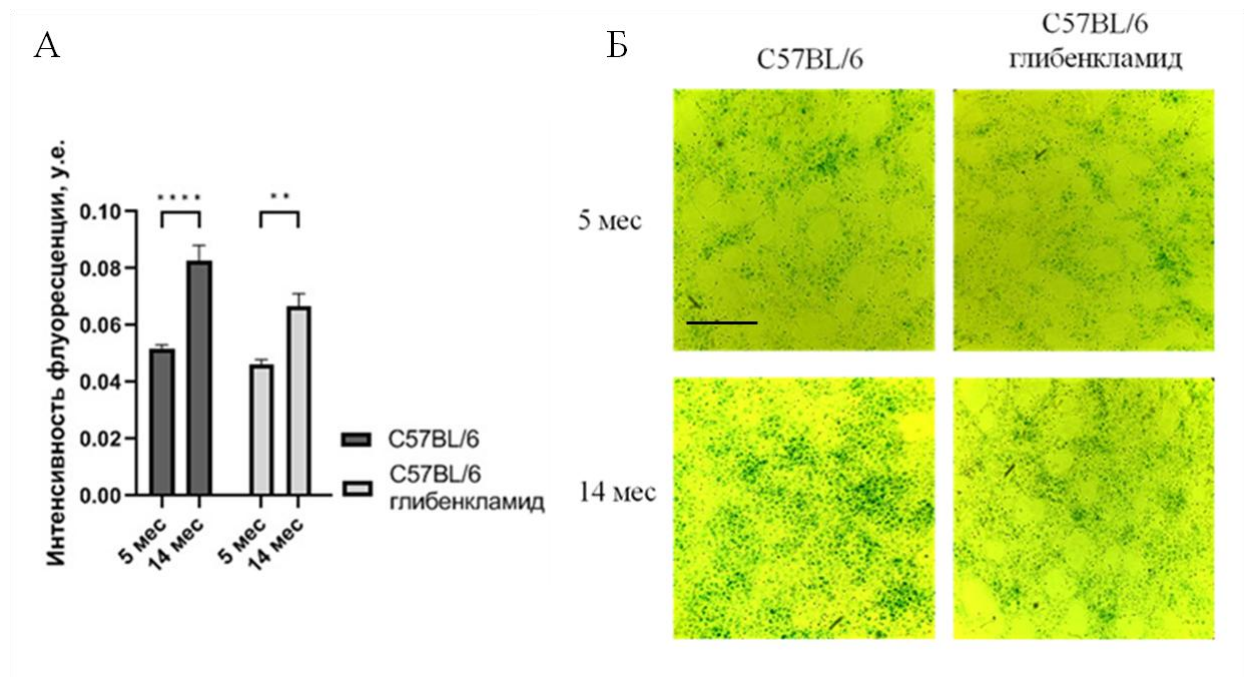


Рисунок 32 - (А) Количественный анализ активности SA-β-gal, представленный в виде оптической плотности в у.е. в сокультуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Репрезентативные снимки окраски SA-β-gal *in vitro*. Шкала 100 мкм.

При анализе экспрессии NLRP3 в культуре клеток *in vitro* было выявлено значимое влияние взаимодействия факторов возраста и воздействия блокатора $F(1,16)=12.32$, $p=0.003$, а также фактора возраста $F(1,16)=101.6$, $p<0.0001$ и воздействия блокатора $F(1,16)=39.41$, $p<0.0001$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от животных среднего возраста интенсивность флуоресценции NLRP3 была статистически значимо выше (15.64 ± 1.06 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от молодых мышей (5.92 ± 0.32 у.е.) ($p=0.0002$, Tukey's критерий) (Рисунок 33). После инкубации клеток в присутствии глибенкламида было обнаружено статистически значимое снижение экспрессии NLRP3 в обеих возрастных группах. После инкубации с глибенкламидом клеток, выделенных от молодых животных, интенсивность флуоресценции NLRP3 снижается до (3.94 ± 0.81 у.е.) относительно контрольной группы (5.92 ± 0.32 у.е.) ($p<0.0001$, Tukey's критерий); после

инкубации с глибенкламидом клеток, выделенных от животных среднего возраста, интенсивность флуоресценции NLRP3 также снижается до (8.64 ± 0.39 у.е.) относительно контрольной группы (5.12 ± 0.34 у.е.) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий).

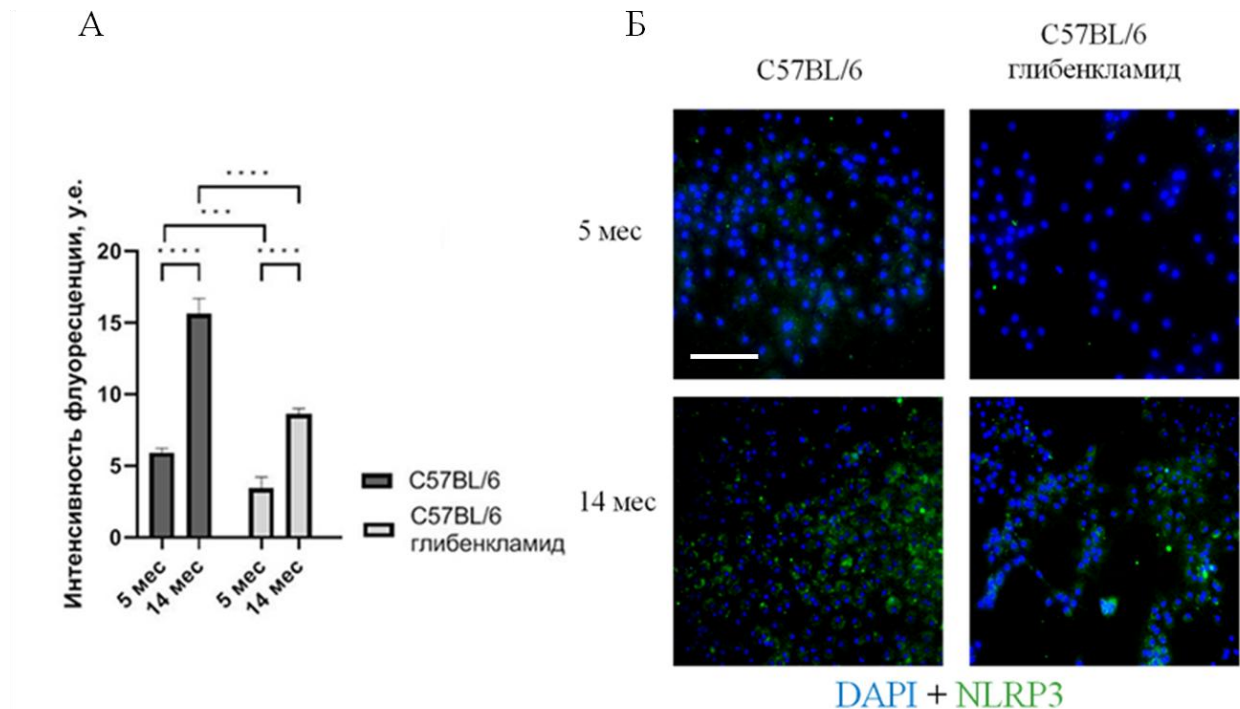


Рисунок 33 - (А) Количественный анализ экспрессии NLRP3 в сокультуре клеток в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия NLRP3 (зеленый). Шкала 100 мкм.

Аналогичные данные получены при анализе экспрессии IL18 в экспериментальных группах - выявлено значимое влияние фактора возраста $F(1,16)=110.6$, $p < 0.0001$ и воздействия блокатора $F(1,16)=114.2$, $p < 0.0001$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от животных среднего возраста интенсивность флуоресценции IL18 была статистически значимо выше (9.86 ± 0.41 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от молодых мышей (5.12 ± 0.34 у.е.) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 34). После инкубации клеток с глибенкламидом было обнаружено статистически значимое снижение экспрессии IL18 в обеих возрастных группах. Так, при культивировании клеток, выделенных от молодых животных, в среде с

добавлением глибенкламида интенсивность флуоресценции IL18 снижается до (2.30 ± 0.22 у.е.) относительно контрольной группы (5.12 ± 0.34 у.е.) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий); при культивировании клеток, выделенных от стареющих животных, в среде с добавлением глибенкламида интенсивность флуоресценции IL18 также снижается до (5.06 ± 0.41 у.е.) относительно контрольной группы (9.86 ± 0.41 у.е.) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий).

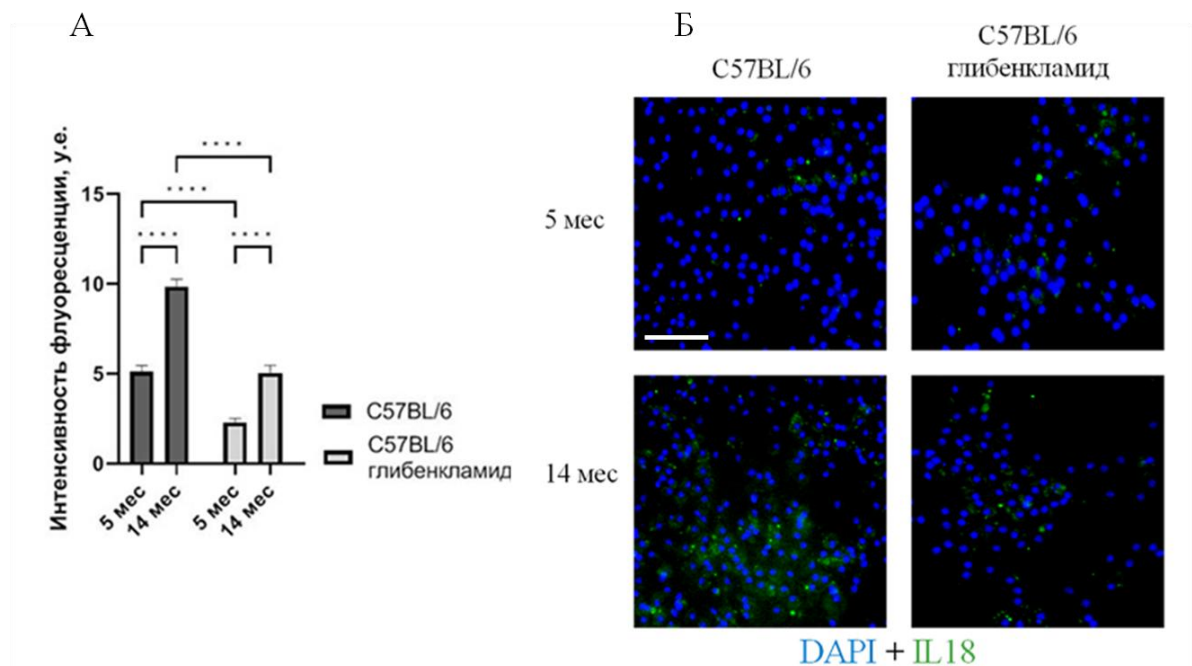


Рисунок 34 - (А) Количественный анализ экспрессии IL-18 в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия IL-18 (зеленый). Шкала 100 мкм.

При исследовании экспрессии белка HMGB1 было выявлено выявлено фактора возраста $F(1,16)=35.29$, $p < 0.0001$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от животных среднего возраста интенсивность флуоресценции HMGB1 была статистически значимо выше (6.30 ± 0.59 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от молодых мышей (1.92 ± 0.37 у.е.) ($p = 0.0011$, Tukey's критерий) (Рисунок 35). Согласно полученным результатам, уровень экспрессии HMGB1 не показал статистически значимых изменений под воздействием глибенкламида в культуральной среде, что наблюдалось в обеих исследованных возрастных группах. Так, в клетках,

полученных от молодых животных, интенсивность флуоресценции HMGB1 составляла 1.92 ± 0.37 у.е. в контроле и 2.48 ± 0.54 у.е. в экспериментальной группе после инкубации с глибенкламидом ($p=0.92$, Tukey's критерий); в клетках, полученных от животных среднего возраста в контрольной группе средняя интенсивность флуоресценции HMGB1 была равна 6.30 ± 0.59 у.е., в клетках опытной группы после инкубации с глибенкламидом - 5.86 ± 0.96 у.е. ($p=0.96$, Tukey's критерий).

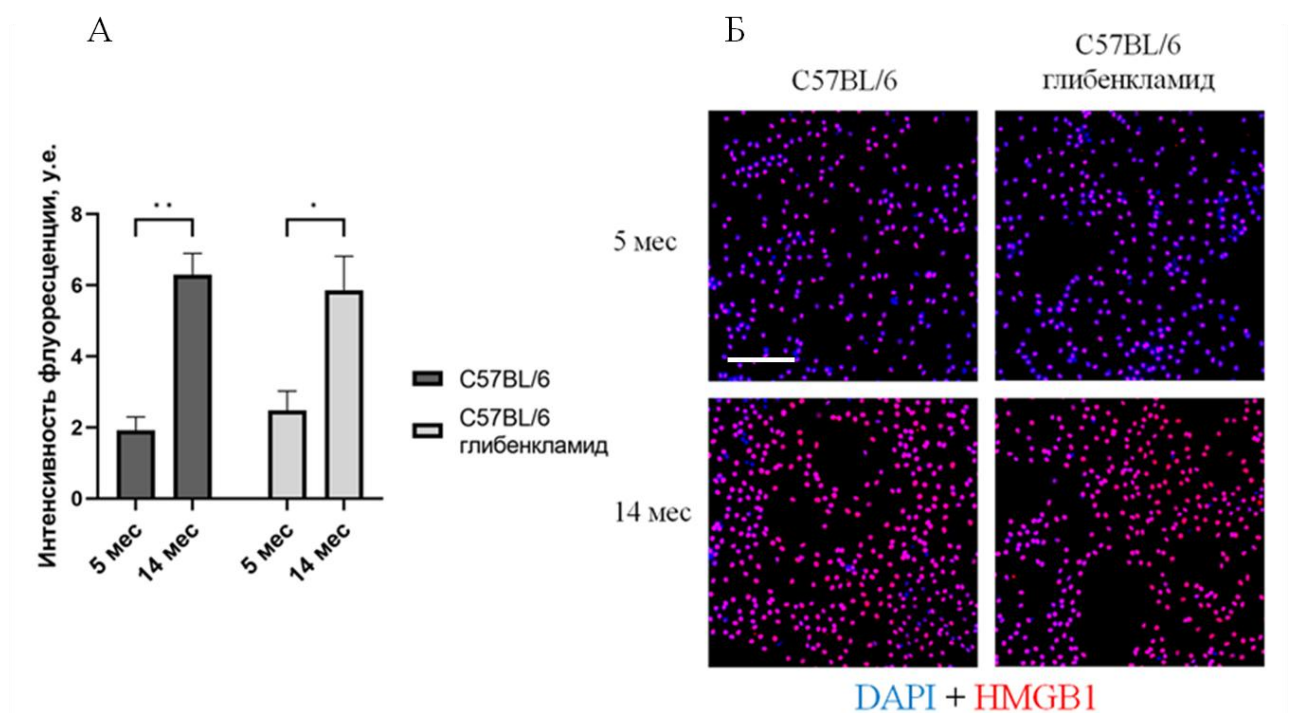


Рисунок 35 - (А) Количественный анализ экспрессии HMGB1 в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия HMGB1 (красный). Шкала 100 мкм.

Таким образом, инкубация с глибенкламидом приводит к снижению экспрессии маркеров NLRP3, IL18, но не влияет на иммуносенесцентные клетки, что также подтверждается отсутствием изменений в экспрессии HMGB1.

3.3.2. Изучение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом в культурах клеток при аппликации глибенкламида

В результате изучения экспрессии фосфорилированных форм протеинкиназ метафламмасомного комплекса было выявлено статистически значимое снижение экспрессии PKR и p-IKKbeta.

Установлено, что в сокультуре клеток, выделенных от животных среднего возраста, уровень экспрессии киназы IKKbeta статистически значимо выше (12.3 ± 0.69 у.е.), чем в клетках, полученных от молодых животных (8.36 ± 0.51 у.е.) ($p=0.0003$, критерий Tukey's) (Рисунок 36). При анализе влияния глибенкламида было выявлено, что интенсивность флуоресценции p-IKKbeta в клетках, полученных от молодых животных, имеет тенденцию к снижению с 8.36 ± 0.51 у.е. в контрольной группе до 6.44 ± 0.38 у.е. в группе клеток, инкубируемых с глибенкламидом ($p=0.067$, Tukey's); в клетках, полученных от животных среднего возраста интенсивность флуоресценции p-IKKbeta статистически значимо снижается с 12.30 ± 0.69 у.е. в контроле до 9.36 ± 0.45 у.е. ($p=0.0052$, Tukey's критерий) в клетках опытной группы после инкубации с глибенкламидом. В целом было выявлено статистически значимое влияние фактора возраста ($F(1,16)=43.30$, $p<0.0001$).

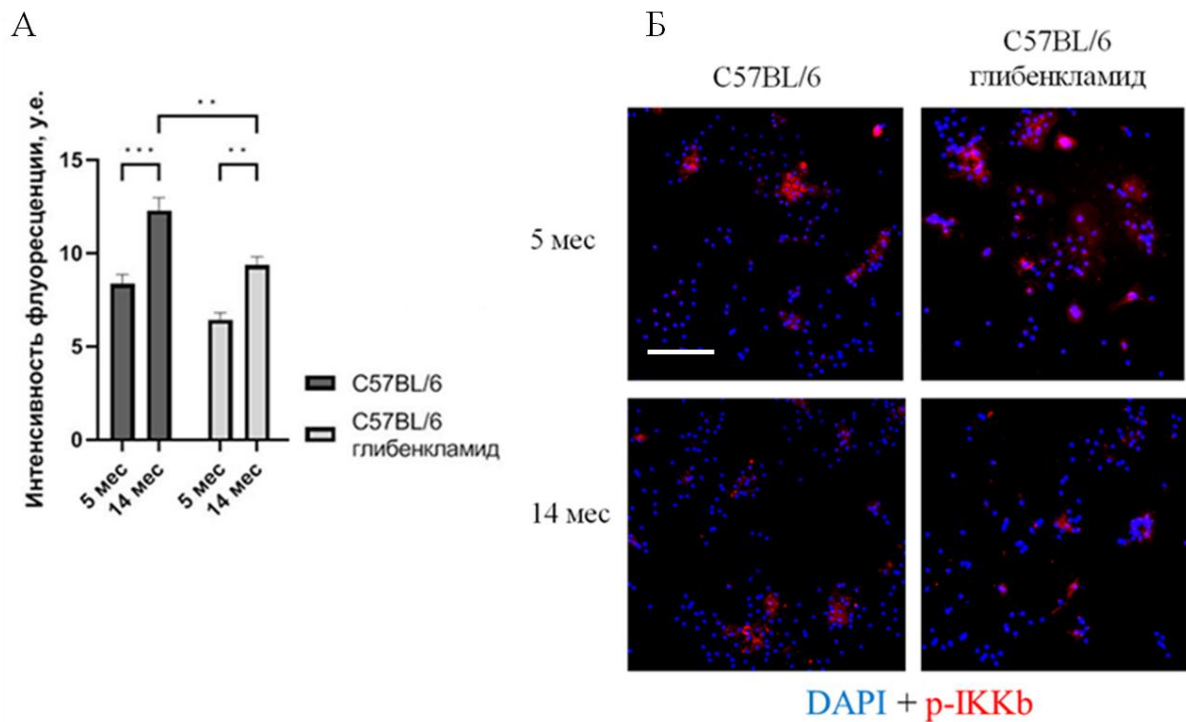


Рисунок 36 - (А) Количественный анализ экспрессии p-IKKb в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия p-IKKb (красный). Шкала 100 мкм.

Кроме того, в культуре клеток, выделенных от животных среднего возраста, количество клеток, экспрессирующих PKR оказалось в 5 раз выше (6.42 ± 0.26 %), чем в культуре, выделенной от молодых животных (1.22 ± 0.21 %) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 37). При оценке воздействия глиценкламида на уровень флуоресценции PKR в сокультуре астроцитов и нейронов было зафиксировано статистически значимое снижение с 6.42 ± 0.25 %. в контроле до 5.42 ± 0.19 % в сокультуре клеток, полученных от животных среднего возраста, инкубированных в присутствии глиценкламида ($p = 0.02$, Tukey's критерий). В целом было выявлено статистически значимое влияние фактора возраста ($F(1,16) = 511.0$, $p < 0.0001$), а также воздействия блокатора ($F(1,16) = 5.73$, $p = 0.02$).

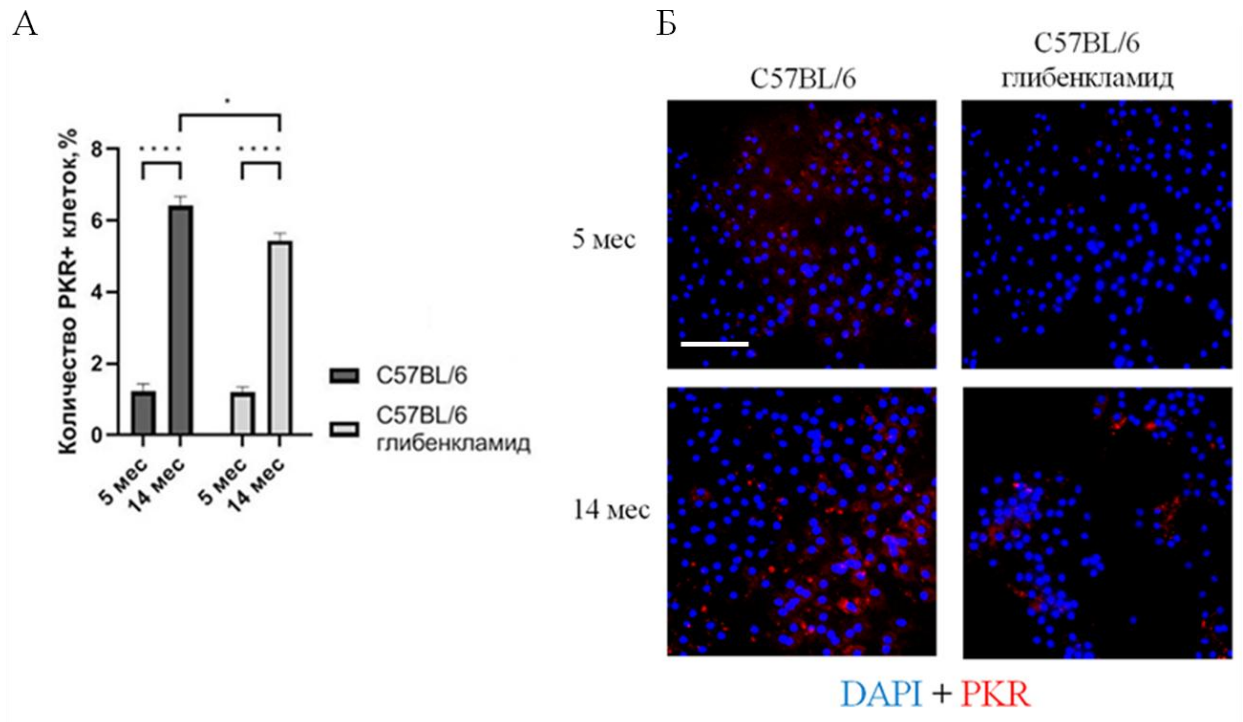


Рисунок 37 - (А) Количественный анализ экспрессии PKR в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия PKR (красный). Шкала 100 мкм.

При анализе экспрессии JNK нами также было выявлено значимое влияние взаимодействия факторов возраста и воздействия блокатора $F(1,16)=5.84$, $p=0.03$, фактора возраста $F(1,16)=168.8$, $p<0.0001$ и воздействия блокатора $F(1,16)=15.17$, $p=0.001$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от животных среднего возраста интенсивность флуоресценции JNK статистически значимо выше (6.38 ± 0.37 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от молодых мышей (1.92 ± 0.31 у.е.) ($p<0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 38). При анализе влияния глибенкламида было выявлено, что при культивировании клеток, выделенных от животных среднего возраста, в среде с добавлением глибенкламида интенсивность флуоресценции JNK статистически значимо снижается до 4.55 ± 0.21 у.е. относительно контрольной группы (6.38 ± 0.37 у.е.) ($p=0.002$, Tukey's критерий).

Таким образом, глибенкламид, приводит к снижению фосфорилированных форм протеинкиназ метафламмасом, причем данный эффект более выражен у мышей среднего возраста, вероятно, за счет снижения NLRP3 и IL18.

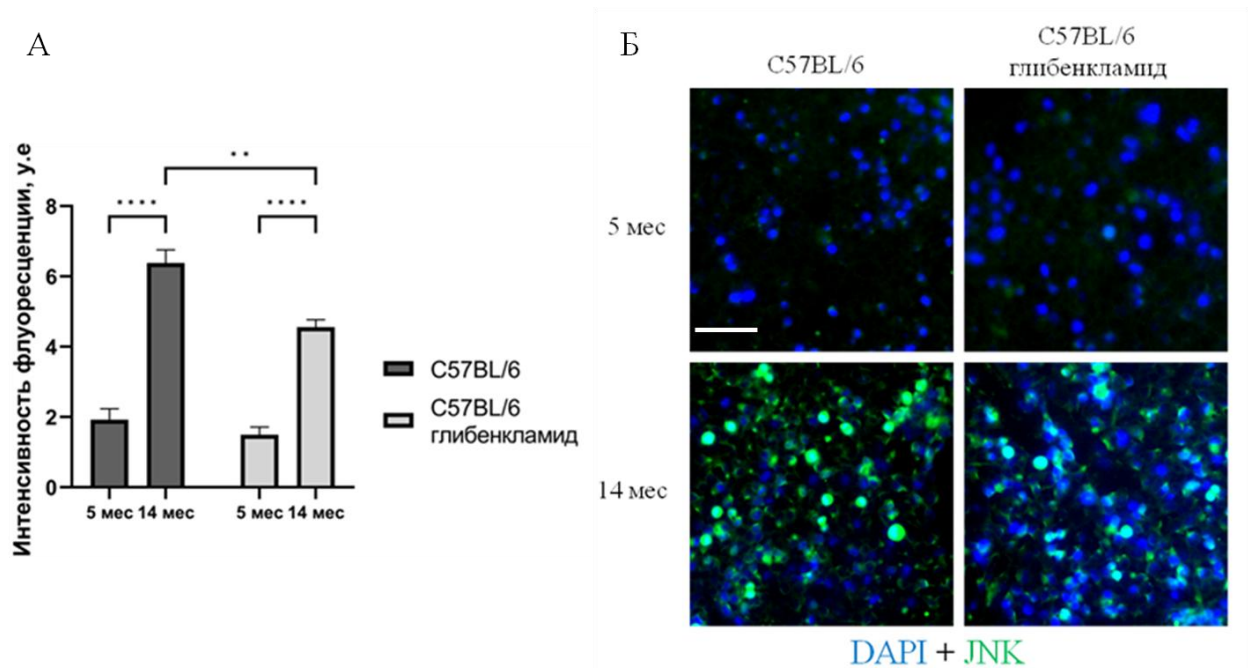


Рисунок 38 - (А) Количественный анализ экспрессии JNK в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия JNK (зеленый). Шкала 50 мкм.

3.3.3. Изучение экспрессии маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности в культурах клеток при аппликации глибенкламида

Было выявлено статистически значимое увеличение экспрессии инсулиновых рецепторов только при обработке клеток глибенкламидом (с 8.56 ± 0.23 у.е в контроле до 11.58 ± 0.52 у.е. в группе глибенкламида) ($p=0,014$, Tukey's критерий), что подтверждает его стимулирующее действие на рецепторы инсулина (Рисунок 39).

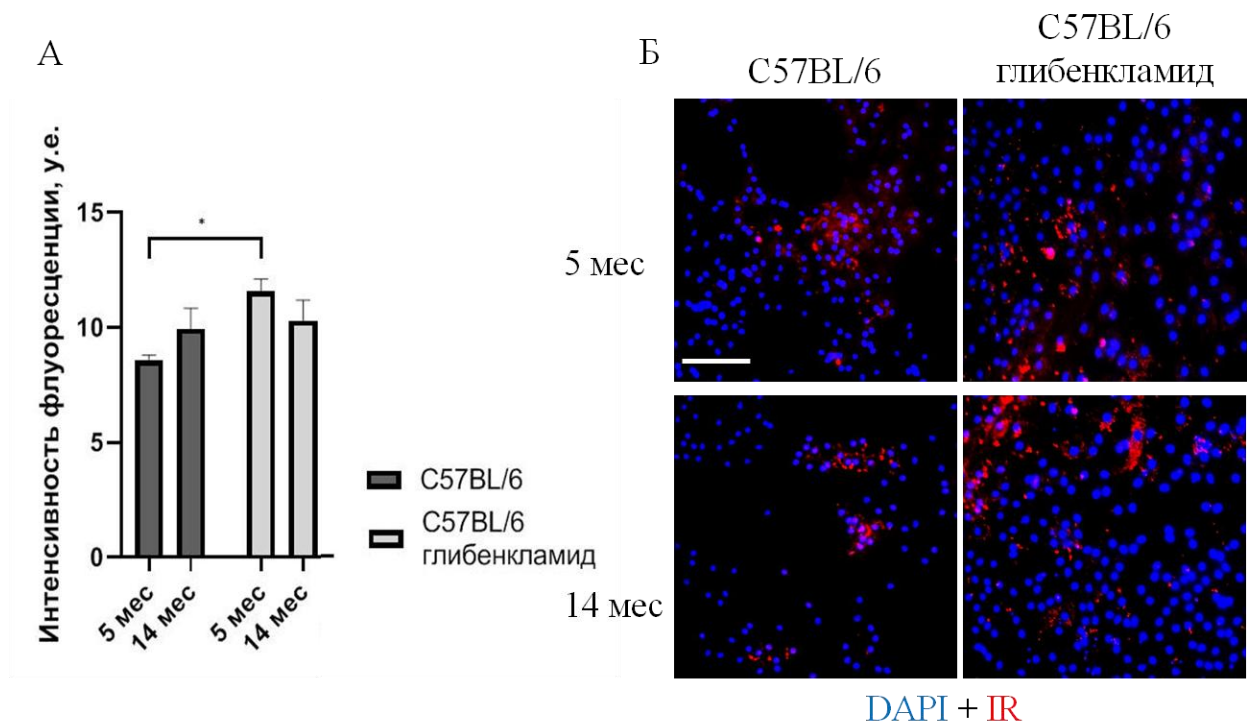


Рисунок 39 - (А) Количественный анализ экспрессии IR в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия IR (красный). Шкала 100 мкм.

При анализе экспрессии фосфорилированного IRS1 в культурах клеток *in vitro*, полученных от животных разных экспериментальных групп не было выявлено статистически значимых различий в группе животных среднего возраста (10.72 ± 1.13 у.е.) и молодых мышей (13.36 ± 1.02 у.е.) ($p=0.28$, Tukey's критерий) (Рисунок 40). Глибенкламид также не оказал статистически значимого влияния на экспрессию pIRS-Ser ни у мышей среднего возраста (10.72 ± 1.13 у.е. в группе контроля и 10.44 ± 0.78 у.е. в группе глибенкламида) ($p=0.99$, Tukey's критерий), ни у молодых мышей (13.36 ± 1.02 у.е. в группе контроля и 10.56 ± 0.97 у.е. в группе глибенкламида) ($p=0.22$, Tukey's критерий).

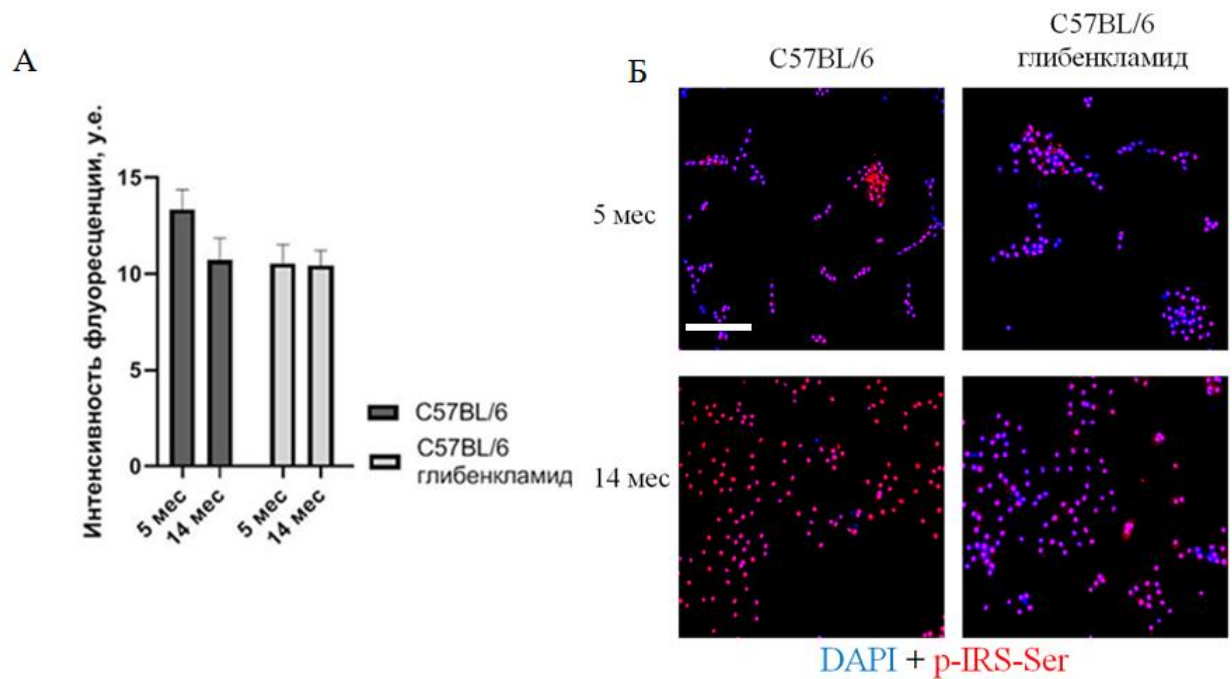


Рисунок 40 - (А) Количественный анализ экспрессии p-IRS-Ser в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия p-IRS-Ser (красный). Шкала 100 мкм.

Тем не менее в нижележащем пути инсулиновой сигнализации было отмечено снижение экспрессии GLUT4 при старении во всех исследуемых группах, что может указывать на развитие изменений инсулиновой сигнализации с возрастом (Рисунок 41). Так, интенсивность флуоресценции GLUT4 в клетках, полученных от зрелых мышей контрольной группы (24.2 ± 2.22 у.е.) статистически значимо ниже, чем группе молодых животных (30.8 ± 1.5 у.е.); в клетках, полученных от зрелых животных в группе глибенкламида (24.1 ± 1.2 у.е.) ниже, чем в клетках, полученных от молодых животных молодых животных и также подвергшихся воздействию глибенкламида (31.0 ± 1.9 у.е.) ($p < 0,005$, Tukey's критерий).

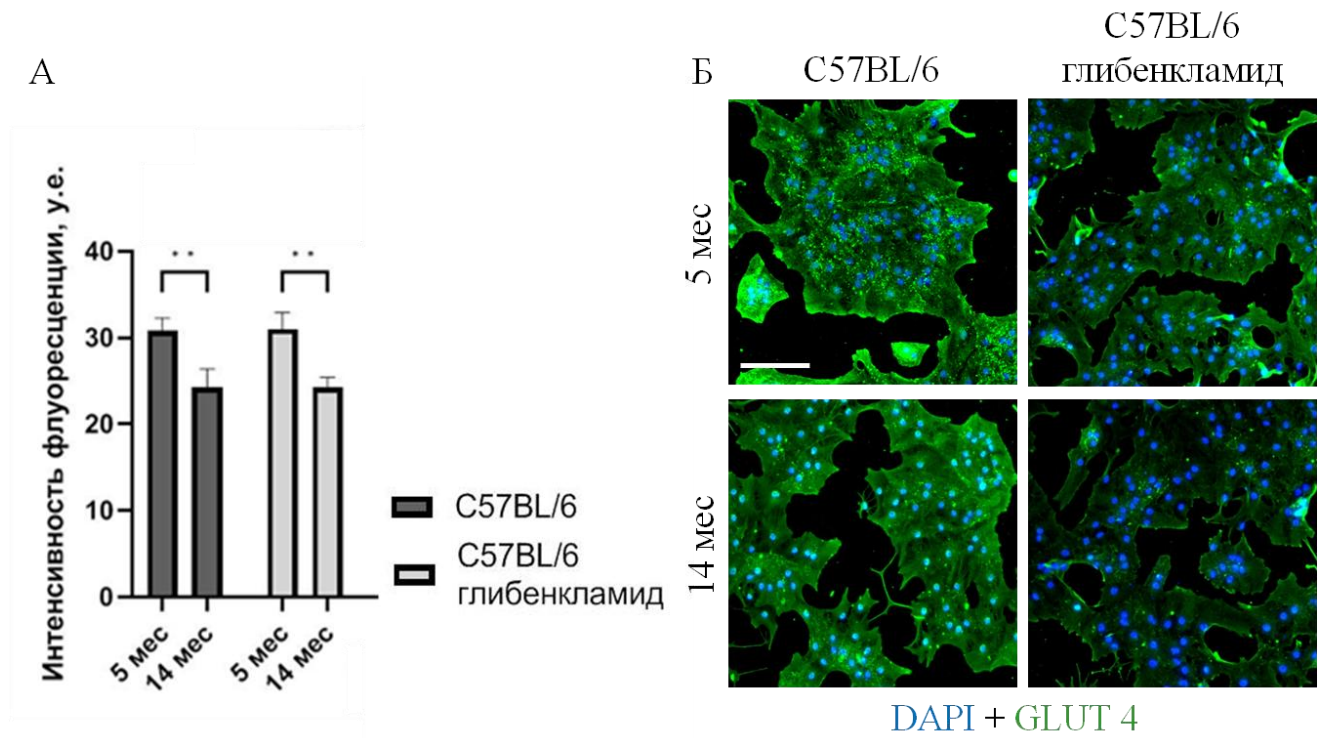


Рисунок 41 - (А) Количественный анализ экспрессии GLUT4 в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия GLUT4 (зеленый). Шкала 50 мкм.

В данном исследовании было обнаружено, что старение приводит к сверхэкспрессии GSK3 β в культуре клеток при старении в контрольной группе ($13.2 \pm 0.86\%$ в группе зрелых животных и $4.6 \pm 0.68\%$ в группе молодых животных) ($p < 0,0001$, Tukey's критерий) и при аппликации глибенкламида ($9.6 \pm 0.51\%$ и $3.6 \pm 0.52\%$ соответственно) ($p < 0,0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 42). При этом культивирование клеток, полученных от зрелых животных, в присутствии глибенкламида приводило статистически значимому снижению экспрессии GSK3 β с $13.2 \pm 0.86\%$ до $9.6 \pm 0.51\%$ ($p < 0,005$, Tukey's критерий).

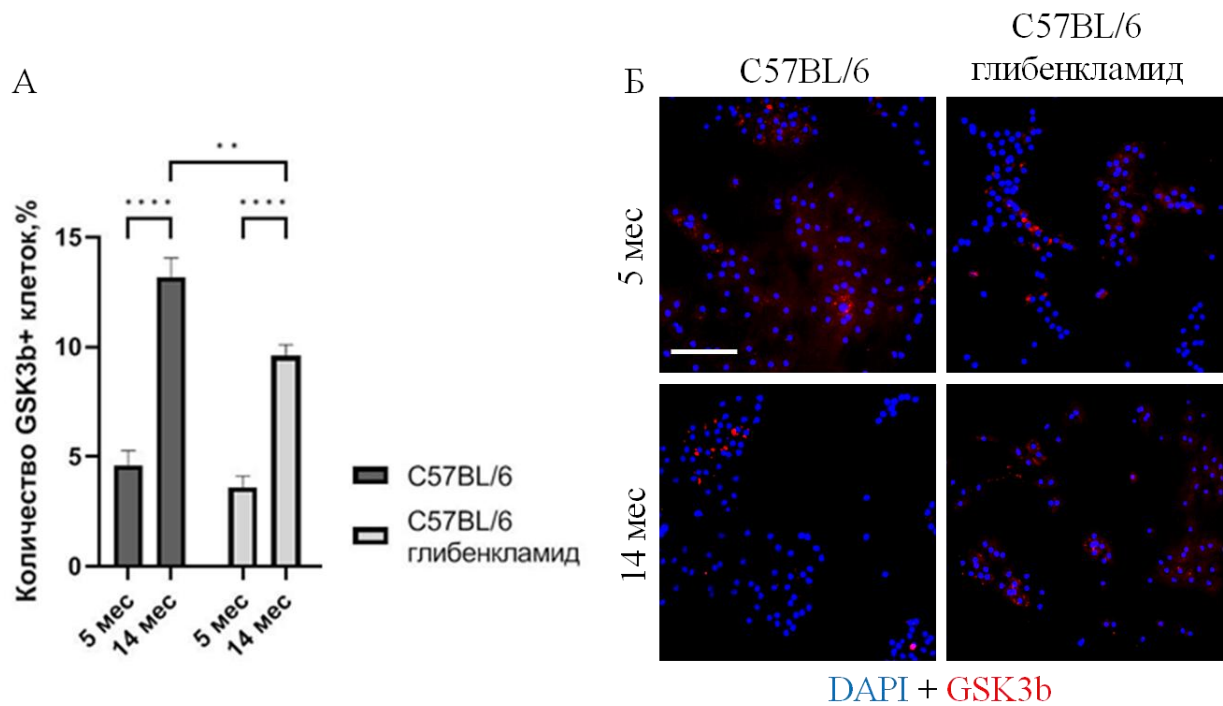


Рисунок 42 - (А) Количественный анализ экспрессии GSK3 β в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия GSK3beta (красный). Шкала 50 мкм.

При анализе экспрессии pAkt нами было выявлено значимое влияние фактора возраста $F(1,16)=18.65$, $p=0.0005$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от животных среднего возраста интенсивность флуоресценции pAkt была статистически значимо выше (3.07 ± 0.31 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от молодых мышей (1.02 ± 0.18 у.е.) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 43). При сравнении экспрессии pAkt клетками, выделенными от животных среднего возраста, в среде с добавлением глибенкламида и без добавления глибенкламида статистически значимых отличий выявлено не было, однако при культивировании клеток, выделенных от стареющих животных, в среде с добавлением глибенкламида интенсивность флуоресценции pAkt имеет тенденцию к снижению до (2.20 ± 0.59 у.е.) относительно контрольной группы (3.07 ± 0.31 у.е.) ($p=0.2$, Tukey's критерий).

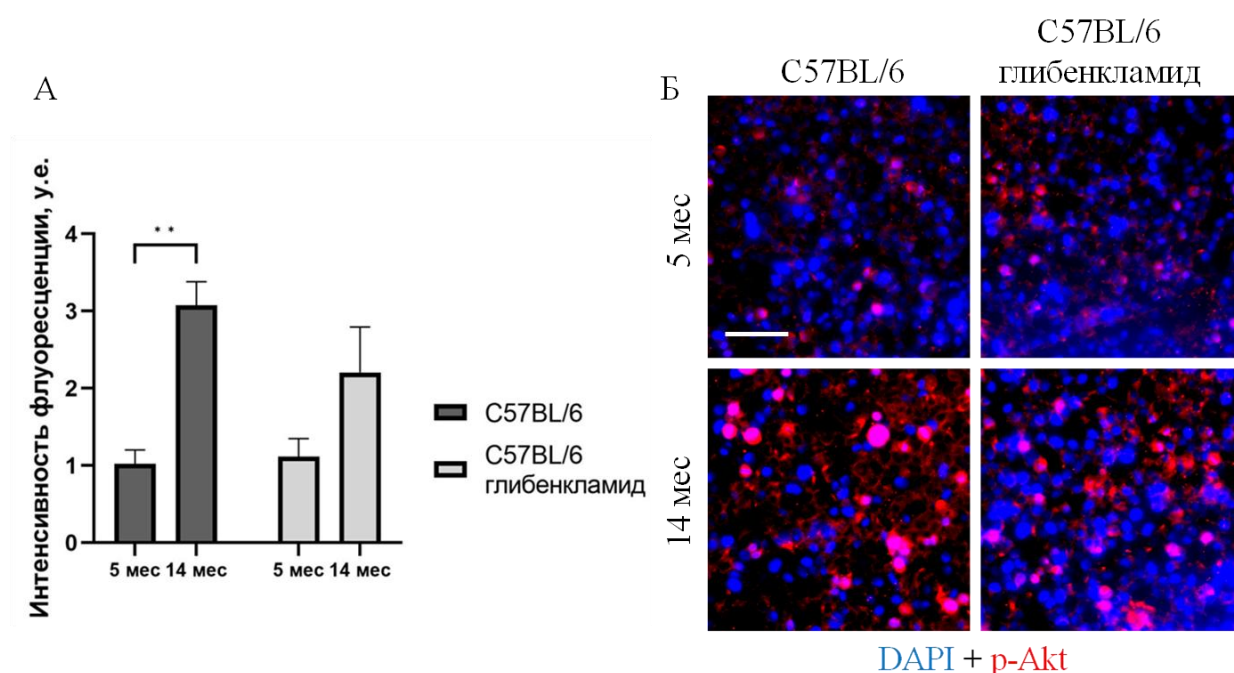


Рисунок 43 - (А) Количественный анализ экспрессии p-Akt в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия p-Akt (красный). Шкала 50 мкм.

3.4. Исследование эффектов фармакологической модуляции NLRP3-инфламмасом с использованием специфического блокатора MCC950 на молекулярные механизмы метаболических нарушений и развития стареющего фенотипа клеток в головном мозге мышей дикого типа

3.4.1. Результаты поведенческого тестирования животных после введения MCC950

Анализ формирования контекстуальной памяти страха в первый день кондиционирования выявил статистически значимые различия между группами 12-месячных животных, получавших MCC950 и DMSO ($p \leq 0,01$). Кроме того, в группе, получавшей MCC950, были обнаружены достоверные межвозрастные различия ($p \leq 0,05$). Выявлено значимое влияние взаимодействия факторов ($F(1, 21) = 11,59, p = 0,0027$). В первый день мыши с введением блокатора замирали меньше, чем мы контрольной группы (Рисунок 44). Эти данные согласуются с

более ранними, уже опубликованными нашими данными о роли NLRP3 на кондиционирование страха, когда мыши с нокаутом NLRP3 демонстрировали поведение, связанное с нарушением этапов приобретения памяти [121].

На второй день тестирования при анализе контекстной памяти сравнивали время замирания между четырьмя группами: MCC950 – мыши дикого типа с введением MCC950 (блокатора NLRP3) в возрасте 12 месяцев и 24-25 месяцев; DMSO– мыши дикого типа с введением растворителя DMSO (контрольная группа) в возрасте 12 месяцев и 24-25 месяцев. Было выявлено статистически значимое влияние фактора возраста ($F(1, 17) = 29,61; p < 0,0001$) и вводимого вещества ($F(1, 17) = 9,084, p = 0,0078$), при этом влияния взаимодействия двух факторов не было выявлено ($F(1, 17) = 1,591; p = 0,2243$). Также отмечается увеличение времени замирания во второй попытке у животных 24-25 возрастом месяцев в сравнении с мышами возраста 12 месяцев как в группе с введением DMSO, там и MCC950, что может свидетельствовать, вероятно, о повышении тревожности генерализации контекста от стресса ввиду перенесенной инъекции накануне тестирования.

В сигнальный (третий) день проведения теста fear conditioning в новой среде выявлено статистически значимое влияния взаимодействия двух факторов ($F(1, 21) = 10,85; p = 0,0035$). Время замирания у мышей среднего возраста и стареющих на третий сигнальный день не отличалось, что говорит о том, что возраст не влияет на сигнальную память у мышей после введения блокатора. Аналогичные данные были получены при изучении поведения у мышей с генетической делецией NLRP3. Таким образом, можно сделать вывод, что ген NLRP3 имеет защитный генотип при старении, а также и инъекция блокатора может иметь влияние на сигнальную память (также известную как сенсорная память), относящуюся к способности мозга кратковременно сохранять поступающую из окружающей среды сенсорную информацию).

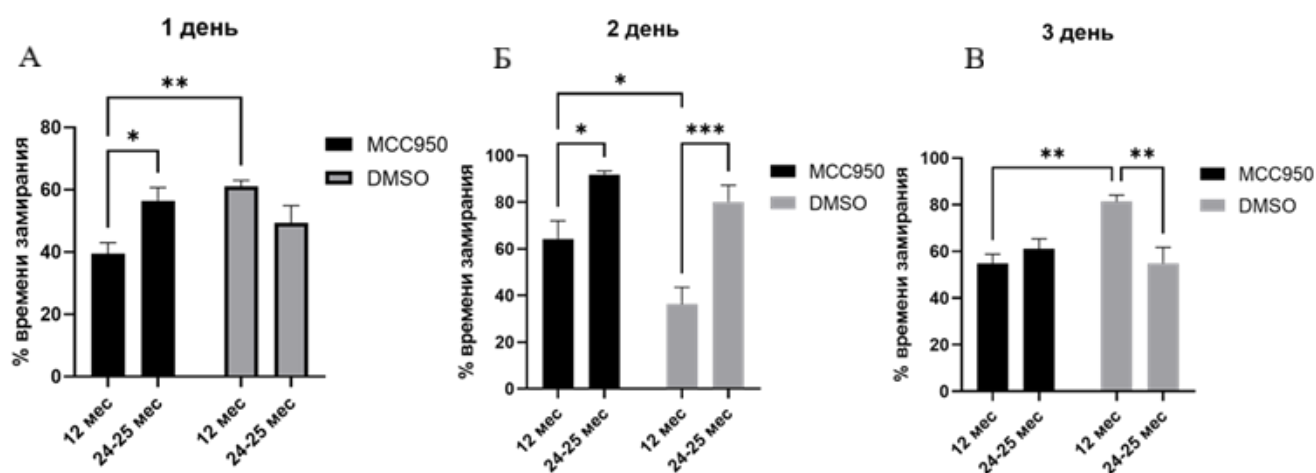


Рисунок 44 – (А) Процент времени замирания в первый день создания условий для запоминания в тесте «Условно-рефлекторного замирания». (Б) Процент времени замирания во второй день создания условий для запоминания в тесте «Условно-рефлекторного замирания». (В) Процент времени замирания в контекстный день. MCC950 – мыши дикого типа с введением MCC950 (блокатора NLPR3); DMSO– мыши дикого типа с введением растворителя DMSO (контрольная группа).

3.4.2. Изучение сенесценции и развития SASP фенотипа при модуляции NLRP3 прямым блокатором MCC950

При исследовании активности beta-галактозидазы в гиппокампе была подтверждена индукция SA-beta-Gal при старении мышей с введением DMSO (контрольная группа), однако у животных с введением MCC950 количество сенесцентных клеток оставалось стабильным и не демонстрировало возраст-зависимого увеличения между 12 и 24-25 месяцами (Рисунок 45). Было выявлено значимое влияние взаимодействия факторов ($F(1, 36) = 13,61$; $p=0,0007$), а также влияние возраста ($F(1, 36) = 13,52$; $p=0,0008$) и вводимого вещества ($F(1, 36) = 22,87$; $p<0,0001$). При проведении множественного сравнения с помощью критерия Tukey's было подтверждено, что клетки в гиппокампе мышей с введением DMSO в возрасте 24-25 месяцев отмечается более высокий процент сенесцирующих клеток ($8,27 \pm 0,66$ % площади сенесцентных клеток) по сравнению с группой возрастом 12 месяцев ($4,88 \pm 0,33$ % площади сенесцентных клеток) ($p<0,0001$ Tukey's критерий). При сравнении между собой групп мышей в

возрасте 24-25 месяцев было выявлено, что площадь сенесцентных клеток при старении у мышей с введением блокатора инфламماسом MCC950 ниже ($4,376 \pm 0.46$ % площади сенесцентных клеток) по сравнению с мышами, которым вводили раствор DMSO ($8,267 \pm 0.66$ % площади сенесцентных клеток) ($p < 0,0001$, Tukey's критерий).

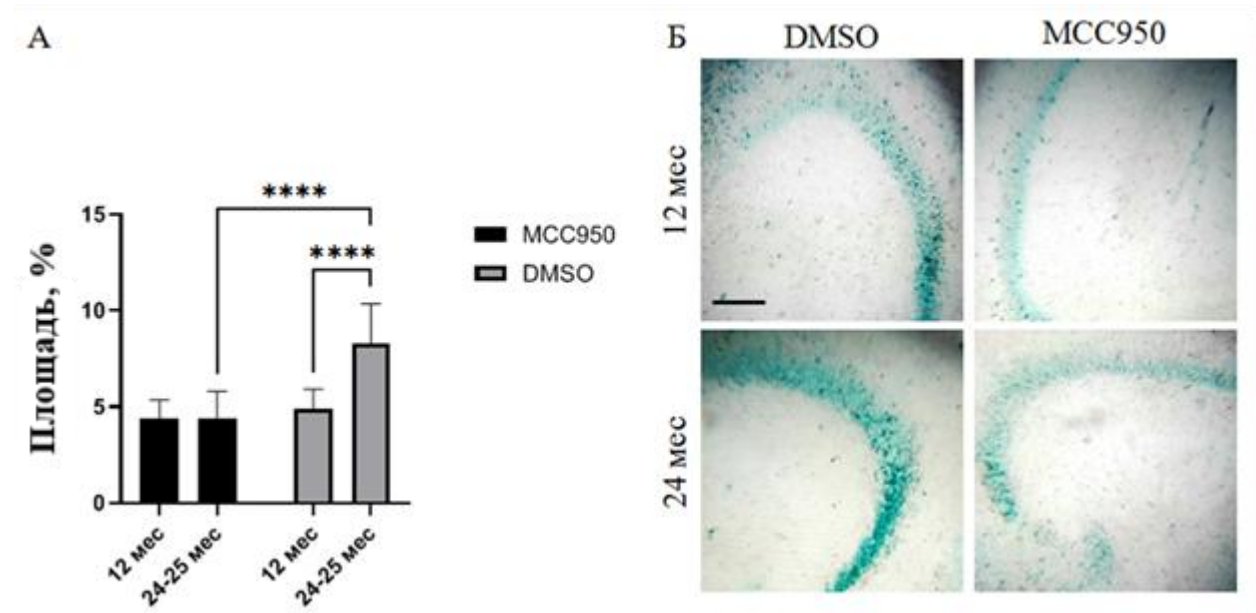


Рисунок 45 – (А) Репрезентативные снимки окраски SA-β-gal in vivo. Голубое окрашивание идентифицирует сенесцентные клетки. (Б) Количественный анализ SA-β-gal + клеток, представленный в виде занимаемой площади на срезах. MCC950 – мыши дикого типа с введением MCC950 (блокатора NLPR3); DMSO– мыши дикого типа с введением растворителя DMSO (контрольная группа). Шкала 100 мкм.

При изучении активности beta-галактозидазы в сокультуре нейронов и астроцитов от животных разных возрастных групп, выявлено значимое влияние фактора возраста $F(1,20)=31.05$, $p < 0.0001$. При множественном сравнении подтверждено, что клетки, полученные от стареющих мышей демонстрируют более высокую активность SA-beta-Gal (оптическая плотность 0.17 ± 0.02 у.е.) по сравнению с группой зрелых животных (оптическая плотность 0.083 ± 0.005 у.е.) ($p < 0.003$, Tukey's критерий) (Рисунок 46). Также нами не обнаружено статистически значимого влияния MCC950 на активность beta-галактозидазы. Так, в группе животных среднего возраста активность beta-галактозидазы составила 0.083 ± 0.005 у.е. в группе контроля и 0.06 ± 0.004 у.е. в группе MCC950

($p=0.7$, Tukey's критерий); в группе стареющих животных - 0.17 ± 0.02 у.е. в группе контроля и 0.143 ± 0.022 у.е. в группе MCC950 ($p=0.6$, Tukey's критерий).

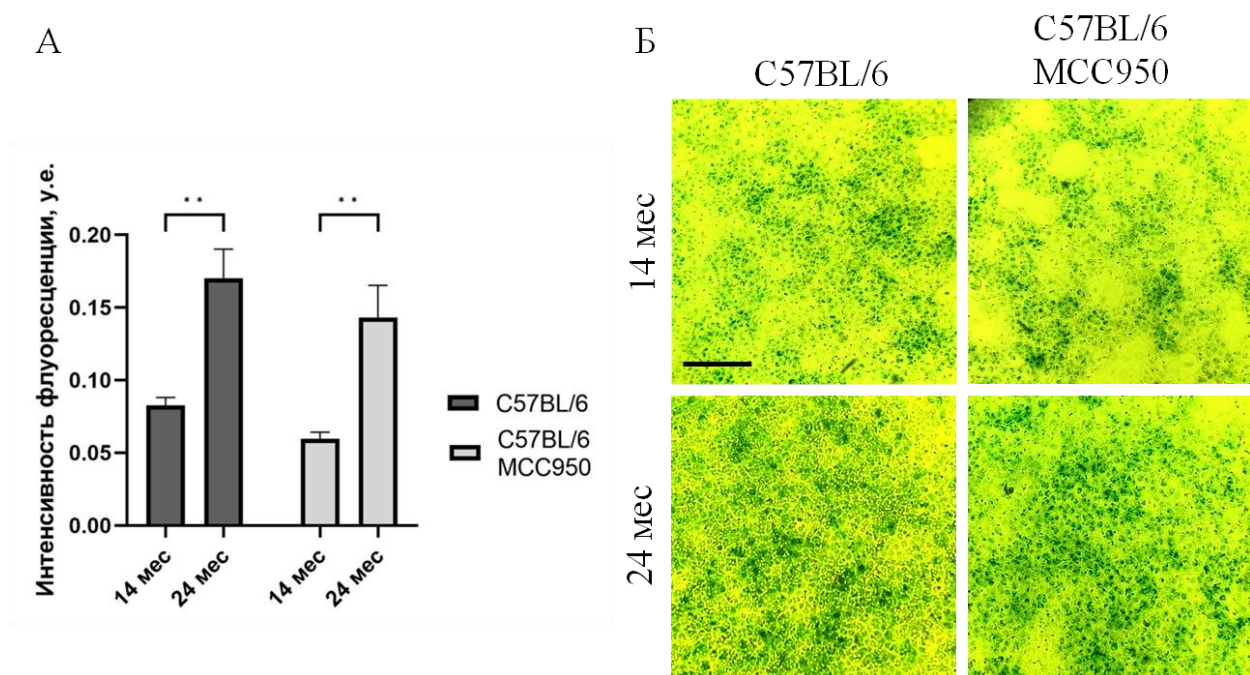


Рисунок 46 - (А) Количественный анализ SA-β-gal + клеток, представленный в виде оптической плотности в у.е. в сокультуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Репрезентативные снимки окраски SA-β-gal *in vitro*.

Таким образом, с возрастом у животных контрольной группы наблюдается накопление сенесцентных клеток. В то же время применение специфического ингибитора NLRP3 — MCC950 — оказывает протективное действие, снижая вероятность формирования секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP).

Далее проводилось исследование изменения экспрессии мультибелкового комплекса инфламмосомы NLRP3, а также ее экспрессии на астроцитах (коэкспрессия с GFAP) и нейронах (коэкспрессия с NeuN) (Рисунок 47, 48). При оценке экспрессии NLRP3 было выявлено значимое влияние вводимого вещества ($F(1, 43) = 87,54$; $p < 0,0001$), комбинации факторов (возраста и вводимого вещества ($F(1, 43) = 26,56$; $p < 0,0001$)). При множественном сравнении было обнаружено, что в клетках гиппокампа животных дикого типа в возрасте 12 месяцев с введением MCC950 процент NLRP3+ клеток значимо ниже ($4,02\pm0,24$)

по сравнению с группой мышей с введением DMSO ($10,59 \pm 0,58$) ($p < 0,0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 22). Схожая тенденция отмечена у животных в возрасте 24-25 месяцев с введением MCC950 ($6,36 \pm 0,43$) при сравнении с мышами с введением DMSO ($8,26 \pm 0,5$), но с менее выраженной разницей ($p = 0,0261$, Tukey's критерий). При этом при сравнении экспрессии NLRP3 у животных с применением MCC950 отмечается повышение уровня экспрессии к 24-25 месяцам ($p = 0,0033$, Tukey's критерий), в то время как у мышей с вводимым DMSO количество NLRP3+ с возрастом снижается ($p < 0,0001$, Tukey's критерий).

Логичным продолжением данной ситуации является значимое влияние вводимого вещества ($F(1, 43) = 81,15$; $p < 0,0001$), комбинации факторов (возраста и вводимого вещества ($F(1, 43) = 21,55$; $p < 0,0001$) на процент коэкспрессии NLRP3 и GFAP. Схожая тенденция выявлена при оценке экспрессии NLRP3 на нейронах : обнаружено влияние вводимого вещества ($F(1, 43) = 40,39$; $p < 0,0001$), комбинации факторов (возраста и вводимого вещества ($F(1, 43) = 17,22$; $p = 0,0002$).

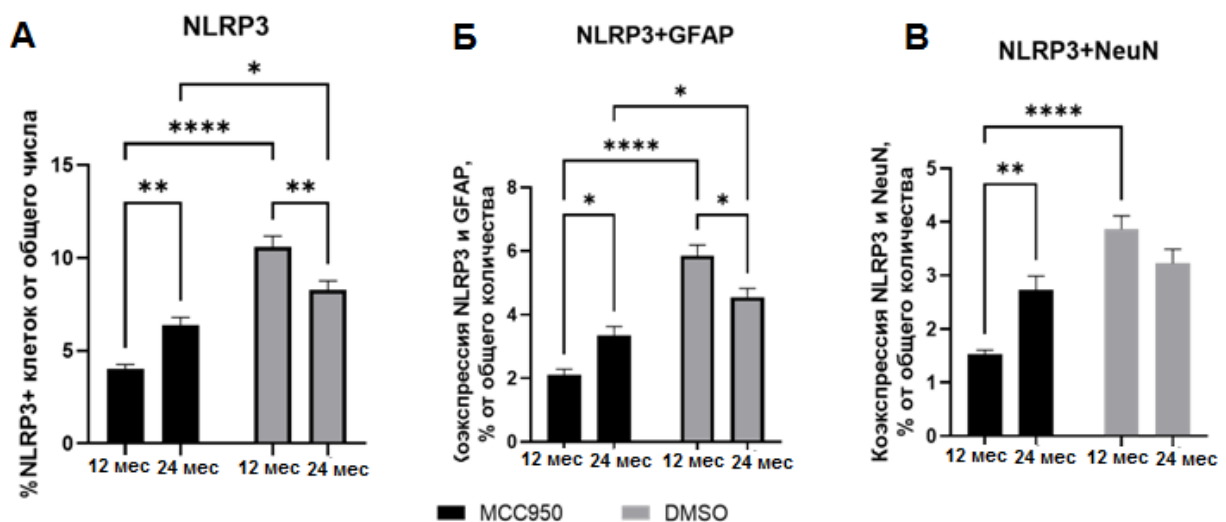


Рисунок 47 - Количество клеток (в % от общего количества клеток), экспрессирующих NLRP3 (А), коэкспрессирующих NLRP3 и GFAP (Б), коэкспрессирующих NLRP3 и NeuN (В) в зубчатой извилине гиппокампа животных в возрасте 12 и 24-25 месяцев. MCC950 – мыши дикого типа с введением MCC950 (блокатора NLRP3); DMSO – мыши дикого типа с введением растворителя DMSO (контрольная группа).

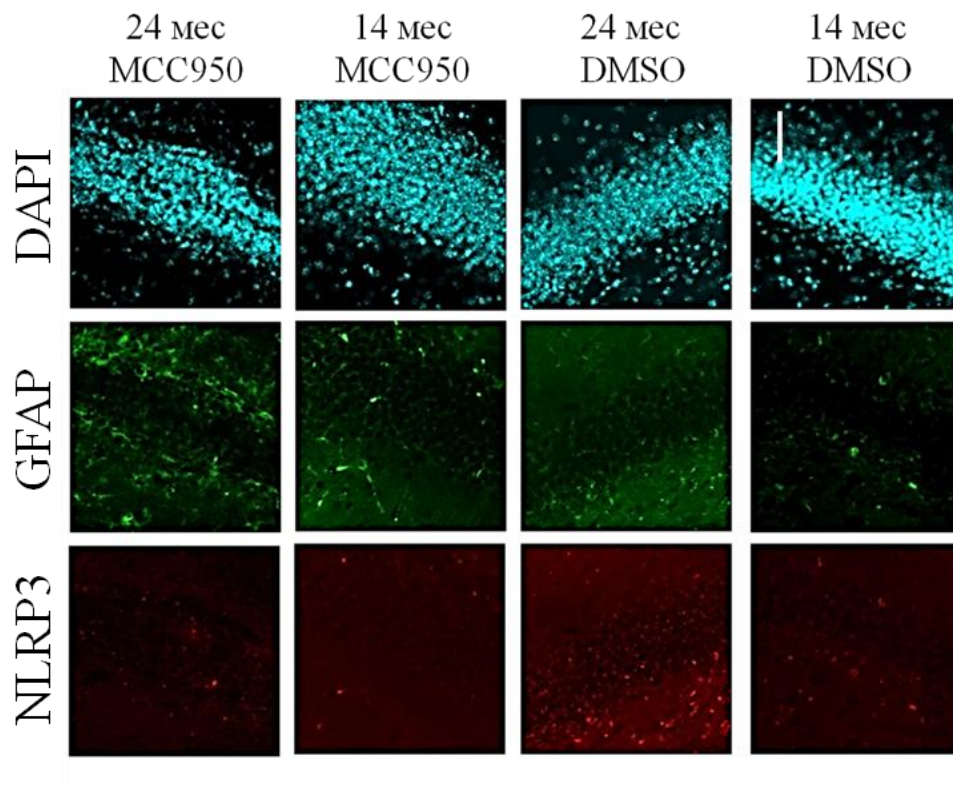


Рисунок 48 - Комбинированное иммуофлуоресцентное окрашивание в группах мышей в возрасте 14 и 24 месяцев с введением MCC950 и DMSO: ядра клеток прокрашены DAPI (голубой), экспрессия GFAP (зеленый), NLRP3 (красный). Шкала 100 мкм

При анализе экспрессии NLRP3 в культуре клеток *in vitro* было выявлено значимое влияние взаимодействия факторов возраста и воздействия блокатора $F(1,16)=4.58$, $p=0.04$, а также фактора возраста $F(1,16)=32.52$, $p<0.0001$ и воздействия блокатора $F(1,16)=128.2$, $p<0.0001$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от стареющих животных интенсивность флуоресценции NLRP3 была статистически значимо выше (24.88 ± 2.02 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от мышей среднего возраста (15.64 ± 1.06 у.е.) ($p=0.0002$, Tukey's критерий) (Рисунок 49). При культивировании клеток в присутствии MCC950 было обнаружено статистически значимое снижение экспрессии NLRP3 в обеих возрастных группах. Так, при культивировании клеток, выделенных от животных среднего возраста, в среде с добавлением MCC950 интенсивность флуоресценции NLRP3 снижается до (9.02 ± 0.36 у.е.) относительно контрольной группы (24.88 ± 2.02 у.е.) ($p<0.0001$, Tukey's критерий); при культивировании клеток, выделенных от стареющих

животных, в среде с добавлением MCC950 интенсивность флуоресценции NLRP3 также снижается до (4.81 ± 0.45 у.е.) относительно контрольной группы (15.64 ± 1.06 у.е.) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий).

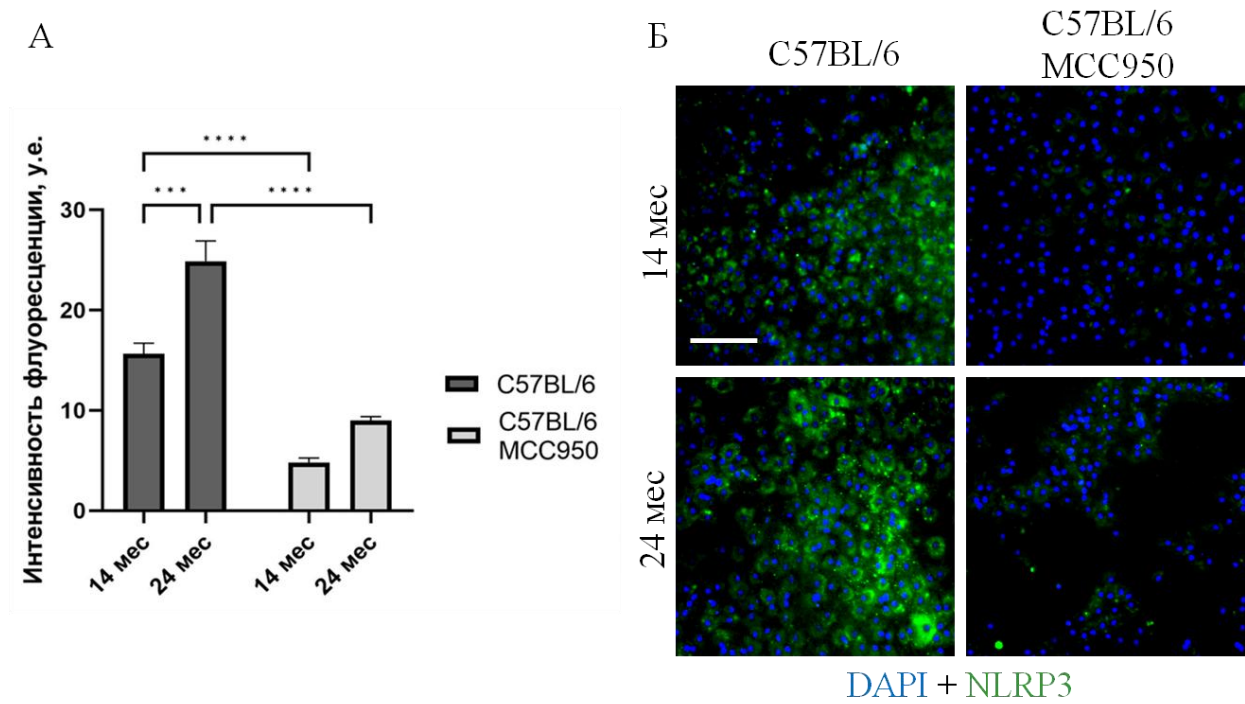


Рисунок 49 - (А) Количественный анализ экспрессии NLRP3 в сокультуре клеток в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия NLRP3 (зеленый). Шкала 50 мкм.

Аналогичные данные получены при анализе экспрессии IL18 в экспериментальных группах - выявлено значимое влияние фактора возраста $F(1,16)=42.75$, $p < 0.0001$ и воздействия блокатора $F(1,16)=122.3$, $p < 0.0001$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от стареющих животных интенсивность флуоресценции IL18 была статистически значимо выше (14.48 ± 0.72 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от мышей среднего возраста (9.86 ± 0.41 у.е.) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 50). При культивировании клеток в присутствии MCC950 было обнаружено статистически значимое снижение экспрессии IL18 в обеих возрастных группах. Так, при культивировании клеток, выделенных от животных среднего возраста, в среде с добавлением MCC950 интенсивность

флуоресценции IL18 снижается до (4.97 ± 0.52 у.е.) относительно контрольной группы (9.86 ± 0.41 у.е.) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий); при культивировании клеток, выделенных от стареющих животных, в среде с добавлением MCC950 интенсивность флуоресценции IL18 также снижается до (7.61 ± 0.51 у.е.) относительно контрольной группы (14.48 ± 0.72 у.е.) ($p < 0.0001$, Tukey's критерий).

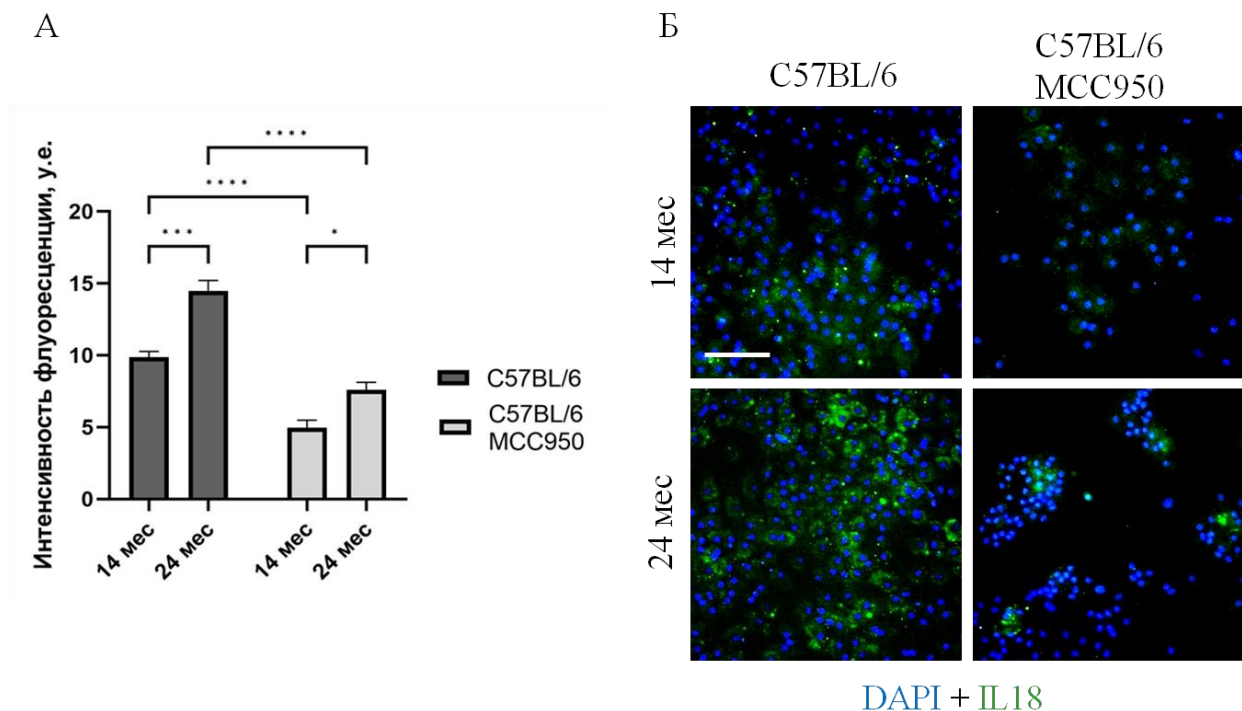


Рисунок 50 - (А) Количественный анализ экспрессии IL-18 в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия IL-18 (зеленый). Шкала 50 мкм.

При анализе экспрессии белка HMGB1 в сокультуре астроцитов и нейронов *in vitro* было выявлено значимое влияние фактора возраста $F(1,16)=37.88$, $p < 0.0001$ и воздействия блокатора $F(1,16)=6.31$, $p=0.02$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от стареющих животных интенсивность флуоресценции NLRP3 была статистически значимо выше (11.90 ± 1.04 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от мышей среднего возраста (6.30 ± 0.59 у.е.) ($p=0.0004$, Tukey's критерий) (Рисунок 51). Также нами было показано, что при культивировании

клеток в присутствии MCC950 имеется тенденция к снижению экспрессии HMGB1 в клетках, полученных от стареющих животных, однако статистически значимых отличий обнаружено не было. Так, в группе животных среднего возраста интенсивность флуоресценции HMGB1 составила 6.30 ± 0.59 у.е. в группе контроля и 5.36 ± 0.69 у.е. в группе MCC950 ($p=0.8$, Tukey's критерий); в группе стареющих животных - 11.90 ± 1.04 у.е. в группе контроля и 9.05 ± 0.61 у.е. в группе MCC950 ($p=0.07$, Tukey's критерий).

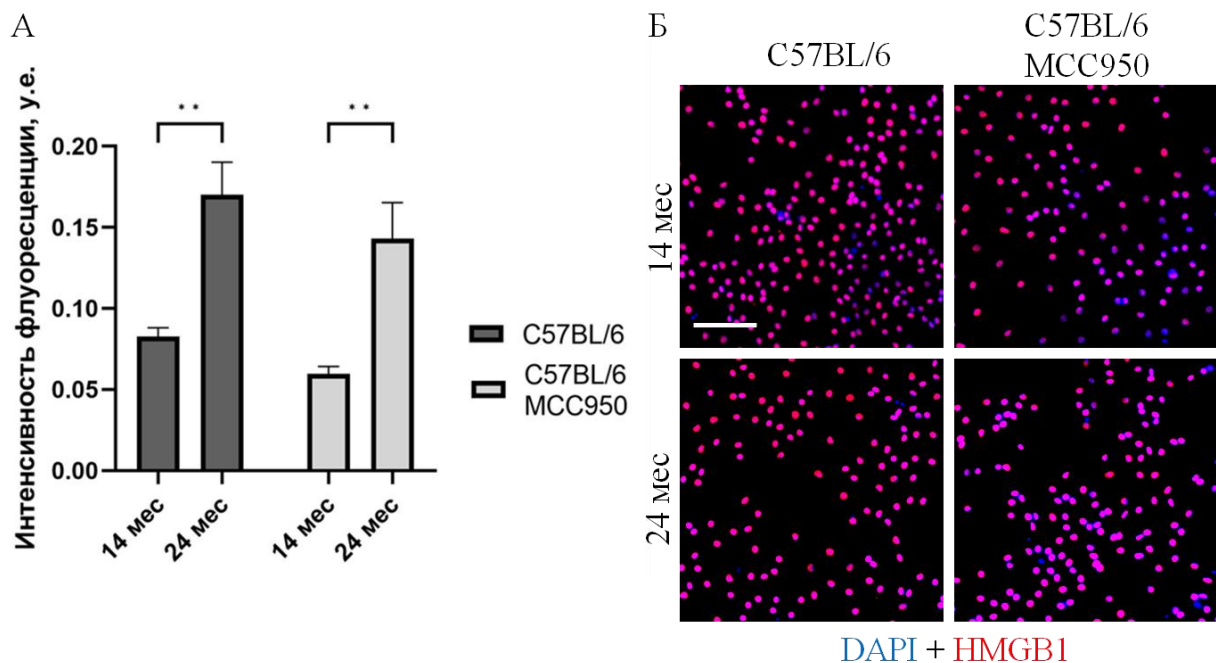


Рисунок 51 - (А) Количественный анализ экспрессии HMGB1 в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия HMGB1 (красный). Шкала 50 мкм.

Таким образом, прямой блокатор инфламмасом MCC950 приводит к значимому снижению экспрессии NLRP3 инфламмасом, а также интерлейкинов, однако не влияет на иммуносенесценцию, как и глибенкламид.

3.4.3. Изучение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом в культуре клеток при воздействии MCC950

Статистический анализ экспрессии фосфорилированных протеинкиназ, входящих в состав метафламмасомного комплекса, показал достоверное снижение уровня PKR и p-IKK β при инкубации клеток с специфическим ингибитором NLRP3-инфламмасы MCC950. При сравнении уровня экспрессии фосфорилированной IKK β в клетках, полученных от мышей разного возраста и подвергшихся инкубации с MCC950 было выявлено значимое влияние фактора возраста $F(1,16)=38.39$, $p<0.0001$ и воздействия блокатора $F(1,16)=25.30$, $p=0.0001$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от стареющих животных дикого типа интенсивность флуоресценции IKK β была статистически значимо выше (17.77 ± 0.88 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от мышей среднего возраста (12.30 ± 0.69 у.е.) ($p=0.0005$, Tukey's критерий) (Рисунок 52). При культивировании клеток, выделенных от животных среднего возраста, в среде с добавлением MCC950 интенсивность флуоресценции IKK β имеет тенденцию к снижению до (9.36 ± 0.45 у.е.) относительно контрольной группы (12.30 ± 0.69 у.е.) ($p=0.0591$, Tukey's критерий); при культивировании клеток, выделенных от стареющих животных, в среде с добавлением MCC950 интенсивность флуоресценции IKK β статистически значимо снижается до (13.17 ± 0.88 у.е.) относительно контрольной группы (17.77 ± 0.88 у.е.) ($p=0.002$, Tukey's критерий).

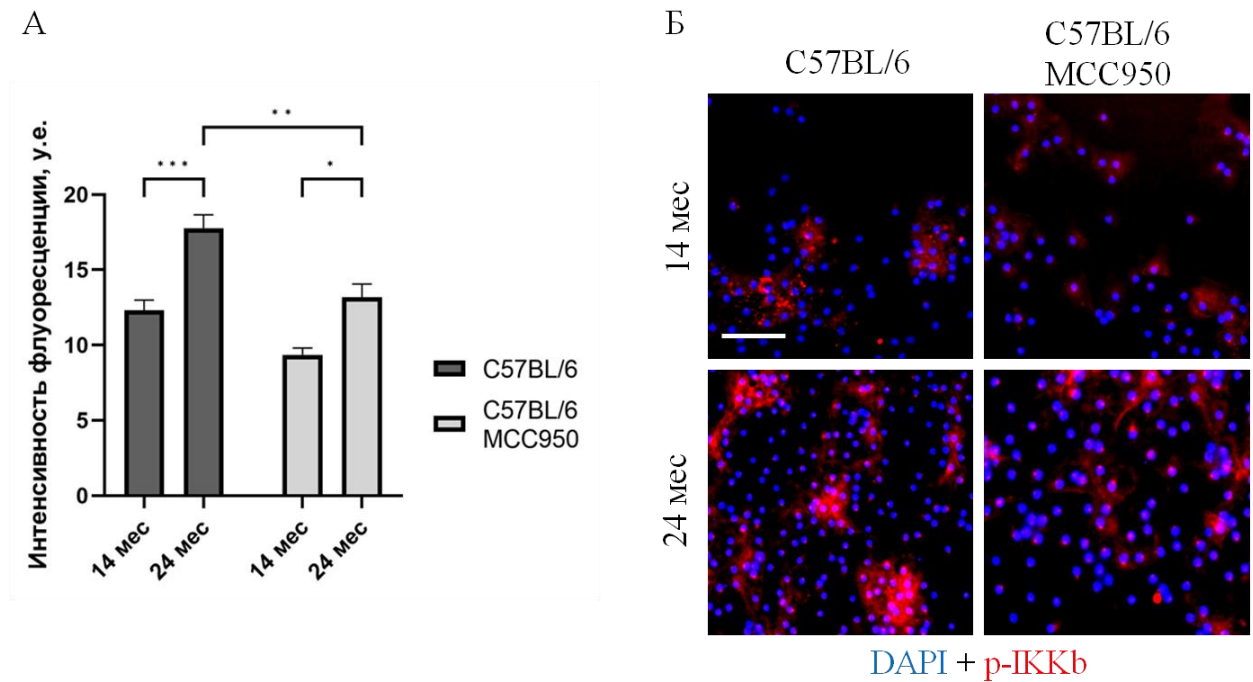


Рисунок 52 - (А) Количественный анализ экспрессии p-IKKb в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия p-IKKb (красный). Шкала 50 мкм.

При сравнении уровня экспрессии PKR в клетках, полученных от мышей разного возраста и подвергшихся инкубации с MCC950 было выявлено значимое влияние фактора возраста $F(1,16)=50.33$, $p<0.0001$ и воздействия блокатора $F(1,16)=8.32$, $p=0.01$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от стареющих животных интенсивность флуоресценции PKR была статистически значимо выше (13.55 ± 1.38 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от мышей среднего возраста (6.42 ± 0.26 у.е.) ($p<0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 53). При сравнении экспрессии PKR клетками, выделенными от животных среднего возраста, в среде с добавлением MCC950 и без добавления MCC950 статистически значимых отличий выявлено не было, однако при культивировании клеток, выделенных от стареющих животных, в среде с добавлением MCC950 интенсивность флуоресценции NLRP3 статистически значимо снижается до (9.60 ± 0.82 у.е.) относительно контрольной группы (13.55 ± 1.38 у.е.) ($p=0.02$, Tukey's критерий).

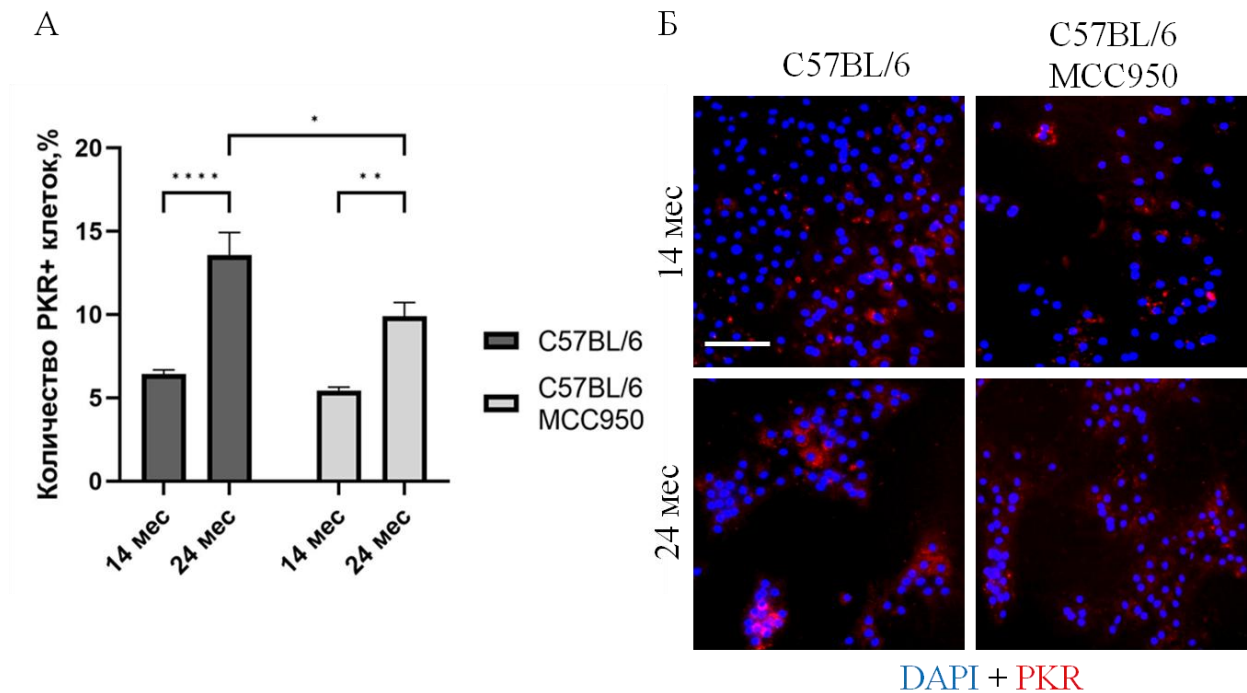


Рисунок 53 - (А) Количественный анализ экспрессии PKR в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия PKR (красный). Шкала 50 мкм.

Также нами были выявлены статистически значимые отличия в экспрессии киназы JNK в культурах клеток, полученных от животных среднего и старшего возраста, в зависимости от наличия или отсутствия MCC950 в культуральной среде. При анализе экспрессии JNK нами также было выявлено значимое влияние взаимодействия факторов возраста и воздействия блокатора $F(1,16)=5.64$, $p=0.03$, фактора возраста $F(1,16)=115.6$, $p<0.0001$ и воздействия блокатора $F(1,16)=29.16$, $p<0.0001$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от стареющих животных дикого типа интенсивность флуоресценции JNK была статистически значимо выше (14.97 ± 1.08 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от мышей среднего возраста (6.38 ± 0.37 у.е.) ($p<0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 54).

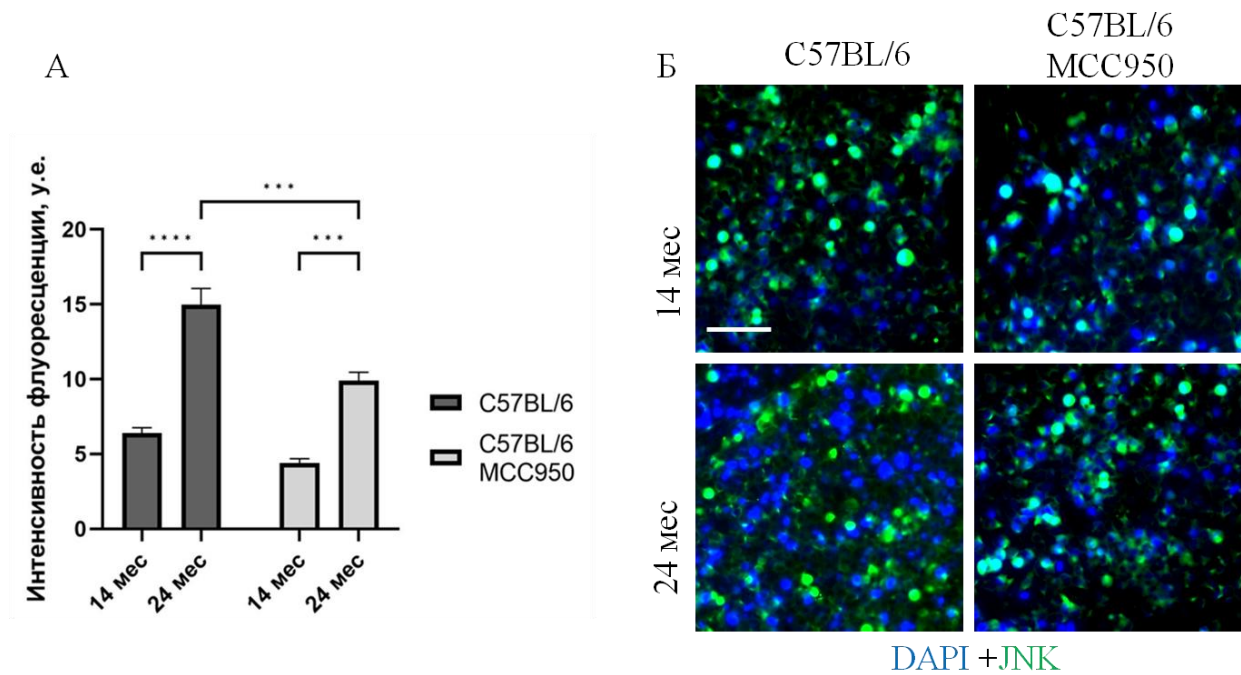


Рисунок 54 - (А) Количественный анализ экспрессии JNK в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия JNK (зеленый). Шкала 50 мкм.

При сравнении экспрессии JNK клетками, выделенными от животных среднего возраста, в среде с добавлением MCC950 и без добавления MCC950 статистически значимых отличий выявлено не было, однако при культивировании клеток, выделенных от стареющих животных, в среде с добавлением MCC950 интенсивность флуоресценции NLRP3 статистически значимо снижается до (9.87 ± 0.57 у.е.) относительно контрольной группы (14.97 ± 1.08 у.е.) ($p=0.0003$, Tukey's критерий).

Таким образом, обработка блокатором MCC950 культуры клеток приводит к значимому снижению экспрессии протеинкиназ метафламмасомного комплекса, но не pIRS1. Эффект более выраженный при старении мышей.

3.4.4. Изучение экспрессии маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности в культурах клеток при аппликации MCC950

При анализе экспрессии pIRS-Ser было выявлено статистически значимое увеличение экспрессии клетками, полученными от животных в возрасте 24-25 месяцев по сравнению с 14-15-месячными животными, которое сохранялось независимо от наличия или отсутствия MCC950 в среде культивирования. Так, в группе животных среднего возраста интенсивность флуоресценции pIRS-Ser составила 10.72 ± 1.13 у.е., в группе стареющих животных - 15.62 ± 0.64 у.е. ($p=0.007$, Tukey's критерий) (Рисунок 55). При сравнении уровня экспрессии pIRS-Ser в клетках, полученных от мышей разного возраста и подвергшихся инкубации с MCC950 было выявлено значимое влияние фактора возраста $F(1,16)=26.79$, $p<0.0001$.

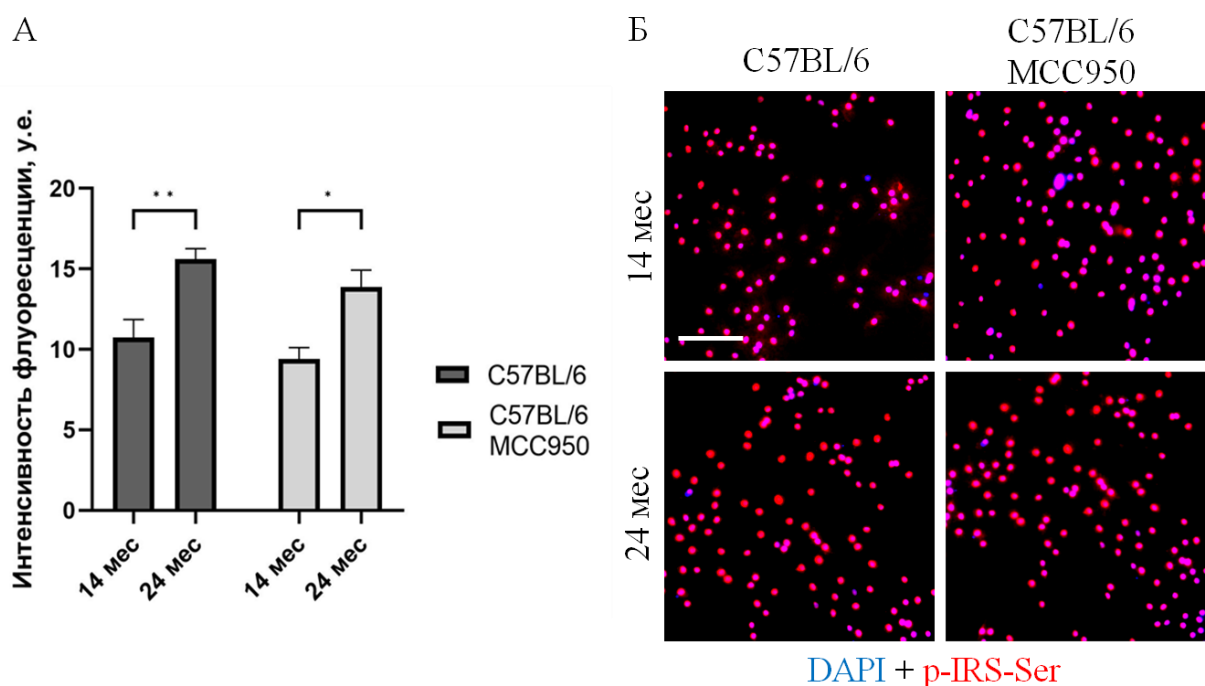


Рисунок 55 - (А) Количественный анализ экспрессии p-IRS-Ser в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия p-IRS-Ser (красный). Шкала 50 мкм.

При анализе экспрессии pAkt нами было выявлено значимое влияние взаимодействия факторов возраста и воздействия блокатора $F(1,16)=5.16$, $p=0.04$, фактора возраста $F(1,16)=84.73$, $p<0.0001$ и воздействия блокатора $F(1,16)=25.70$, $p=0.0001$. При множественном сравнении было выявлено, что в культуре клеток, полученных от стареющих животных интенсивность флуоресценции pAkt была статистически значимо выше (7.52 ± 0.56 у.е.) по сравнению с клетками, выделенными от мышей среднего возраста (3.07 ± 0.31 у.е.) ($p<0.0001$, Tukey's критерий) (Рисунок 56). При сравнении экспрессии pAkt клетками, выделенными от животных среднего возраста, в среде с добавлением MCC950 и без добавления MCC950 статистически значимых отличий выявлено не было, однако при культивировании клеток, выделенных от стареющих животных, в среде с добавлением MCC950 интенсивность флуоресценции pAkt статистически значимо снижается до (4.67 ± 0.57 у.е.) относительно контрольной группы (7.52 ± 0.56 у.е.) ($p=0.0005$, Tukey's критерий).

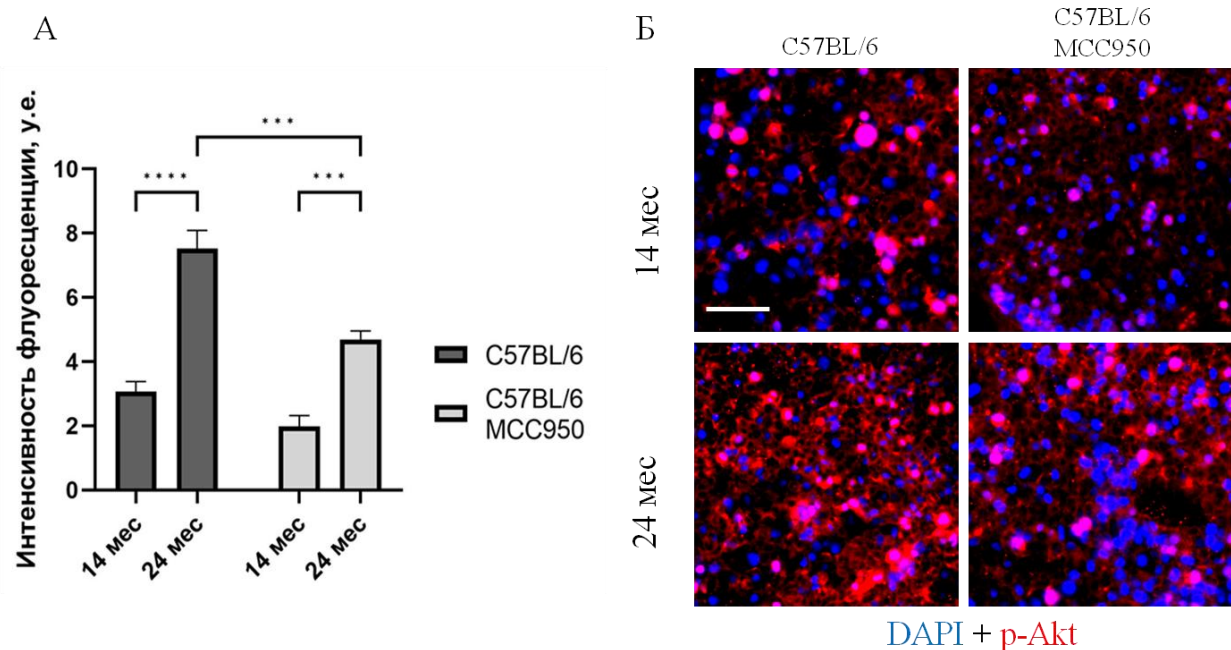


Рисунок 56 - (А) Количественный анализ экспрессии p-Akt в культуре клеток *in vitro* в экспериментальных группах. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия p-Akt (красный). Шкала 50 мкм.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1. Особенности поведенческих реакций у мышей при старении. Влияние генетического нокаута инфламماسомы NLRP3 и фармакологической модуляции NLRP3 на поведение

Модуляция экспрессии инфламмасом в центральной нервной системе сопровождается значимыми изменениями в сложных поведенческих реакциях. В предыдущих работах нами было установлено, что ингибирование NLRP3 инфламماسомы вызывает парадоксальные эффекты: наряду с ожидаемым противовоспалительным действием оно ассоциировано с усилением тревожности и нарушениями когнитивных функций. Эти поведенческие отклонения коррелируют с патологическими изменениями на клеточном и молекулярном уровнях, включая подавление ранних стадий нейрогенеза, нарушение дифференцировки астроцитов и ослабление синаптической передачи [119–123].

В исследованиях на животных воздействие стресса увеличивает концентрацию IL-1beta во многих областях мозга. Но как было показано ранее другими научными группами, как недостаточный, так и избыточный уровень IL-1beta нарушают формирование памяти, указывая на то, что IL-1beta важен для нормального обучения и формирования памяти [222]. Однако, несмотря на растущее количество доказательств, связывающих продукцию IL-1beta, нейровоспаление, память о страхе и родственные расстройства, остается неясным, служит ли инфламмасома NLRP3 причинным фактором и как она действует на память о страхе при старении. В этом исследовании, используя генетические стратегии, мы охарактеризовали важную роль инфламماسомы NLRP3 в регуляции нейровоспаления в памяти о страхе, в том числе и при старении.

В настоящем исследовании основное внимание было уделено оценке тревожности, социального поведения, а также процессов приобретения и

извлечения памяти у мышей дикого типа и животных с нокаутом гена *Nlrp3* в условиях старения. Известно, что возрастные изменения сопровождаются снижением эпизодической памяти и нарушением функций мозговых структур, вовлечённых в когнитивные процессы [217]. В рамках настоящего исследования у стареющих мышей наблюдалось избирательное нарушение контекстуальной памяти, в то время как процессы формирования условного рефлекса и тон-ассоциированная (сигнальная) память оставались сохранными. Согласно данным литературы, миндалина, особенно её фронтотемпоральные отделы, отвечает за приобретение и проявление условного замирания в ответ на специфический сенсорный стимул (например, тон), тогда как гиппокамп критически важен для обработки, хранения и последующего воспроизведения информации о контексте [33]. Учитывая центральную роль гиппокампа в регуляции контекстуального страха, именно эта структура была выбрана для последующих молекулярных и клеточных исследований.

Ранее полученные данные свидетельствуют, что старение снижает способность животных использовать контекстуальную информацию для модуляции выработанных реакций на угрозу. Вероятно, подобные нарушения связаны с возрастной деградацией нейронных структур, участвующих в реализации контекстно-зависимого поведения, которые демонстрируют повышенную чувствительность к старению [23]. В первую очередь к таким уязвимым зонам относится зубчатая фасция гиппокампа [26].

Таким образом, у стареющих мышей зафиксировано нарушение контекстной памяти, ассоциированной с гиппокампом. Также старение у мышей сопровождается развитием тревожности и нарушением социальной активности, но не у мышей с делецией гена *Nlrp3*^{-/-}. При этом зрелые нокаутные мыши демонстрируют сниженную социальную активность и интерес к особям аналогичного возраста.

Нокаутные мыши NLRP3 проводили меньше времени с социальными объектами, чем соответствующие по возрасту мыши дикого типа; старение в отсутствие NLRP3 не влияет на общительность, но снижает социальное

предпочтение новизны. У этих мышей также наблюдаются изменения в социальных предпочтениях, например, измененные модели социального взаимодействия с незнакомыми особями, что также может быть связано с тревожно-подобным поведением. Поэтому понимание влияния делеции *Nlrp3* на социальное поведение является актуальной областью исследований. Однако время замирания у взрослых *Nlrp3*^{-/-} и пожилых *Nlrp3*^{-/-}-мышей, а также на второй контекстный день не отличалось, что может свидетельствовать об отсутствии влияния старения на сигнальную память у NLRP3 KO мышей. Аналогичные данные были получены при введении прямого блокатора MCC950 животным. Введение блокатора может также оказывать влияние на сигнальную (сенсорную), обеспечивающую кратковременное удержание сенсорной информации, поступающей из внешней среды.

Таким образом, *Nlrp3*^{-/-} имеет защитный генотип при старении в отношении сигнальной памяти и социальных паттернов, но не в отношении тревожно-подобного поведения. В отличие от результатов, полученных Dong et al., мы подтвердили усиление страха у *Nlrp3*^{-/-}-мышей с сохраненной высокой двигательной активностью [56]. Эти наблюдения свидетельствуют о потенциальном влиянии NLRP3 на когнитивные и социальные функции.

4.2. Изменение числа сенесцентных клеток и развитие SASP фенотипа с возрастом. Влияние генетического нокаута и фармакологической модуляции NLRP3 инфламмасомы

Поскольку возраст является главным фактором риска развития возраст-ассоциированных патологий, в последние годы всё больше научных усилий сосредоточено на разработке стратегий их профилактики и терапии. Эта область исследований приобретает всё большую актуальность не только в медицинском и научном сообществе, но и в обществе в целом [196].

Клеточное старение сопровождается устойчивым состоянием прекращения пролиферации, возникающим в ответ на различные стрессовые

стимулы. Согласно современным представлениям, клеточная сенесценция развивается поэтапно. Иницирующая фаза запускается различными стрессовыми факторами - теломерной недостаточностью, геномными повреждениями или лишением митогенных сигналов. На следующем этапе активируется система реагирования на повреждение ДНК (DDR), что приводит к финальной стадии - необратимой блокировке клеточного цикла через p53/p21-зависимые механизмы [143].

В настоящем исследовании продемонстрировано возрастное накопление сенесцентных клеток как в гистологических срезах головного мозга, так и в кокультуре астроцитов и нейронов, полученной от стареющих мышей. Сенесценция представляет собой устойчивое состояние прекращения пролиферации, индуцируемое разнообразными стрессовыми стимулами. Одной из ключевых характеристик сенесцентных клеток является формирование секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP), — комплекса биологически активных молекул, включающего провоспалительные цитокины, хемокины, факторы роста, металлопротеиназы и другие медиаторы [176]. Различные формы клеточного стресса, включая окислительный, метаболический и генотоксический, способствуют прогрессированию иммуносенесценции и старению. В свою очередь, хроническое низкоинтенсивное воспаление, считающееся одним из маркеров старения, не только сопровождает, но и активно способствует прогрессированию клеточной сенесценции и способствует старению тканей [120, 259].

Процессы старения и патогенез возраст-ассоциированных воспалительных состояний сопровождаются накоплением разнообразных провоспалительных медиаторов, включая цитокины, метаболиты, белковые агрегаты и реактивные химические соединения. Было показано, что эти факторы способны активировать NLRP3 инфламмасому через различные молекулярные механизмы, что приводит к усилению воспалительного ответа. В свою очередь, гиперактивация инфламмасы поддерживает хроническое воспаление и способствует прогрессированию возрастных патологий [80, 120].

Результаты, полученные в исследованиях *in vivo* и *in vitro*, показывают, что при делеции *Nlrp3* количество сенесцентных клеток аналогично тому, что и у мышей дикого типа. При этом при старении нокаутных мышей число сенесцентных клеток не увеличивается, а даже снижается. Предыдущие исследования показали роль инфламмасы NLRP3 в нескольких событиях, связанных со старением. Было показано, что генетическая делеция NLRP3 у мышей улучшает продолжительность жизни за счет ослабления множественных возрастных дегенеративных изменений, таких как гликемический контроль, потеря костной массы, когнитивная функция и двигательная активность [249]. Кроме того, у пожилых мышей с нокаутом гена *Nlrp3* отмечалось повышение мышечной силы и выносливости, а также снижение возраст-ассоциированного накопления миопатических волокон [150]. В то же время у старых животных дикого типа уровень активной каспазы-1 и IL-1 β был значительно выше, чем у их *Nlrp3*^{-/-} животных. Однако концентрации других провоспалительных цитокинов — TNF- α , IL-6 и IL-8 — возрастали с возрастом как в WT, так и в *Nlrp3*^{-/-} группах, что указывает на сохранение активности альтернативных воспалительных путей при отсутствии NLRP3. Эти данные свидетельствуют, что NLRP3-независимые механизмы также вносят вклад в хроническое воспаление, сопровождающее старение. В частности, повышенная экспрессия TNF- α , IL-6 и IL-8 у нокаутных мышей может объяснять сохранение сенесцентного фенотипа, несмотря на отсутствие NLRP3-инфламмасы [142]. Следует отметить, что указанные цитокины (IL-1 β , TNF- α и IL-6) являются ключевыми компонентами секреторного фенотипа сенесцентных клеток (SASP) [54].

Ранее было показано, что нейровоспаление в гиппокампе играет важную роль в патогенезе тревожных расстройств и когнитивных дефицитов, особенно в тех, что связаны с нарушением процессов формирования и извлечения памяти. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этих изменений, до конца не установлены. Известно, что NLRP3 инфламмоса играет центральную роль в регуляции продукции провоспалительных цитокинов и активно участвует в

патогенезе различных нейровоспалительных заболеваний [121, 220]. В настоящем исследовании мы показали, что при старении в гиппокампе наблюдается значительная активация NLRP3 инфламماسомы. Это приводит к увеличению экспрессии провоспалительного интерлейкина IL18, который в свою очередь является также основным составляющим SASP фенотипа. В группах NLRP3 нокаутных мышей разного возраста экспрессии NLRP3 методом ИГХ не зафиксировано, однако выявлена незначительная экспрессия IL18. Согласно данным литературы, заметное снижение уровня интерлейкина IL18 у мышей, лишенных компонентов инфламماسомы NLRP3, приводит к нарушению выработки и активации опухолевых супрессоров интерферона- γ (IFN- γ) и STAT1 соответственно [255].

Таким образом, при старении отметили увеличение сенесцентных клеток, которые характеризуются секреторным фенотипом, сопровождающимся увеличением экспрессии NLRP3 инфламмасом и IL-18.

Также увеличение количества сенесцентных клеток наблюдалось при модуляции NLRP3 инфламмасомы с помощью LPS в старшей возрастной группе, кроме того, в присутствии LPS в органотипических срезах было зафиксировано увеличение продукции IL18, NLRP3 и HMGB1 (белок группы высокой подвижности B1). Фармакологическое блокирование инфламмасом глибенкламидом и MCC950 *in vitro* приводит к снижению продукции IL18, NLRP3, но не приводит к изменению иммуносенесценции и HMGB1. Таким образом, инкубация с глибенкламидом приводит к снижению экспрессии маркеров NLRP3, IL18, но не влияет на иммуносенесцентные клетки, что также подтверждается отсутствием изменений в экспрессии HMGB1. Чтобы функционировать в качестве сигнализатора, HMGB1 активно секретируется клетками, такими как активированные моноциты и макрофаги, или пассивно высвобождается некротическими и поврежденными клетками. Попадая в другие клетки в нише, HMGB1 распознается рецепторами RAGE и становится мощным сигналом воспаления. В клетках, вступающих в старение, HMGB1 транслоцируется из ядра в цитоплазму и затем секретируется для стимуляции

активности NF-κB через сигналы Toll-подобных рецепторов. Его релокализация и секреция контролируют сенесценс-ассоциированный секреторный фенотип клеток, представляя собой, таким образом, основной паракринный фактор как *in vitro*, так и *in vivo* [206]. Таким образом, фармакологические агенты не подавляют экспрессию HMGB1, а значит и не меняют иммуносенесценцию.

Кроме того, HMGB1 выступает также еще одной стратегией по влиянию на астроцитарную конверсию в A1 фенотип. Это ядерный ДНК-связывающий белок, который пассивно высвобождается из некротических клеток и функционирует как мощный медиатор воспаления. Он участвует во многих иммунных заболеваниях центральной нервной системы, включая травматическое повреждение мозга, инсульт, эпилепсию и повреждение спинного мозга. Однако астроциты A1 продуцируются активной микроглией, и селективное подавление HMGB1-RAGE может ограничить поляризацию микроглии в сторону воспаления, тем самым уменьшая трансформацию астроцитов A1 [236]. Интересным является факт, что с возрастом отмечается увеличение числа сенесцентных клеток у животных с введением DMSO, применение MCC950 *in vivo* носит протективный эффект и уменьшает вероятность развития секреторного фенотипа, связанного со старением (SASP).

4.3. Изменение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ метафламмасом. Влияние генетического нокаута и фармакологической модуляции NLRP3 инфламмасомы

В ходе настоящего исследования у стареющих мышей дикого типа (WT) было выявлено статистически значимое возраст-ассоциированное увеличение уровня фосфорилированных форм протеинкиназ PKR и IKKβ — ключевых элементов метафламмасомы — в гиппокампе. В настоящее время киназа PKR рассматривается как центральный узел регуляции метафламмасомного комплекса [220]. Недавно было показано, что двухцепочечная РНК-зависимая протеинкиназа (PKR) является основным регулятором активации

инфламмасомы. В наших экспериментах у стареющих мышей WT наблюдалась достоверная активация PKR в гиппокампе, что указывает на вовлечение воспалительного пути PKR/NLRP3 в формирование сенесцентного фенотипа клеток. Подтверждением фундаментальной роли PKR служат результаты ранее проведенных исследований: у животных с генетическим нокаутом *Pkr* на фоне метаболического стресса (в частности, при ожирении, вызванном диетой с высоким содержанием жиров) отмечался выраженный нейропротективный эффект. В то время как у WT-мышей в этих условиях происходило значительное повышение активности компонентов метафламмасомы в головном мозге, у *Pkr*^{-/-} особей подобных изменений зафиксировано не было [220]. Кроме того, установлено, что PKR способна инициировать канонический путь активации NLRP3-инфламмасомы и каспазы-1, что в конечном итоге приводит к протеолитическому процессингу и секреции про-формы IL-1 β . Данный механизм реализуется через индукцию окислительного стресса — в частности, за счёт продукции АФК — и последующую стимуляцию MAP-киназных каскадов [216].

Поскольку протеинкиназа R может регулировать инфламмасому NLRP3, делеция PKR снижает уровни NLRP3, белки группы высокой подвижности 1 (HMGB1) и IL-1 β в макрофагах, то логично, что уровень экспрессии PKR снижался у нокаутных мышей разных возрастов: у зрелых и при старении. PKR активируется сигналами стресса и при аутофосфорилировании может привести к активации NF κ B и, в конечном счете, активации инфламмасомы. У нокаутных мышей этот путь неактивен, а значит не происходит активации NF κ B с последующей гиперэкспрессией PKR.

Также гиперэкспрессия PKR при старении у мышей дикого типа может объяснить нарушение контекстной памяти у мышей. Ранее в исследованиях на мышцах и обезьянах было показано, что фактор некроза опухоли альфа (TNF α) может индуцировать PKR, что приводит к ухудшению памяти. После фосфорилирования PKR он может активировать ряд нижестоящих путей, ведущих к воспалительным, апоптотическим или аутофагическим путям.

Исследования с использованием животных с нокаутом PKR показали, что потеря PKR значительно снижает воспалительные действия и медиаторы воспаления [96]. В совокупности наши данные показывают, что PKR участвует в активации NLRP3 при старении, а делеция NLRP3 сопровождается ингибированием PKR – одного из компонентов метафламмы.

Также в гиппокампе у стареющих мышей дикого типа была зарегистрирована повышенная экспрессия киназы IKK β , входящей в состав метафламмы. Данный фермент входит в IKK-комплекс, который фосфорилирует белки-ингибиторы I κ B, запуская тем самым их протеасомную деградацию, зависящую от убиквитина. Этот процесс высвобождает NF- κ B — транскрипционный фактор, существующий в форме димера и до этого момента удерживаемый в цитоплазме. После высвобождения NF- κ B мигрирует в ядро, где активирует транскрипцию множества генов. Следует отметить, что кратковременная активность NF- κ B является необходимым условием для ряда фундаментальных процессов, таких как иммунная защита, клеточная жизнеспособность и синаптическая пластичность. Однако при хронической или неконтролируемой активации этот фактор начинает ассоциироваться с развитием воспалительных и старческих патологий. Согласно биоинформатическим исследованиям, NF- κ B демонстрирует наиболее выраженную связь со старением у млекопитающих, играя ключевую роль в запуске клеточной сенесценции.

Более того, конститутивно активный NF- κ B способен способствовать инициированию сенесцентного фенотипа и ускорять процессы старения за счёт индукции компонентов секреторного фенотипа, ассоциированного со старением (SASP), включая провоспалительные цитокины и хемокины (IL-6, IL-1 α , TNF α) [58, 259]. Высвобождаемые в рамках SASP факторы способны усиливать сенесценцию, формируя тем самым порочный круг, который лежит в основе хронического воспаления и возрастной дисфункции. В нашем исследовании мы обнаружили, что конститутивная активация IKK β в гиппокампе коррелирует не только с признаками клеточного старения, но и с гиперактивацией NLRP3-

инфламмасомы. Это наблюдение свидетельствует о существовании тесной функциональной взаимосвязи между сигнальным каскадом IKK β /NF- κ B и инфламмасом-зависимым воспалением в контексте старения.

Инфламмасома NLRP3 также подавлялась ингибиторами IKK β . Таким образом, IKK β играет ключевую роль в образовании и активации инфламмасомы NLRP3 [169]. Так ранее было показано, что IKK β необходима для активации каспазы 1. В нашем исследовании у мышей нокаутных по гену *Nlrp3* экспрессия IKK β снижена, не изменяется она и при старении мышей с делецией *Nlrp3*.

Также согласно данным литературы IKK β необходим для олигомеризации ASC. Было убедительно показано, что IKK β необходим для быстрого образования инфламмасомы NLRP3 и последующей активации каспазы-1 и гасдермина D и, следовательно, секреции IL-18 [169]. В то же время в наших экспериментах у стареющих мышей не было выявлено достоверных изменений в уровнях инсулиновых рецепторов, а также фосфорилированного по серину IRS1. Таким образом, можно предположить, что при физиологическом старении, не осложненном нейродегенерацией, инсулиновая сигнализация в мозге остаётся сохранной. Вместе с тем уже на этой стадии наблюдаются маркеры метаболического воспаления, что указывает на раннее вовлечение воспалительных механизмов в возрастные изменения центральной нервной системы.

Также в данном исследовании были получены данные о снижении фосфорилированных форм протеинкиназ метафламмасом (PKR, IKK β , JNK) при воздействии прямого и непрямого ингибиторов NLRP3-инфламмасомы, причем данный эффект был более выражен при старении, вероятно, за счет снижения NLRP3 и IL18.

Глибенкламид оказывает противовоспалительное действие за счет ингибирования NLRP3 инфламмасомы. Тем не менее, некоторые исследования показывают, что глибенкламид не влияет на активность каспазы-1, что позволяет предположить, что он действует выше NLRP3 инфламмасомы.

MCC950 представляет собой диарилсульфонилмочевиносодержащее соединение, которое было впервые идентифицировано как ингибитор ИЛ-1 β и поэтому и поэтому был отнесен к группе CRIDs (cytokine release inhibitory препараты). Дальнейшее изучение его фармакологического механизма показало, что MCC950 препятствует созреванию и высвобождению ИЛ-1 β созреванию и высвобождению ИЛ-1 β путем ингибирования активации NLRP3 инфламмасы. На сегодняшний день терапевтическая эффективность MCC950 убедительно продемонстрирована в многочисленных исследованиях воспалительных заболеваний, таких как: атеросклероз, спонтанный колит, индуцированные диабетом когнитивные нарушения, холестатическое повреждение печени и даже у пациентов с NLRP3 с низкой пенетрантностью [17]. Вместе с тем молекулярная мишень MCC950 до сих пор остаётся не до конца установленной. [56].

В литературе имеются данные о нейропротекторных свойствах глибенкламида. Показано, что он способен подавлять миграцию воспалительных клеток за счёт ингибирования сборки NLRP3-инфламмасы, что, в свою очередь, ограничивает их инфильтрацию в ишемизированную ткань и предотвращает прогрессирование дальнейшего повреждения органов [75]. Современные данные казывают на то, что глибенкламид способен поддерживать структурную целостность гематоэнцефалического барьера. Этот эффект опосредован подавлением синтеза провоспалительных медиаторов, индуцированного белками плазмы, вышедшими за пределы сосудистого русла, и в конечном итоге приводит к улучшению неврологического статуса после экспериментально вызванной церебральной ишемии [94, 245]. На основании этих данных была сформулирована гипотеза о том, что глибенкламид, ингибируя активность NLRP3-инфламмасы, опосредованно снижает экспрессию протеинкиназы PKR и блокирует последующую активацию фосфорилированных протеинкиназ.

В нашей работе было установлено, что ингибиторы NLRP3-инфламмасы снижают уровень экспрессии провоспалительных маркеров в

сокультуре астроцитов и нейронов, однако не оказывают влияния на процессы клеточного старения. При этом подавление активности NLRP3 препятствует фосфорилированию протеинкиназ, входящих в состав метафламмасомного комплекса. Анализ клеточной локализации маркеров показал, что PKR и IRS1 преимущественно обнаруживаются в ядре, что согласуется с данными предыдущих работ, выполненных на тканях мозга пациентов с болезнью Альцгеймера [223]. В свою очередь, IKK β локализуется в цитоплазме нейронов, что также соответствует ранее опубликованным результатам, указывающим на её цитоплазматическое распределение [221].

Серин/треониновая киназа PKR обладает проапоптотической активностью; ее активация через фосфорилирование инициирует каскад патологических процессов, приводящих к гибели нейронов [168]. Клиническая значимость PKR подтверждается тем, что ее уровень в ликворе положительно коррелирует со степенью когнитивного дефицита и может рассматриваться как предиктор его прогрессирования [163], что обосновывает ее потенциальное использование в качестве биомаркера при БА [221]. Важно отметить, что для таких компонентов метафламмасы, как IRS1 и PKR, была выявлена связь между повышением их экспрессии и ухудшением когнитивных функций, но не клинически выраженной деменции [221]. Это позволяет предположить, что данные молекулы могут участвовать в патогенезе на ранних этапах нейродегенеративного процесса — например, при лёгких когнитивных нарушениях или в преддементном периоде, который может развиваться задолго до манифестации полной клинической картины болезни Альцгеймера.

Настоящее исследование также продемонстрировало, что снижение экспрессии PKR *in vitro* — индуцированное обработкой глибенкламидом и MCC950 — сопровождается подавлением фосфорилирования IKK β в условиях старения. Проведенный анализ сокультур, полученных от мышей среднего возраста, не выявил статистически значимых изменений в экспрессии патологической формы фосфорилированного IRS1, а также в количестве сенесцентных клеток на фоне аппликации глибенкламида. Важно отметить, что

функционирование инсулиновой сигнальной системы во многом определяется процессом фосфорилирования IRS1 по сериновым остаткам. Примечательно, что в ЦНС гиперфосфорилирование IRS1 в определенных сериновых участках является характерным признаком, который регистрируется как в мозге пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера. Более того, такие посттрансляционные модификации IRS1 рассматриваются в качестве потенциального биомаркера когнитивных нарушений, не связанных с А β , например, при диабете 2 типа и физиологическом старении. В то же время при амилоид-ассоциированном ухудшении памяти фосфорилирование IRS1 может служить ранним индикатором повышения уровня А β 42, предшествующим клинически значимому когнитивному снижению при болезни Альцгеймера [237].

Таким образом, старение сопровождается увеличением экспрессии фосфорилированных протеиназ метафламмасомы; делеция NLRP3 не приводит к увеличению экспрессии компонентов метафламмасомы, блокирование фармакологическими модуляторами снижает экспрессию JNK при старении при сравнении с контролем, модуляция NLRP3 инфламмасомы LPS значительно увеличивает экспрессию JNK. Недавно было показано, что ингибирование сигнального пути Phospho-JNK/TNF- α приводит к уменьшению отложений амилоида у стареющих мышей [16].

4.4. Изменение инсулиновой сигнализации при старении. Роль NLRP3 инфламмасом

Современные исследования подтверждают тесную взаимосвязь между системной инсулинорезистентностью (ИР), а также ИР, специфичной для центральной нервной системы, и патогенезом БА. При БА в головном мозге наблюдаются такие нарушения инсулиновой сигнализации, как снижение экспрессии мРНК инсулина, IR, IRS1, а также факторов роста IGF-1 и IGF-2. Одновременно отмечается уменьшение активности инсулин-зависимых

сигнальных путей, что проявляется в снижении уровней фосфорилированного АКТ (pAKT) и фосфорилированного GSK3 β . На молекулярном уровне это сопровождается повышением экспрессии белка-предшественника амилоида (APP) и мРНК тау-белка. Кроме того, всё больше данных указывает на вклад хронического воспаления и нарушений липидного обмена в развитие и прогрессирование БА. Среди потенциальных терапевтических мишеней выделяют ядерный рецептор PPAR γ , аполипопротеин E (ApoE), его рецептор LRP1, а также гормон лептин. Хроническое нейровоспаление усугубляет дисфункцию инсулиновой сигнализации, создавая порочный круг: провоспалительные цитокины — такие как TNF- α , IL-6 и IL-1 β — дополнительно подавляют инсулиновые пути, что способствует нейродегенерации и ускоряет прогрессирование болезни Альцгеймера [135].

В данном исследовании значимое увеличение экспрессии инсулиновых рецепторов было выявлено только при обработке клеток глибенкламидом, что подтверждает его стимулирующее действие на рецепторы инсулина. При этом не было выявлено эффекта влияния на экспрессию патологического IRS1, фосфорилированного по Ser314. Тем не менее в нижележащем пути инсулиновой сигнализации было отмечено снижение экспрессии GLUT4 при старении во всех исследуемых группах, что может указывать на развитие изменений инсулиновой сигнализации с возрастом. При этом у нокауты изначально экспрессия инсулин-зависимого переносчика GLUT4 была снижена по сравнению с контролем. Однако в присутствии LPS в среде культивирования органотипических срезов наблюдалось увеличение экспрессии GLUT4 в старшей возрастной группе. Ранее в своих исследованиях мы показали, что NLRP3 инфламасома необходима для инсулин-зависимого транспорта глюкозы в миндалинах. Ранее нами было показано снижение экспрессии GLUT4 в миндалинах у мышей с нокаутом гена Nlrp3. Экспрессия транспортера глюкозы GLUT4 в центральной нервной системе находится в тесной функциональной связи с инсулиновой сигнализацией. Экспериментальные данные, полученные на животных, свидетельствуют о значительном снижении уровня данного белка

при состояниях, характеризующихся инсулиновой недостаточностью. Интересно, что в глюкозочувствительных нейронах наблюдается пространственная соположенность GLUT4 и инсулиновых рецепторов, что указывает на их возможное функциональное взаимодействие [104]. Инсулин способен активировать транскрипцию GLUT4, а также индуцирует перемещение данного транспортного белка из внутриклеточных депо на клеточную мембрану. Этот процесс является ключевым для обеспечения нейронов эффективным механизмом захвата и метаболизма глюкозы. Таким образом, передача сигнала по инсулиновому пути выступает в качестве основного регулятора системы переноса глюкозы через мембраны клеток головного мозга [40].

В данном исследовании было обнаружено, что старение приводит к сверхэкспрессии GSK3 β в культуре клеток в контрольной группе и при аппликации глибенкламида. Эти результаты подтверждаются недавними исследованиями, согласно которым в мозге мышей с сахарным диабетом 2 типа и болезнью Альцгеймера, характеризующейся резистентностью к инсулину, нарушен инсулиновый сигналинг, в том числе за счет сверхэкспрессии GSK3 β [105].

В клетках от NLRP3 нокаутных животных наблюдается слабый флуоресцентный сигнал GSK3 β . Старение у этих мышей не увеличивает экспрессию GSK3 β . Таким образом, нами показана роль NLRP3 инфламмасом в инсулиновой сигнализации. С одной стороны экспрессия на базальном уровне необходима для инсулин-зависимого транспорта глюкозы, с другой стороны гиперэкспрессия, наблюдаемая при старении приводит к нарушению нижележащих путей инсулиновой сигнализации.

Известно, что снижение экспрессии или сериновое фосфорилирование белков IRS может уменьшить их связывание с PI3K, тем самым снижая активацию PI3K и способствуя развитию инсулинорезистентности. Кроме того, повышение уровня неэстерифицированных жирных кислот в плазме крови ухудшало инсулин-индуцированное повышение активности IRS-1-

ассоциированного PI3K, но при этом не наблюдалось дефекта фосфорилирования Akt [125]. Также и в нашем исследовании были получены данные относительно экспрессии pAkt, демонстрирующие повышение экспрессии при старении.

Таким образом, основываясь на совокупности полученных данных при анализе маркеров инсулинорезистентности, продемонстрировано, что с возрастом (физиологическое старение) наблюдается развитие нарушения инсулиновой сигнализации, однако достоверно о развитии инсулинорезистентности еще не приходится говорить. Тем не менее, изменение экспрессии GSK3beta может приводить к последующим нижележащим изменениям патофизиологических путей. При этом NLRP3 играет важную роль в инсулиновой сигнализации.

Блокировка NLRP3	Интактный уровень NLRP3	Активация NLRP3
↓ Сенесценция и SASP ↓ экспрессия фосфорилированных протеинкиназ – компонентов метафламмасом ↓ нарушения инсулиновой сигнализации ↑ контекстуальная память ↑ сигнальная память ↑ тревожно-подобное поведение	↑ Сенесценция и SASP ↑ экспрессия фосфорилированных протеинкиназ – компонентов метафламмасом ↑ нарушения инсулиновой сигнализации ↓ контекстуальная память ↓ социальная активность ↑ тревожно-подобное поведение	↑↑ Сенесценция и SASP ↑↑ экспрессии фосфорилированных протеинкиназ – компонентов метафламмасом ↑ нарушения инсулиновой сигнализации??

Рисунок 57 - Эффекты модуляции активности NLRP3-инфламмосомы при старении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведённого исследования получены новые данные о роли инфламماسомы NLRP3 в процессах старения мозга, развитии нейровоспаления, формировании поведенческих фенотипов, клеточной сенесценции, а также в регуляции метафламмасом и инсулиновой сигнализации.

Показано, что старение сопровождается нарушением контекстуальной памяти, усилением тревожного поведения и снижением социальной активности у мышей дикого типа. При этом нокаут *Nlrp3* или фармакологическая блокада (MCC950, глибенкламид) оказывают протективный эффект в отношении ряда когнитивных и социальных функций, однако не предотвращают тревожно-подобное поведение. Полученные данные свидетельствуют о том, что NLRP3 является ключевым медиатором в формировании возрастных когнитивных и социальных изменений.

Старение сопровождается увеличением количества сенесцентных клеток и повышением экспрессии провоспалительных маркеров. Однако фармакологическая модуляция с использованием глибенкламида и MCC950 *in vitro* не оказывает значимого влияния на иммуносенесценцию. При этом *in vivo* применение MCC950 демонстрирует защитный эффект, снижая вероятность развития секреторного фенотипа, связанного со старением (SASP). Делеция *Nlrp3* предотвращает формирование SASP фенотипа с возрастом, что указывает на ее протекторную роль. Эти данные подчёркивают сложность взаимодействия между клеточной сенесценцией, воспалением и возрастными изменениями, а также необходимость дальнейшего изучения регулирующих механизмов для разработки стратегий замедления старения и профилактики возрастных заболеваний.

NLRP3 инфламماسомы участвуют в нормальном транспорте глюкозы, зависящего от инсулина, на уровне базальной экспрессии. При старении наблюдается гиперэкспрессия NLRP3, что приводит к нарушению ключевых компонентов инсулиновой сигнализации. Обобщенный анализ маркеров инсулинорезистентности подтверждает, что физиологическое старение

сопровождается изменениями, связанными с нарушением инсулиновой чувствительности, хотя развитие полной инсулинорезистентности не доказано. Изменения в экспрессии GSK3 β могут являться ранним предвестником этих нарушений. Эти данные открывают перспективу дальнейших исследований механизмов, связывающих NLRP3 инфламмасомы и нарушение инсулиновой сигнализации при старении.

Особое внимание уделено экспрессии компонентов метафламмасом. Снижение экспрессии NLRP3 фармакологическими и генетическими методами предотвращает фосфорилирование ключевых протеинкиназ метафламмасомного комплекса (PKR, IKK β , JNK). Глибенкламид и MCC950 уменьшают уровень их фосфорилированных форм, особенно в условиях старения, что связано с подавлением экспрессии NLRP3 и IL-18. Эти результаты указывают на потенциал модуляции NLRP3 и протеинкиназ метафламмасомы как целевого подхода для контроля возрастных изменений и воспалительных процессов в ЦНС.

Совокупность полученных данных позволяет рассматривать NLRP3-инфламмасому как центральное звено, связывающее метаболические нарушения и воспалительный ответ при старении мозга. Установлено, что активация протеинкиназ метафламмасомного комплекса (PKR, IKK β , JNK), повышение активности GSK3 β и нарушение глюкозного транспорта (GLUT4) формируют метаболический субстрат хронического нейровоспаления. Генетическая инактивация или фармакологическая блокада NLRP3 прерывают этот патогенетический каскад, предотвращая развитие клеточной сенесценции и поддерживая когнитивные функции.

ВЫВОДЫ

1. Генетическая инактивация инфламماسомы NLRP3 предотвращает развитие возраст-зависимых когнитивных и социальных нарушений. У мышей с делецией гена *Nlrp3* не выявлено снижения исследовательской активности, социальной вовлечённости и способности к обучению, характерных для стареющих животных дикого типа. Это подтверждает ведущую роль NLRP3 инфламماسомы в регуляции нейрон-глиальных взаимодействий и формировании поведенческого фенотипа старения.

2. Возраст и воздействие липополисахарида (LPS) вызывают формирование воспалительного и сенесцентного фенотипа (SASP), опосредованного NLRP3 инфламмасомой. В мозге и органотипических культурах гиппокампа животных дикого типа наблюдается повышение экспрессии IL-1 β , IL-18, HMGB1 и SA- β -gal, отражающее активацию NLRP3 и развитие SASP-фенотипа. У нокаутных по *Nlrp3* мышей эти эффекты существенно снижены, а при воздействии LPS активация инфламماسомы подавляется фармакологической блокадой, что подтверждает участие NLRP3 в индукции воспалительно-сенесцентного состояния.

3. Выявлено повышение экспрессии компонентов метафламмасом (PKR и IKK β) у стареющих животных дикого типа, что сопровождается активацией воспалительных путей. Делеция *Nlrp3* и фармакологическая блокада приводят к снижению этих изменений. При старении наблюдаются нарушения инсулиновой сигнализации, включая снижение GLUT4 и повышение GSK3 β . У мышей с делецией *Nlrp3* эти изменения менее выражены, что подтверждает участие NLRP3 инфламماسомы в регуляции метаболических процессов мозга.

4. Снижение экспрессии NLRP3 фармакологическими и генетическими методами предотвращает фосфорилирование ключевых протеинкиназ метафламмасомного комплекса (PKR, IKK β , JNK). Глибенкламид и MCC950 уменьшают уровень их фосфорилированных форм, особенно в условиях старения, что связано с подавлением экспрессии NLRP3 и IL-18. Эти результаты

подтверждают потенциал модуляции NLRP3 и протеинкиназ метафламмасомы как целевого подхода для контроля возрастных нейровоспалительных изменений.

5. Генетическая и фармакологическая блокада NLRP3 инфламмасомы оказывают защитное действие при старении, однако различаются по спектру эффекта: генетическая модуляция эффективнее для сохранения когнитивных и социальных функций, фармакологическая — для подавления воспалительных процессов. Комбинированный подход представляет перспективу для коррекции возрастных нарушений и поддержания функциональной пластичности мозга.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Akt – протеинкиназа B

AMPK - AMP-активируемая протеинкиназа

A β - амилоид бета

BSA- альбумин бычьей сыворотки

CS (conditioned stimulus) – условный раздражитель

DAMP - молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – краситель для ядер клеток

DMEM - модифицированная среда Дульбекко

ERK1/2 – киназа MAPK сигнального пути

GFAP - глиальный фибриллярный кислый белок

GLUT - глюкозный транспортер

GSK3 β - киназа гликогенсинтазы 3 β

HMGB1 - белок группы высокой подвижности B1, амфотерин

IGF-1 инсулиноподобный фактор роста-1

IKK β - ингибитор каппа-B киназы

IL - интерлейкин

IR – инсулиновый рецептор, рецептор к инсулину

IRS1 - субстрат инсулинового рецептора 1

JNK - c-Jun N-терминальная киназа

LPS - липополисахарид

LTD – долговременная депрессия

LTP – долговременная потенция

mTOR - механистическая мишень рапамицина

NAD - никотинамидадениндинуклеотид

NeuN - нейрональный ядерный белок

NF- κ B - ядерный фактор каппа B

NLR - NOD-подобный рецептор

NLRP3 - NOD-подобное семейство рецепторов, пириновый домен, содержащий 3

NLRP3 KO – мыши, нокаутные по гену Nlrp3

OXPPOS - окислительное фосфорилирование

PAMP - патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

PBS - фосфатно-солевой буфер

PFKFB - 6-фосфофрукто-2-киназа/фруктозо-2,6-бифосфатаза

pIRS-Ser – субстрат инсулинового рецептора, фосфорилированный по серину

PKR - РНК-зависимая протеинкиназа

PRR - паттерн-распознающий рецептор

RLR - RIG- I-подобный рецептор

SASP - секреторный фенотип, ассоциированный со старением

TLR - Toll-подобный рецептор

TLR - Toll-подобный рецептор

TNF- α - фактор некроза опухоли альфа

US (unconditioned stimulus) – безусловный стимул

WT – мыши дикого типа

АФК - активные формы кислорода

НСК - нейрональные стволовые клетки

ЦНС - центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Артемьева О. В. Воспалительное старение как основа возраст-ассоциированной патологии / О. В. Артемьева, Л. В. Ганковская // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 419-432
2. Ахмедов Т. А. Инфламейджинг как основа патофизиологического геронтологического континуума и преждевременного старения (на примере гериатрических синдромов и сосудистой патологии) / Т. А. Ахмедов, У. Р. Сагинбаев, С. А. Рукавишникова [и др.] // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики – 2022 – № 1. – С. 35-44
3. Булгакова С. В. Инсулин, головной мозг, болезнь Альцгеймера: новые данные / С. В. Булгакова, П. И. Романчук, Е. В. Тренева // Бюллетень науки и практики. – 2020. – Т. 6. – № 3. – С. 96-126
4. Гаранина Е. Е. Инфламмасомы: роль в патогенезе заболеваний и терапевтический потенциал / Е. Е. Гаранина, Мартынова Е. В., К. Я. Иванов [и др.] // Ученые записки казанского университета. Серия естественные науки. – 2020. – Т. 162. – № 1. – С. 80-111
5. Гариб Ф. Ю. Инфламмасомы и воспаление / Гариб Ф. Ю., Ризопулу А. П. // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 11. – № 4. – С. 30-36
6. Горина Я.В. Батарея тестов для поведенческого фенотипирования стареющих животных в эксперименте / Горина Я.В., Комлева Ю.К., Лопатина О.Л. [и др.] // Успехи геронтологии. – №. 1. – С. 49-55
7. Дзгоева Ф. Х. Когнитивные расстройства у пациентов с ожирением и нарушением углеводного обмена (дисгликемией) / Ф. Х. Дзгоева, Е. В. Екушева, В. В. Демидова. – Текст : электронный // Проблемы эндокринологии. – 2024. – Т. 70. – № 4. – С. 75-83
8. Михеев Р. К. Молекулярные и клеточные механизмы старения: современные представления (обзор литературы) / Р. К. Михеев, Е. Н. Андреева, О. Р. Григорян [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2023. – Т. 69. – № 5. – С. 45-54

9. Пашенков М. В. Механизмы воспалительного старения / М. В. Пашенков, А. М. Масютина // Иммунология. – 2024. – Т. 45. – № 6. – С. 806-818
10. Пирожков С. В. Роль инфламмасом в развитии нервных и психических заболеваний / С. В. Пирожков, Н. Н. Теребилина, П. Ф. Литвицкий. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2018. – Т. 118. – № 12. – С. 81
11. Помыткин И. А. Инсулиновый рецептор в мозге: новая мишень в лечении центральной инсулиновой резистентности / Помыткин И. А., Красильникова И. А., Пинелис В. Г., Каркищенко Н. Н. // Биомедицина. – 2018. – № 3. – С. 17-34
12. Хилажева Е. Д. Получение трехклеточной модели нейроваскулярной единицы *in vitro* / Хилажева Е. Д., Бойцова Е. Б., Пожиленкова Е. А. [и др.] // Цитология. – Т. 57. – № 10. – С. 710-713
13. Чердак М. А. Старение головного мозга / М. А. Чердак // Проблемы геронауки. – 2023. – № 2. – С. 71-79
14. Шевчук Д. В. Роль инфламмасом в патогенезе нейродегенеративных заболеваний / Шевчук Д. В., Абрамова А. А., Захарова М. Н. // Нейрохимия. – 2022. – Т. 39. – № 3. – С. 251-264
15. Abais J. M. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? / J. M. Abais, M. Xia, Y. Zhang [и др.] // Antioxidants & Redox Signaling. – 2015. – Т. 22. – Redox regulation of NLRP3 inflammasomes. – № 13. – С. 1111-1129
16. Ahmad S. 6-Aminoflavone Activates Nrf2 to Inhibit the Phospho-JNK/TNF- α Signaling Pathway to Reduce Amyloid Burden in an Aging Mouse Model / S. Ahmad, S. A. Shah, U. Nishan [и др.] // ACS Omega. – 2023. – Т. 8. – № 30. – С. 26955-26964
17. Amani M. Rapid Aging in the Perforant Path Projections to the Rodent Dentate Gyrus / M. Amani, J. C. Lauterborn, A. A. Le [и др.] // The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. – 2021. – Т. 41. – № 10. – С. 2301-2312

18. Ansari S. A. The Role of Insulin Resistance and Protein O-GlcNAcylation in Neurodegeneration / S. A. Ansari, B. S. Emerald // *Frontiers in Neuroscience*. – 2019. – T. 13. – C. 473
19. Appleton J. P. Hypercholesterolaemia and vascular dementia / J. P. Appleton, P. Scutt, N. Sprigg, P. M. Bath // *Clinical Science (London, England: 1979)*. – 2017. – T. 131. – № 14. – C. 1561-1578
20. Arias-Cavieres A. Aging Impairs Hippocampal- Dependent Recognition Memory and LTP and Prevents the Associated RyR Up-regulation / A. Arias-Cavieres, T. Adasme, G. Sánchez [и др.] // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2017. – T. 9. – C. 111
21. Atabi F. A systematic review on type 3 diabetes: bridging the gap between metabolic dysfunction and Alzheimer's disease / F. Atabi, M. Moassesfar, T. Nakhaie [и др.] // *Diabetology & Metabolic Syndrome*. – 2025. – T. 17. – № 1. – C. 356
22. Balaban R. S. Mitochondria, oxidants, and aging / R. S. Balaban, S. Nemoto, T. Finkel // *Cell*. – 2005. – T. 120. – № 4. – C. 483-495
23. Battaglia S. Context-dependent extinction of threat memories: influences of healthy aging / S. Battaglia, S. Garofalo, G. di Pellegrino // *Scientific Reports*. – 2018. – T. 8. – Context-dependent extinction of threat memories. – № 1. – C. 12592
24. Beddows C. A. Insulin on the brain: The role of central insulin signalling in energy and glucose homeostasis / C. A. Beddows, G. T. Dodd // *Journal of Neuroendocrinology*. – 2021. – T. 33. – Insulin on the brain. – № 4. – C. e12947
25. Bergsbaken T. Pyroptosis: host cell death and inflammation / T. Bergsbaken, S. L. Fink, B. T. Cookson // *Nature Reviews. Microbiology*. – 2009. – T. 7. – Pyroptosis. – № 2. – C. 99-109
26. Bernier B. E. Dentate Gyrus Contributes to Retrieval as well as Encoding: Evidence from Context Fear Conditioning, Recall, and Extinction / B. E. Bernier, A. F. Lacagnina, A. Ayoub [и др.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2017. – T. 37
27. Bernier L.-P. Immunometabolism in the Brain: How Metabolism Shapes Microglial Function / L.-P. Bernier, E. M. York, B. A. MacVicar // *Trends in*

Neurosciences. – 2020. – T. 43. – Immunometabolism in the Brain. – № 11. – C. 854-869

28. Bettio L. E. B. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline / L. E. B. Bettio, L. Rajendran, J. Gil-Mohapel // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2017. – T. 79. – C. 66-86

29. Blázquez E. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease / E. Blázquez, E. Velázquez, V. Hurtado-Carneiro, J. M. Ruiz-Albusac // Frontiers in Endocrinology. – 2014. – T. 5. – Insulin in the brain. – C. 161

30. Blinkouskaya Y. Brain aging mechanisms with mechanical manifestations / Y. Blinkouskaya, A. Caçoilo, T. Gollamudi [и др.] // Mechanisms of Ageing and Development. – 2021. – T. 200. – C. 111575

31. Bossù P. Interleukin-18, from neuroinflammation to Alzheimer's disease / P. Bossù, A. Ciaramella, F. Salani [и др.] // Current Pharmaceutical Design. – 2010. – T. 16. – № 38. – C. 4213-4224

32. Boura-Halfon S. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance / S. Boura-Halfon, Y. Zick // American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism. – 2009. – T. 296. – № 4. – C. E581-591

33. Bouton M. E. Behavioral and neurobiological mechanisms of pavlovian and instrumental extinction learning / M. E. Bouton, S. Maren, G. P. McNally // Physiological Reviews. – 2021. – T. 101. – № 2. – C. 611-681

34. Braidy N. Mapping NAD(+) metabolism in the brain of ageing Wistar rats: potential targets for influencing brain senescence / N. Braidy, A. Poljak, R. Grant [и др.] // Biogerontology. – 2014. – T. 15. – Mapping NAD(+) metabolism in the brain of ageing Wistar rats. – № 2. – C. 177-198

35. Broderick L., De Nardo D., Franklin B.S., Hoffman H.M., Latz E. The inflammasomes and autoinflammatory syndromes / Broderick L., De Nardo D., Franklin B.S., Hoffman H.M., Latz E. – 2015. – T. 10. – C. 395-424

36. Bulloj A. Detergent resistant membrane-associated IDE in brain tissue and cultured cells: Relevance to Abeta and insulin degradation / A. Bulloj, M. C. Leal, E. I. Surace [и др.] // *Molecular Neurodegeneration*. – 2008. – Т. 3. – С. 22
37. Buss E. W. Cognitive aging is associated with redistribution of synaptic weights in the hippocampus / E. W. Buss, N. J. Corbett, J. G. Roberts [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2021. – Т. 118. – № 8. – С. e1921481118
38. Charles-Messance H. Regulating metabolic inflammation by nutritional modulation / H. Charles-Messance, K. A. J. Mitchelson, E. De Marco Castro [и др.] // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. – 2020. – Т. 146. – № 4. – С. 706-720
39. Chatterjee A. A novel selective NLRP3 inhibitor shows disease-modifying potential in animal models of Parkinson's disease / A. Chatterjee, J. Mohapatra, M. Sharma [и др.] // *Brain Research*. – 2024. – Т. 1842. – С. 149129
40. Chen Y. Insulin triggers surface-directed trafficking of sequestered GLUT4 storage vesicles marked by Rab10 / Y. Chen, J. Lippincott-Schwartz // *Small GTPases*. – 2013. – Т. 4. – № 3. – С. 193-197
41. Cheng G. Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies / G. Cheng, C. Huang, H. Deng, H. Wang // *Internal Medicine Journal*. – 2012. – Т. 42. – Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment. – № 5. – С. 484-491
42. Cherbuin N. Being overweight is associated with hippocampal atrophy: the PATH Through Life Study / N. Cherbuin, K. Sargent-Cox, M. Fraser [и др.] // *International Journal of Obesity* (2005). – 2015. – Т. 39. – Being overweight is associated with hippocampal atrophy. – № 10. – С. 1509-1514
43. Chien Y., Scuoppo C., Wang X., Fang X., Balgley B., Bolden J. E., et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity / Chien Y., Scuoppo C., Wang X., Fang X., Balgley B., Bolden J. E., et al. – 2011. – Т. 25. – С. 2125-2136

44. Colacurcio D. J. Disorders of lysosomal acidification-The emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease / D. J. Colacurcio, R. A. Nixon // *Ageing Research Reviews*. – 2016. – T. 32. – C. 75-88
45. Coll R. C. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases / R. C. Coll, A. A. B. Robertson, J. J. Chae [и др.] // *Nature Medicine*. – 2015. – T. 21. – № 3. – C. 248-255
46. Creagh E. M. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity / E. M. Creagh, L. A. J. O'Neill // *Trends in Immunology*. – 2006. – T. 27. – TLRs, NLRs and RLRs. – № 8. – C. 352-357
47. Dai D.-F. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan / D.-F. Dai, Y. A. Chiao, D. J. Marcinek [и др.] // *Longevity & Healthspan*. – 2014. – T. 3. – № 1. – C. 6
48. Danis J. Nod-Like Receptors in Host Defence and Disease at the Epidermal Barrier / J. Danis, M. Mellett // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – T. 22. – № 9. – C. 4677
49. Da Davis R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases / R. J. Davis // *Cell*. – 2000. – T. 103. – № 2. – C. 239-252
50. De Souto Barreto P, Guyonnet S, Ader I, et al. The INSPIRE research initiative: a program for GeroScience and healthy aging research going from animal models to humans and the healthcare system / De Souto Barreto P, Guyonnet S, Ader I, et al
51. Dehkordi S. K. Profiling senescent cells in human brains reveals neurons with CDKN2D/p19 and tau neuropathology / S. K. Dehkordi, J. Walker, E. Sah [и др.] // *Nature Aging*. – 2021. – T. 1. – № 12. – C. 1107-1116
52. Demars M. Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice / M. Demars, Y.-S. Hu, A. Gadadhar, O. Lazarov // *Journal of Neuroscience Research*. – 2010. – T. 88. – № 10. – C. 2103-2117
53. Ding F. Early decline in glucose transport and metabolism precedes shift to ketogenic system in female aging and Alzheimer's mouse brain: implication for

bioenergetic intervention / F. Ding, J. Yao, J. R. Rettberg [и др.] // PloS One. – 2013. – Т. 8. – Early decline in glucose transport and metabolism precedes shift to ketogenic system in female aging and Alzheimer's mouse brain. – № 11. – С. e79977

54. Diniz B. S. Mild cognitive impairment and major depressive disorder are associated with molecular senescence abnormalities in older adults / B. S. Diniz, E. M. Vieira, A. P. Mendes-Silva [и др.] // Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions. – 2021. – Т. 7. – № 1

55. Domingo-Fernández R. The intracellular chloride channel proteins CLIC1 and CLIC4 induce IL-1 β transcription and activate the NLRP3 inflammasome / R. Domingo-Fernández, R. C. Coll, J. Kearney [и др.]. – Текст : электронный // Journal of Biological Chemistry. – 2017. – Т. 292. – № 29. – С. 12077-12087

56. Dong Y. Stress-induced NLRP3 inflammasome activation negatively regulates fear memory in mice / Y. Dong, S. Li, Y. Lu [и др.] // Journal of Neuroinflammation. – 2020. – Т. 17. – № 1. – С. 205

57. Drayer B. P. Imaging of the aging brain. Part I. Normal findings / B. P. Drayer // Radiology. – 1988. – Т. 166. – № 3. – С. 785-796

58. Dresselhaus E. C. Cellular Specificity of NF- κ B Function in the Nervous System / E. C. Dresselhaus, M. K. Meffert // Frontiers in Immunology. – 2019. – Т. 10. – С. 1043

59. Duewell P. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals / P. Duewell, H. Kono, K. J. Rayner [и др.] // Nature. – 2010. – Т. 464. – № 7293. – С. 1357-1361

60. Dumitriu D. Selective changes in thin spine density and morphology in monkey prefrontal cortex correlate with aging-related cognitive impairment / D. Dumitriu, J. Hao, Y. Hara [и др.] // The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. – 2010. – Т. 30. – № 22. – С. 7507-7515

61. Edrey Y. H. Oxidative damage and amyloid- β metabolism in brain regions of the longest-lived rodents / Y. H. Edrey, S. Oddo, C. Cornelius [и др.] // Journal of Neuroscience Research. – 2014. – Т. 92. – № 2. – С. 195-205

62. Erica Costantini, Chiara D'Angelo, Marcella Reale. The Role of Immunosenescence in Neurodegenerative Diseases // Journal of Neuroscience Research. – Текст : электронный // Mediators of Inflammation. – 2018. – № 6039171. – URL:

<https://onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.1155%2F2018%2F6039171> (дата обращения: 20.06.2022)

63. Erickson K. I. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory / K. I. Erickson, M. W. Voss, R. S. Prakash [и др.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2011. – Т. 108. – № 7. – С. 3017-3022

64. Espay A. J. Revisiting protein aggregation as pathogenic in sporadic Parkinson and Alzheimer diseases / A. J. Espay, J. A. Vizcarra, L. Marsili [и др.] // Neurology. – 2019. – Т. 92. – № 7. – С. 329-337

65. Fang E. F. NAD⁺ in Aging: Molecular Mechanisms and Translational Implications / E. F. Fang, S. Lautrup, Y. Hou [и др.] // Trends in Molecular Medicine. – 2017. – Т. 23. – NAD⁺ in Aging. – № 10. – С. 899-916

66. Feldman N. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies / N. Feldman, A. Rotter-Maskowitz, E. Okun // Ageing Research Reviews. – 2015. – Т. 24. – № Pt A. – С. 29-39

67. Ferrari C. C. Reversible demyelination, blood-brain barrier breakdown, and pronounced neutrophil recruitment induced by chronic IL-1 expression in the brain / C. C. Ferrari, A. M. Depino, F. Prada [и др.] // The American Journal of Pathology. – 2004. – Т. 165. – № 5. – С. 1827-1837

68. Ferrari D. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release / D. Ferrari, C. Pizzirani, E. Adinolfi [и др.] // Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950). – 2006. – Т. 176. – The P2X7 receptor. – № 7. – С. 3877-3883

69. Fjell A. M. One-year brain atrophy evident in healthy aging / A. M. Fjell, K. B. Walhovd, C. Fennema-Notestine [и др.] // The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience. – 2009. – Т. 29. – № 48. – С. 15223-15231

70. Franceschi C. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence / C. Franceschi, M. Bonafè, S. Valensin [и др.] // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2000. – Т. 908. – С. 244-254
71. Franceschi C. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space / C. Franceschi, M. Bonafè, S. Valensin // *Vaccine*. – 2000. – Т. 18. – № 16. – С. 1717-1720
72. Franceschi C. Inflammaging 2018: An update and a model / C. Franceschi, A. Zaikin, S. Gordleeva [и др.] // *Seminars in Immunology*. – 2018. – Т. 40. – Inflammaging 2018. – С. 1-5
73. Gabbouj S. Altered Insulin Signaling in Alzheimer's Disease Brain – Special Emphasis on PI3K-Akt Pathway / S. Gabbouj, S. Ryhänen, M. Marttinen [и др.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2019. – Т. 13. – С. 629
74. Gaikwad S. Tau oligomer induced HMGB1 release contributes to cellular senescence and neuropathology linked to Alzheimer's disease and frontotemporal dementia / S. Gaikwad, N. Puangmalai, A. Bittar [и др.]. – Текст : электронный // *Cell Reports*. – 2021. – Т. 36. – № 3. – URL: [https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247\(21\)00832-9](https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247(21)00832-9) (дата обращения: 04.10.2025)
75. Gao L. NLRP3 inflammasome: a promising target in ischemic stroke / L. Gao, Q. Dong, Z. Song [и др.] // *Inflammation Research*. – 2017. – Т. 66. – NLRP3 inflammasome. – № 1. – С. 17-24
76. Ghezzi D. Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes: physiology and pathophysiology / D. Ghezzi, M. Zeviani // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2012. – Т. 748. – Assembly factors of human mitochondrial respiratory chain complexes. – С. 65-106
77. Gil-Mohapel J. Hippocampal neurogenesis levels predict WATERMAZE search strategies in the aging brain / J. Gil-Mohapel, P. S. Brocardo, W. Choquette [и др.] // *PloS One*. – 2013. – Т. 8. – № 9. – С. e75125

78. Gorgoulis V. Cellular Senescence: Defining a Path Forward / V. Gorgoulis, P. D. Adams, A. Alimonti [и др.] // *Cell*. – 2019. – Т. 179. – Cellular Senescence. – № 4. – С. 813-827

79. Grajauskas L. A. MRI-based evaluation of structural degeneration in the ageing brain: Pathophysiology and assessment / L. A. Grajauskas, W. Siu, G. Medvedev [и др.] // *Ageing Research Reviews*. – 2019. – Т. 49. – MRI-based evaluation of structural degeneration in the ageing brain. – С. 67-82

80. Gritsenko A. Mechanisms of NLRP3 priming in inflammaging and age related diseases / A. Gritsenko, J. P. Green, D. Brough, G. Lopez-Castejon // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. – 2020. – Т. 55. – С. 15-25

81. Gurung P. FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes / P. Gurung, P. K. Anand, R. K. S. Malireddi [и др.] // *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. – 2014. – Т. 192. – № 4. – С. 1835-1846

82. Hayden M. S. Shared principles in NF-kappaB signaling / M. S. Hayden, S. Ghosh // *Cell*. – 2008. – Т. 132. – № 3. – С. 344-362

83. Heneka M. T. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease / M. T. Heneka, R. M. McManus, E. Latz // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2018. – Т. 19. – № 10. – С. 610-621

84. Heneka M. T. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice / M. T. Heneka, M. P. Kummer, A. Stutz [и др.] // *Nature*. – 2013. – Т. 493. – № 7434. – С. 674-678

85. Heneka M. T. Innate immune activation in neurodegenerative disease. / M. T. Heneka, M. P. Kummer, E. Latz // *Nature Reviews Immunology*. – 2014. – Т. 14. – № 7. – С. 463-477

86. Heneka M. T. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. / M. T. Heneka, M.J. Carson, J. El Khoury [и др.] // *Lancet Neurology*. – 2015. – Т. 14. – № 4. – С. 388-405

87. Henstridge D. C. Skeletal muscle-specific overproduction of constitutively activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) induces insulin resistance in mice / D. C.

Henstridge, C. R. Bruce, C. P. Pang [и др.] // *Diabetologia*. – 2012. – Т. 55. – № 10. – С. 2769-2778

88. Hirosumi J. A central role for JNK in obesity and insulin resistance / J. Hirosumi, G. Tuncman, L. Chang [и др.] // *Nature*. – 2002. – Т. 420. – № 6913. – С. 333-336

89. Hughes T. M. The role of insulin in the vascular contributions to age-related dementia : Vascular contributions to cognitive impairment and dementia (VCID) / T. M. Hughes, S. Craft // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. – 2016. – Т. 1862. – № 5. – С. 983-991

90. Ivanisevic J. Metabolic drift in the aging brain / J. Ivanisevic, K. L. Stauch, M. Petrascheck [и др.] // *Aging*. – 2016. – Т. 8. – № 5. – С. 1000-1020

91. Jack C. R. Medial temporal atrophy on MRI in normal aging and very mild Alzheimer's disease / C. R. Jack, R. C. Petersen, Y. C. Xu [и др.] // *Neurology*. – 1997. – Т. 49. – № 3. – С. 786-794

92. Jessop F. Autophagy deficiency in macrophages enhances NLRP3 inflammasome activity and chronic lung disease following silica exposure / F. Jessop, R. F. Hamilton, J. F. Rhoderick [и др.] // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2016. – Т. 309. – С. 101-110

93. Jha S., Srivastava S.Y., Brickey W.J., Iocca H., Toews A., Morrison J.P., Chen V.S., Gris D., Matsushima G.K., Ting J.P. The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. / Jha S., Srivastava S.Y., Brickey W.J., Iocca H., Toews A., Morrison J.P., Chen V.S., Gris D., Matsushima G.K., Ting J.P. – 2010. – Т. 30. – № 47. – С. 15811-15820

94. Jiang B. Role of Glibenclamide in Brain Injury After Intracerebral Hemorrhage / B. Jiang, L. Li, Q. Chen [и др.] // *Translational Stroke Research*. – 2017. – Т. 8. – № 2. – С. 183-193

95. Jiang H. Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders / H. Jiang, H. He, Y. Chen [и др.]. – Текст : электронный // *Journal of Experimental Medicine*. – 2017. – Т. 214. – № 11. – С. 3219-3238

96. Jiang Y. Epac1 inhibits PKR to reduce NLRP3 inflammasome proteins in retinal endothelial cells / Y. Jiang, J. J. Steinle // *Journal of Inflammation Research*. – 2019. – T. Volume 12. – C. 153-159
97. Jo E.-K. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation / E.-K. Jo, J. K. Kim, D.-M. Shin, C. Sasakawa // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2016. – T. 13. – № 2. – C. 148-159
98. Jorquera G. NLRP3 Inflammasome: Potential Role in Obesity Related Low-Grade Inflammation and Insulin Resistance in Skeletal Muscle / G. Jorquera, J. Russell, M. Monsalves-Álvarez [и др.]. – Текст: электронный // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – T. 22. – NLRP3 Inflammasome. – № 6. – C. 3254
99. Jurk D. Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response / D. Jurk, C. Wang, S. Miwa [и др.] // *Aging Cell*. – 2012. – T. 11. – № 6. – C. 996-1004
100. Kahn B. B. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism / B. B. Kahn, T. Alquier, D. Carling, D. G. Hardie // *Cell Metabolism*. – 2005. – T. 1. – AMP-activated protein kinase. – № 1. – C. 15-25
101. Kanbay M. A journey from microenvironment to macroenvironment: the role of metaflammation and epigenetic changes in cardiorenal disease / M. Kanbay, A. Yerlikaya, A. A. Sag [и др.] // *Clinical Kidney Journal*. – 2019. – T. 12. – A journey from microenvironment to macroenvironment. – № 6. – C. 861-870
102. Kanbay M. The crosstalk of gut microbiota and chronic kidney disease: role of inflammation, proteinuria, hypertension, and diabetes mellitus / M. Kanbay, E.M. Onal, B. Afsar [и др.] // *International Urology and Nephrology*. – 2018. – № 50. – C. 1453–1466
103. Kandimalla R. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal / R. Kandimalla, V. Thirumala, P. H. Reddy // *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. – 2017. – T. 1863. – Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? – № 5. – C. 1078-1089

104. Kang L. Physiological and Molecular Characteristics of Rat Hypothalamic Ventromedial Nucleus Glucosensing Neurons / L. Kang, V. H. Routh, E. V. Kuzhikandathil [и др.] // *Diabetes*. – 2004. – Т. 53. – № 3. – С. 549-559
105. Kang S. Agmatine ameliorates type 2 diabetes induced-Alzheimer's disease-like alterations in high-fat diet-fed mice via reactivation of blunted insulin signalling / S. Kang, C.-H. Kim, H. Jung [и др.] // *Neuropharmacology*. – 2017. – Т. 113. – С. 467-479
106. Kang S. Microglia undergo sex-dimorphic transcriptional and metabolic rewiring during aging / S. Kang, E. Y. Ko, A. E. Andrews [и др.] // *Journal of Neuroinflammation*. – 2024. – Т. 21. – № 1. – С. 150
107. Kanneganti T.-D. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3 / T.-D. Kanneganti, N. Ozören, M. Body-Malapel [и др.] // *Nature*. – 2006. – Т. 440. – № 7081. – С. 233-236
108. Karakasilioti I. DNA damage triggers a chronic autoinflammatory response, leading to fat depletion in NER progeria / I. Karakasilioti, I. Kamileri, G. Chatzinikolaou [и др.] // *Cell Metabolism*. – 2013. – Т. 18. – № 3. – С. 403-415
109. Kaur J. Intracellular DAMPs in Neurodegeneration and Their Role in Clinical Therapeutics / J. Kaur, H. Singh, S. Naqvi // *Molecular Neurobiology*. – 2023. – Т. 60. – № 7. – С. 3600-3616
110. Kelley N. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation / N. Kelley, D. Jeltema, Y. Duan, Y. He // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Т. 20. – The NLRP3 Inflammasome. – № 13. – С. 3328
111. Kerr J. S. Mitophagy and Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Mechanisms / J. S. Kerr, B. A. Adriaanse, N. H. Greig [и др.] // *Trends in Neurosciences*. – 2017. – Т. 40. – Mitophagy and Alzheimer's Disease. – № 3. – С. 151-166
112. Khacho M. Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by Regulating a Nuclear Transcriptional Program / M. Khacho, A. Clark, D. S. Svoboda [и др.] // *Cell Stem Cell*. – 2016. – Т. 19. – № 2. – С. 232-247

113. Khacho M. Mitochondria as central regulators of neural stem cell fate and cognitive function / M. Khacho, R. Harris, R. S. Slack // Nature Reviews. Neuroscience. – 2019. – Т. 20. – № 1. – С. 34-48

114. Khan S. S. Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans / S. S. Khan, B. D. Singer, D. E. Vaughan // Aging Cell. – 2017. – Т. 16. – № 4. – С. 624-633

115. Kim J.-Y. *Streptococcus pneumoniae* induces pyroptosis through the regulation of autophagy in murine microglia / J.-Y. Kim, J. C. Paton, D. E. Briles [и др.] // Oncotarget. – 2015. – Т. 6. – № 42. – С. 44161-44178

116. Klune J. R. HMGB1: Endogenous Danger Signaling / J. R. Klune, R. Dhupar, J. Cardinal [и др.] // Molecular Medicine. – 2008. – Т. 14. – HMGB1. – № 7-8. – С. 476-484

117. Ko J. H. Rapamycin regulates macrophage activation by inhibiting NLRP3 inflammasome-p38 MAPK-NF κ B pathways in autophagy- and p62-dependent manners / J. H. Ko, S.-O. Yoon, H. J. Lee, J. Y. Oh // Oncotarget. – 2017. – Т. 8. – № 25. – С. 40817-40831

118. Koedel U. Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis / U. Koedel, T. Frankenberg, S. Kirschnek [и др.] // PLoS pathogens. – 2009. – Т. 5. – № 5. – С. e1000461

119. Komleva Y. Early changes in hippocampal neurogenesis induced by soluble Ab1-42 oligomers / Y. K. Komleva, O. L. Lopatina, I. V. Gorina [и др.] // Biomeditsinskaya Khimiya. – 2018. – Т. 64. – № 4. – С. 326-333

120. Komleva Y. Inflamm-Aging and Brain Insulin Resistance: New Insights and Role of Life-style Strategies on Cognitive and Social Determinants in Aging and Neurodegeneration / Y. Komleva, A. Chernykh, O. Lopatina [и др.] // Frontiers in Neuroscience. – 2021. – Т. 14. – Inflamm-Aging and Brain Insulin Resistance. – С. 618395

121. Komleva Y. K. NLRP3 deficiency-induced hippocampal dysfunction and anxiety-like behavior in mice / Y. K. Komleva, O. L. Lopatina, I. V. Gorina [и др.] // Brain Research. – 2021. – Т. 1752. – С. 147220

122. Komleva Y. K. NLRP3 Inflammasome Blocking as a Potential Treatment of Central Insulin Resistance in Early-Stage Alzheimer's Disease / Y. K. Komleva, I. V. Potapenko, O. L. Lopatina [и др.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Т. 22. – № 21. – С. 11588

123. Komleva Y. K. Expression of NLRP3 Inflammasomes in Neurogenic Niche Contributes to the Effect of Spatial Learning in Physiological Conditions but Not in Alzheimer's Type Neurodegeneration / Y. K. Komleva, O. L. Lopatina, Y. V. Gorina [и др.] // Cellular and Molecular Neurobiology. – 2022. – Т. 42. – № 5. – С. 1355-1371

124. Kreiling J. A. Age-associated increase in heterochromatic marks in murine and primate tissues / J. A. Kreiling, M. Tamamori-Adachi, A. N. Sexton [и др.] // Aging Cell. – 2011. – Т. 10. – № 2. – С. 292-304

125. Kruszynska Y. T. Fatty Acid-Induced Insulin Resistance: Decreased Muscle PI3K Activation But Unchanged Akt Phosphorylation / Y. T. Kruszynska, D. S. Worrall, J. Ofrecio [и др.] // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2002. – Т. 87. – Fatty Acid-Induced Insulin Resistance. – № 1. – С. 226-234

126. Kuryłowicz A. Anti-Inflammatory Strategies Targeting Metaflammation in Type 2 Diabetes / A. Kuryłowicz, K. Koźniewski // Molecules. – 2020. – Т. 25. – № 9. – С. 2224

127. Kuryłowicz A. Induction of Adipose Tissue Browning as a Strategy to Combat Obesity/ A. Kuryłowicz, M. Puzianowska-Kuźnicka// International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – № 17. – С. 6241

128. Kuryłowicz A. The Role of Isoflavones in Type 2 Diabetes Prevention and Treatment—A Narrative Review // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 22. – № 1. – С. 218

129. Lamkanfi M. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome / M. Lamkanfi, J. L. Mueller, A. C. Vitari [и др.] // *Journal of Cell Biology*. – 2009. – Т. 187. – № 1. – С. 61-70
130. Langlais P. Global IRS-1 phosphorylation analysis in insulin resistance / P. Langlais, Z. Yi, J. Finlayson [и др.] // *Diabetologia*. – 2011. – Т. 54. – № 11. – С. 2878-2889
131. Lara-Reyna S. Inflammasome activation: from molecular mechanisms to autoinflammation / S. Lara-Reyna, E. A. Caseley, J. Topping [и др.] // *Clinical & Translational Immunology*. – 2022. – Т. 11. – Inflammasome activation. – № 7. – С. e1404
132. Latz E. NLRP3 inflammasome activation in inflammaging / E. Latz, P. Duewell // *Seminars in Immunology*. – 2018. – Т. 40. – С. 61-73
133. Li H. Intranasal Administration of Insulin Reduces Chronic Behavioral Abnormality and Neuronal Apoptosis Induced by General Anesthesia in Neonatal Mice / H. Li, C. Dai, J.-H. Gu [и др.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2019. – Т. 13. – С. 706
134. Li H. Therapeutic potential of MCC950, a specific inhibitor of NLRP3 inflammasome / H. Li, Y. Guan, B. Liang [и др.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2022. – Т. 928. – С. 175091
135. Li M. Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy / M. Li, X. Chi, Y. Wang [и др.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2022. – Т. 7. – Trends in insulin resistance. – № 1. – С. 216
136. López-Otín C. The hallmarks of aging / C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge [и др.] // *Cell*. – 2013. – Т. 153. – № 6. – С. 1194-1217
137. López-Otín C. Hallmarks of aging: An expanding universe / C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge [и др.] // *Cell*. – 2023. – Т. 186. – Hallmarks of aging. – № 2. – С. 243-278
138. Lövdén M. A theoretical framework for the study of adult cognitive plasticity. / M. Lövdén, L. Bäckman, U. Lindenberger [и др.] // *Psychological Bulletin*. – 2010. – Т. 136. – № 4. – С. 659-676

139. Lyman M. Neuroinflammation: The role and consequences / M. Lyman, D. G. Lloyd, X. Ji [и др.] // *Neuroscience Research*. – 2014. – Т. 79. – Neuroinflammation. – С. 1-12
140. Marchetti C. NLRP3 inflammasome inhibitor OLT1177 suppresses joint inflammation in murine models of acute arthritis / C. Marchetti, B. Swartzwelter, M. I. Koenders [и др.] // *Arthritis Research & Therapy*. – 2018. – Т. 20. – № 1. – С. 169
141. Marín-Aguilar F. NLRP3 inflammasome suppression improves longevity and prevents cardiac aging in male mice / F. Marín-Aguilar, A. V. Lechuga-Vieco, E. Alcocer-Gómez [и др.] // *Aging Cell*. – 2020. – Т. 19. – № 1
142. Marín-Aguilar F. NLRP3 inflammasome suppression improves longevity and prevents cardiac aging in male mice / F. Marín-Aguilar, A. V. Lechuga-Vieco, E. Alcocer-Gómez [и др.] // *Aging Cell*. – 2020. – Т. 19. – № 1. – С. e13050
143. Martínez-Zamudio R. I. Senescence-associated β -galactosidase reveals the abundance of senescent CD8⁺ T cells in aging humans / R. I. Martínez-Zamudio, H. K. Dewald, T. Vasilopoulos [и др.]. – Текст : электронный // *Aging Cell*. – 2021. – Т. 20. – № 5. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ace1.13344> (дата обращения: 20.06.2022)
144. Martínez-Zamudio R. I. Senescence-associated β -galactosidase reveals the abundance of senescent CD8⁺ T cells in aging humans / R. I. Martínez-Zamudio, H. K. Dewald, T. Vasilopoulos [и др.] // *Aging Cell*. – 2021. – Т. 20. – № 5. – С. e13344
145. Martinon F. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome / F. Martinon, V. Pétrilli, A. Mayor [и др.] // *Nature*. – 2006. – Т. 440. – № 7081. – С. 237-241
146. Marzola P. Exploring the Role of Neuroplasticity in Development, Aging, and Neurodegeneration / P. Marzola, T. Melzer, E. Pavesi [и др.] // *Brain Sciences*. – 2023. – Т. 13. – № 12. – С. 1610
147. Mattson M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders / M. P. Mattson // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2000. – Т. 1. – № 2. – С. 120-129

148. Mattson M. P. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States / M. P. Mattson, T. V. Arumugam // *Cell Metabolism*. – 2018. – Т. 27. – Hallmarks of Brain Aging. – № 6. – С. 1176-1199
149. Mattson M. P. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders / M. P. Mattson, M. Gleichmann, A. Cheng // *Neuron*. – 2008. – Т. 60. – № 5. – С. 748-766
150. McBride M. J. The NLRP3 inflammasome contributes to sarcopenia and lower muscle glycolytic potential in old mice / M. J. McBride, K. P. Foley, D. M. D'Souza [и др.] // *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. – 2017. – Т. 313. – № 2. – С. E222-E232
151. Mela V. Exercise-induced re-programming of age-related metabolic changes in microglia is accompanied by a reduction in senescent cells / V. Mela, B. C. Mota, M. Milner [и др.] // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2020. – Т. 87. – С. 413-428
152. Meyers A. K. The NLRP3 Inflammasome: Metabolic Regulation and Contribution to Inflammaging / A. K. Meyers, X. Zhu // *Cells*. – 2020. – Т. 9. – The NLRP3 Inflammasome. – № 8. – С. 1808
153. Michaud M. Proinflammatory Cytokines, Aging, and Age-Related Diseases / M. Michaud, L. Balardy, G. Moulis [и др.] // *Journal of the American Medical Directors Association*. – 2013. – Т. 14. – № 12. – С. 877-882
154. Moheet A. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure / A. Moheet, S. Mangia, E. R. Seaquist // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2015. – Т. 1353. – С. 60-71
155. Monte S. M. de la, Wands J. R. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed // *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2008. № 6 (2). С. 1101–1113
156. Montes Diaz G. Dimethyl fumarate treatment in multiple sclerosis: Recent advances in clinical and immunological studies / G. Montes Diaz, R. Hupperts, J. Fraussen, V. Somers. – Текст : электронный // *Autoimmunity Reviews*. – 2018. – Т. 17. – № 12. – С. 1240-1250

157. Morgan M. J., Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling // *Cell Research*. 2011. № 1 (21). С. 103–115
158. Mori M. A., Bezy O., Kahn C. R. Metabolic syndrome: Is Nlrp3 inflammasome a trigger or a target of insulin resistance? 2011. (108). С. 1160–1162
159. Morimura N. Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrfr2/SALM1-deficient mice / N. Morimura, H. Yasuda, K. Yamaguchi [и др.] // *Nature Communications*. – 2017. – Т. 8. – С. 15800
160. Morrison J. H., Baxter M. G. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline // *Nature Reviews Neuroscience*. 2012. № 4 (13). С. 240–250
161. Mottillo E. P. Lack of Adipocyte AMPK Exacerbates Insulin Resistance and Hepatic Steatosis through Brown and Beige Adipose Tissue Function / E. P. Mottillo, E. M. Desjardins, J. D. Crane [и др.] // *Cell Metabolism*. – 2016. – Т. 24. – № 1. – С. 118-129
162. Mou Y. Gut Microbiota Interact With the Brain Through Systemic Chronic Inflammation: Implications on Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Aging / Y. Mou, Y. Du, L. Zhou [и др.]. – Текст : электронный // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – Т. 13.
163. Mouton-Liger F. Increased Cerebrospinal Fluid Levels of Double-Stranded RNA-Dependant Protein Kinase in Alzheimer's Disease / F. Mouton-Liger, C. Paquet, J. Dumurgier [и др.] // *Biological Psychiatry*. – 2012. – Т. 71. – № 9. – С. 829-835
164. Mridha A. R. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice / A. R. Mridha, A. Wree, A. A. B. Robertson [и др.] // *Journal of Hepatology*. – 2017. – Т. 66. – № 5. – С. 1037-1046
165. Naeem A. MCC950 reduces autophagy and improves cognitive function by inhibiting NLRP3-dependent neuroinflammation in a rat model of Alzheimer's disease / A. Naeem, R. Prakash, N. Kumari [и др.] // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2024. – Т. 116. – С. 70-84
166. Nakahira M. Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN- γ gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN- γ promoter activation by up-

regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1 / M. Nakahira, H.-J. Ahn, W.-R. Park [и др.] // *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). – 2002. – Т. 168. – № 3. – С. 1146-1153

167. Nakamura T. Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase Links Pathogen Sensing with Stress and Metabolic Homeostasis / T. Nakamura, M. Furuhashi, P. Li [и др.] // *Cell*. – 2010. – Т. 140. – № 3. – С. 338-348

168. Nakamura T. Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase Links Pathogen Sensing with Stress and Metabolic Homeostasis / T. Nakamura, M. Furuhashi, P. Li [и др.] // *Cell*. – 2010. – Т. 140. – № 3. – С. 338-348

169. Nanda S. K. IKK β is required for the formation of the NLRP3 inflammasome / S. K. Nanda, A. R. Prescott, C. Figueras-Vadillo, P. Cohen. – Текст : электронный // *EMBO reports*. – 2021. – Т. 22. – № 10. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embr.202050743> (дата обращения: 14.12.2022)

170. Neth B. J. Insulin Resistance and Alzheimer's Disease: Bioenergetic Linkages / B. J. Neth, S. Craft // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2017. – Т. 9. – Insulin Resistance and Alzheimer's Disease. – С. 345

171. Neumann K. Insulin Resistance and Alzheimers Disease: Molecular Links & Clinical Implications / K. Neumann, L. Rojo, L. Navarrete [и др.] // *Current Alzheimer Research*. – 2008. – Т. 5. – Insulin Resistance and Alzheimers Disease. – № 5. – С. 438-447

172. Norden D. M. Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation / D. M. Norden, J. P. Godbout // *Neuropathology and Applied Neurobiology*. – 2013. – Т. 39. – Review. – № 1. – С. 19-34

173. Ogrodnik M. Whole-body senescent cell clearance alleviates age-related brain inflammation and cognitive impairment in mice / M. Ogrodnik, S. A. Evans, E. Fielder [и др.] // *Aging Cell*. – 2021. – Т. 20. – № 2. – С. e13296

174. Ojo B. Age-Induced Loss of Mossy Fibre Synapses on CA3 Thorns in the CA3 Stratum Lucidum / B. Ojo, H. Davies, P. Rezaie [и др.] // *Neuroscience Journal*. – 2013. – Т. 2013. – С. 839535

175. Paik S. Updated insights into the molecular networks for NLRP3 inflammasome activation / S. Paik, J. K. Kim, H. J. Shin [и др.]. – Текст : электронный // Cellular & Molecular Immunology. – 2025. – Т. 22. – № 6. – С. 563-596

176. Papadopoulos D. Aging, Cellular Senescence, and Progressive Multiple Sclerosis / D. Papadopoulos, R. Magliozzi, D. D. Mitsikostas [и др.] // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2020. – Т. 14. – С. 178

177. Pateras I. S. The DNA damage response and immune signaling alliance: Is it good or bad? Nature decides when and where / I. S. Pateras, S. Havaki, X. Nikitopoulou [и др.] // Pharmacology & Therapeutics. – 2015. – Т. 154. – The DNA damage response and immune signaling alliance. – С. 36-56

178. Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, K. Franklin. – The mouse brain in stereotaxic coordinates. – Elsevier Academic Press, Academic Press, 2004. – 120 с.

179. Perregaux D. G. Identification and characterization of a novel class of interleukin-1 post-translational processing inhibitors / D. G. Perregaux, P. McNiff, R. Laliberte [и др.] // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2001. – Т. 299. – № 1. – С. 187-197

180. Petersen R. C., Yaffe K. Issues and Questions Surrounding Screening for Cognitive Impairment in Older Patients // JAMA. 2020. № 8 (323). С. 722–724

181. Pollard A. K., Craig E. L., Chakrabarti L. Mitochondrial Complex 1 Activity Measured by Spectrophotometry Is Reduced across All Brain Regions in Ageing and More Specifically in Neurodegeneration // PLOS ONE. 2016. № 6 (11). С. e0157405.

182. Pyo J.-O. Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan / J.-O. Pyo, S.-M. Yoo, H.-H. Ahn [и др.] // Nature Communications. – 2013. – Т. 4. – С. 2300

183. Rachmian N., Krizhanovsky V. Senescent cells in the brain and where to find them // The FEBS journal. 2023. № 5 (290). С. 1256–1266

184. Raefsky S. M., Mattson M. P. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges: Roles in neuroplasticity and disease resistance // *Free Radical Biology & Medicine*. 2017. (102). C. 203–216
185. Ravikumar B. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology / B. Ravikumar, S. Sarkar, J. E. Davies [и др.] // *Physiological Reviews*. – 2010. – Т. 90. – № 4. – С. 1383-1435
186. Rea I. M. Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines / I. M. Rea, D. S. Gibson, V. McGilligan [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Т. 9. – Age and Age-Related Diseases. – С. 586
187. Redman L. M., Ravussin E. Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes 2018. № 2 (14). C. 275–287
188. Rich L. R., Harris W., Brown A. M. The Role of Brain Glycogen in Supporting Physiological Function // *Frontiers in Neuroscience*. 2019. (13)
189. Rosenzweig H. L., Planck S. R., Rosenbaum J. T. NLRs in immune privileged sites // *Current Opinion in Pharmacology*. 2011. № 4 (11). C. 423–428.
190. Sadria M., Layton A. T. Interactions among mTORC, AMPK and SIRT: a computational model for cell energy balance and metabolism // *Cell communication and signaling: CCS*. 2021. № 1 (19). C. 57
191. Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2017. № 1 (360). C. 201–205
192. Salminen A. Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype / A. Salminen, J. Ojala, K. Kaarniranta [и др.] // *The European Journal of Neuroscience*. – 2011. – Т. 34. – № 1. – С. 3-11
193. Samuel V. T., Shulman G. I. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links // *Cell*. 2012. № 5 (148). C. 852–871
194. Sánchez-Rodríguez R. Targeting monoamine oxidase to dampen NLRP3 inflammasome activation in inflammation / R. Sánchez-Rodríguez, F. Munari, R. Angioni [и др.] // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2021. – Т. 18. – № 5. – С. 1311-1313

195. Santos R. X. Mitochondrial DNA oxidative damage and repair in aging and Alzheimer's disease / R. X. Santos, S. C. Correia, X. Zhu [и др.] // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2013. – Т. 18. – № 18. – С. 2444-2457
196. Scapagnini G., Caruso C., Spera G. Preventive Medicine and Healthy Longevity: Basis for Sustainable Anti-Aging Strategies под ред. N. Scuderi, B. A. Toth, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016. С. 1213–1227
197. Sergi D. Mitochondrial (Dys)function and Insulin Resistance: From Pathophysiological Molecular Mechanisms to the Impact of Diet / D. Sergi, N. Naumovski, L. K. Heilbronn [и др.] // *Frontiers in Physiology*. – 2019. – Т. 10. – С. 532
198. Shi C.-S. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction / C.-S. Shi, K. Shenderov, N.-N. Huang [и др.] // *Nature Immunology*. – 2012. – Т. 13. – № 3. – С. 255-263
199. Shimada K. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis / K. Shimada, T. R. Crother, J. Karlin [и др.] // *Immunity*. – 2012. – Т. 36. – № 3. – С. 401-414
200. Shippy D. C. β -Hydroxybutyrate inhibits inflammasome activation to attenuate Alzheimer's disease pathology / D. C. Shippy, C. Wilhelm, P. A. Viharkumar [и др.]. – Текст : электронный // *Journal of Neuroinflammation*. – 2020. – Т. 17. – № 1. – С. 280
201. Shoji H. Contextual and Cued Fear Conditioning Test Using a Video Analyzing System in Mice / H. Shoji, K. Takao, S. Hattori, T. Miyakawa. – Текст : электронный // *Journal of Visualized Experiments*. – 2014. – № 85
202. Sifringer M. Activation of caspase-1 dependent interleukins in developmental brain trauma / M. Sifringer, V. Stefovskaja, S. Endesfelder [и др.] // *Neurobiology of Disease*. – 2007. – Т. 25. – № 3. – С. 614-622
203. Sikora E. Cellular Senescence in Brain Aging / E. Sikora, A. Bielak-Zmijewska, M. Dudkowska [и др.] // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2021. – Т. 13. – С. 646924

204. Simpson J. E. Microarray analysis of the astrocyte transcriptome in the aging brain: relationship to Alzheimer's pathology and APOE genotype / J. E. Simpson, P. G. Ince, P. J. Shaw [и др.] // *Neurobiology of Aging*. – 2011. – Т. 32. – Microarray analysis of the astrocyte transcriptome in the aging brain. – № 10. – С. 1795-1807
205. Singh D. Astrocytic and microglial cells as the modulators of neuroinflammation in Alzheimer's disease // *Journal of Neuroinflammation*. 2022. (19). С. 206
206. Sofiadis K. HMGB1 coordinates SASP-related chromatin folding and RNA homeostasis on the path to senescence / K. Sofiadis, N. Josipovic, M. Nikolic [и др.] // *Molecular Systems Biology*. – 2021. – Т. 17. – № 6. – С. e9760
207. Song N. NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation / N. Song, Z.-S. Liu, W. Xue [и др.] // *Molecular Cell*. – 2017. – Т. 68. – № 1. – С. 185-197.e6
208. Spencer J. L. BDNF variant Val66Met interacts with estrous cycle in the control of hippocampal function / J. L. Spencer, E. M. Waters, T. A. Milner [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Т. 107. – № 9. – С. 4395-4400
209. Spinelli M. Brain Insulin Resistance and Hippocampal Plasticity: Mechanisms and Biomarkers of Cognitive Decline / M. Spinelli, S. Fusco, C. Grassi // *Frontiers in Neuroscience*. 2019. – № 13. – С. 788
210. Spinelli M. Brain insulin resistance impairs hippocampal plasticity/ M. Spinelli, S. Fusco, C. Grassi, M. Mainardi [и др.] // *Vitamins and Hormones*. 2020. – № 114. – С. 281-306
211. Spinelli M. Brain insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and memory by increasing GluA1 palmitoylation through FoxO3a/ Fusco S., Grassi C. // *Frontiers in Neuroscience*. 2019. – № 13. – С. 788
212. Spittau B. Aging Microglia-Phenotypes, Functions and Implications for Age-Related Neurodegenerative Diseases // *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017. (9). С. 194

213. Stanciu S. M. mTOR Dysregulation, Insulin Resistance, and Hypertension / S. M. Stanciu, M. Jinga, D. Miricescu [и др.] // *Biomedicines*. – 2024. – Т. 12. – № 8. – С. 1802
214. Steinberg G. R., Kemp B. E. AMPK in Health and Disease // *Physiological Reviews*. 2009. № 3 (89). С. 1025–1078
215. Streit W. J., Khoshbouei H., Bechmann I. Dystrophic microglia in late-onset Alzheimer's disease // *Glia*. 2020. № 4 (68). С. 845–854
216. Stunnenberg M. Abortive HIV-1 RNA induces pro-IL-1 β maturation via protein kinase PKR and inflammasome activation in humans / M. Stunnenberg, J. L. Hamme, M. Trimp [и др.] // *European Journal of Immunology*. – 2021. – Т. 51. – № 10. – С. 2464-2477
217. Subramaniapillai S. Sex Differences in the Neural Correlates of Spatial Context Memory Decline in Healthy Aging / S. Subramaniapillai, S. Rajagopal, A. Elshiekh [и др.] // *Journal of Cognitive Neuroscience*. – 2019. – Т. 31. – № 12. – С. 1895-1916
218. Taga M. Investigation of the metaflammasome in the human brain: A cfas study / M. Taga, T. Minett, J. Nicoll [и др.] // *Alzheimer's & Dementia*. – 2015. – Т. 11.– С. 272
219. Taga M. Involvement of a cerebral “metaflammasome” in experimental obesity / M. Taga, T. Minett, J. Classey [и др.] // *Alzheimer's & Dementia*. – 2015. – Т. 11.– С. 629-630
220. Taga M. Metaflammasome components in the human brain: a role in dementia with Alzheimer's pathology? / M. Taga, F. Mouton-Liger, M. Sadoune [и др.] // *Brain Pathology*. – 2017. – Т. 27. – Metaflammasome components in the human brain. – № 3. – С. 266-275
221. Taga M. [и др.]. PKR modulates abnormal brain signaling in experimental obesity / M. Taga, F. Mouton-Liger, M. Sadoune [и др.] // *PLOS ONE*. – 2018. – Т. 13. – № 5. – С. e0196983

222. Takemiya T. Brain Interleukin-1 Facilitates Learning of a Water Maze Spatial Memory Task in Young Mice / T. Takemiya, K. Fumizawa, K. Yamagata [и др.] // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. – 2017. – Т. 11. – С. 202

223. Talbot K. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline / K. Talbot, H.-Y. Wang, H. Kazi [и др.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2012. – Т. 122. – № 4. – С. 1316-1338

224. Tamayo-Trujillo R. Molecular mechanisms of semaglutide and liraglutide as a therapeutic option for obesity / R. Tamayo-Trujillo, V. A. Ruiz-Pozo, S. Cadena-Ullauri [и др.] // *Frontiers in Nutrition*. – 2024. – Т. 11. – С. 1398059

225. Tang D. PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity / D. Tang, R. Kang, C. B. Coyne [и др.] // *Immunological Reviews*. – 2012. – Т. 249. – PAMPs and DAMPs. – № 1. – С. 158-175

226. Thambisetty M. Impaired glucose tolerance in midlife and longitudinal changes in brain function during aging / M. Thambisetty, L. L. Beason-Held, Y. An [и др.] // *Neurobiology of Aging*. – 2013. – Т. 34. – № 10. – С. 2271-2276

227. Toldo S. The NLRP3 Inflammasome Inhibitor, OLT1177 (Dapansutrile), Reduces Infarct Size and Preserves Contractile Function After Ischemia Reperfusion Injury in the Mouse / S. Toldo, A. G. Mauro, Z. Cutter [и др.] // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2019. – Т. 73. – № 4. – С. 215-222

228. Tondo M. Altered Brain Metabolome Is Associated with Memory Impairment in the rTg4510 Mouse Model of Tauopathy / M. Tondo, B. Wasek, J. C. Escola-Gil [и др.] // *Metabolites*. – 2020. – Т. 10. – № 2. – С. 69

229. Van Skike C. E., Galvan V. mTOR in cerebrovascular disease // *Aging*. 2019. № 5 (11). С. 1331–1332

230. V Vandanmagsar B. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance / B. Vandanmagsar, Y.-H. Youm, A. Ravussin [и др.] // *Nature Medicine*. – 2011. – Т. 17. – № 2. – С. 179-188

231. Vande Walle L., Lamkanfi M. Drugging the NLRP3 inflammasome: from signalling mechanisms to therapeutic targets // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2024. № 1 (23). С. 43–66
232. Velcicky J. Discovery of Potent, Orally Bioavailable, Tricyclic NLRP3 Inhibitors / J. Velcicky, P. Janser, N. Gommermann [и др.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2024. – Т. 67. – № 2. – С. 1544-1562
233. Venegas C., Heneka M. T. Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease // *Journal of Leukocyte Biology*. 2017. № 1 (101). С. 87–98
234. Verkhatsky A. Astrocytes in Alzheimer's disease / A. Verkhatsky, M. Olabarria, H. N. Noristani [и др.] // *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. – 2010. – Т. 7. – № 4. – С. 399-412
235. Verma D. K. Alpha-Synuclein Preformed Fibrils Induce Cellular Senescence in Parkinson's Disease Models / D. K. Verma, B. A. Seo, A. Ghosh [и др.] // *Cells*. – 2021. – Т. 10. – № 7. – С. 1694
236. Wang J. Inhibition of A1 Astrocytes and Activation of A2 Astrocytes for the Treatment of Spinal Cord Injury / J. Wang, C. Cheng, Z. Liu [и др.] // *Neurochemical Research*. – 2023. – Т. 48. – № 3. – С. 767-780
237. Wang W. Serine Phosphorylation of IRS1 Correlates with A β -Unrelated Memory Deficits and Elevation in A β Level Prior to the Onset of Memory Decline in AD / W. Wang, D. Tanokashira, Y. Fukui [и др.] // *Nutrients*. – 2019. – Т. 11. – № 8. – С. 1942
238. West A. P. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response / A. P. West, W. Khoury-Hanold, M. Staron [и др.] // *Nature*. – 2015. – Т. 520. – № 7548. – С. 553-557
239. Willette A. A. Age-related changes in neural volume and microstructure associated with interleukin-6 are ameliorated by a calorie-restricted diet in old rhesus monkeys / A. A. Willette, B. B. Bendlin, D. G. McLaren [и др.] // *NeuroImage*. – 2010. – Т. 51. – № 3. – С. 987-994
240. Wong W. T. Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013. (7). С. 22

241. Wu Y. BHBA treatment improves cognitive function by targeting pleiotropic mechanisms in transgenic mouse model of Alzheimer's disease / Y. Wu, Y. Gong, Y. Luan [и др.]. – Текст : электронный // The FASEB Journal. – 2020. – Т. 34. – № 1. – С. 1412-1429
242. Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation // Nature. 2016. № 7628 (539). С. 180–186
243. Xian H. Metformin inhibition of mitochondrial ATP and DNA synthesis abrogates NLRP3 inflammasome activation and pulmonary inflammation / H. Xian, Y. Liu, A. Rundberg Nilsson [и др.] // Immunity. – 2021. – Т. 54. – № 7. – С. 1463-1477.e11
244. Xu C. Targeting of NLRP3 inflammasome with gene editing for the amelioration of inflammatory diseases / C. Xu, Z. Lu, Y. Luo [и др.] // Nature Communications. – 2018. – Т. 9. – С. 4092
245. Xu F. Glibenclamide ameliorates the disrupted blood–brain barrier in experimental intracerebral hemorrhage by inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome / F. Xu, G. Shen, Z. Su [и др.] // Brain and Behavior. – 2019. – Т. 9. – № 4. – С. e01254
246. Yadav E. Resveratrol: A potential therapeutic natural polyphenol for neurodegenerative diseases associated with mitochondrial dysfunction / E. Yadav, P. Yadav, M. M. U. Khan [и др.] // Frontiers in Pharmacology. – 2022. – Т. 13. – Resveratrol. – С. 922232
247. Yang H. Ketone Bodies in Neurological Diseases: Focus on Neuroprotection and Underlying Mechanisms / H. Yang, W. Shan, F. Zhu [и др.] // Frontiers in Neurology. – 2019. – Т. 10
248. Yin F. Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease / F. Yin, H. Sancheti, I. Patil, E. Cadenas // Free Radical Biology & Medicine. – 2016. – Т. 100. – С. 108-122
249. Youm Y.-H. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging / Y.-H. Youm, R. W. Grant, L. R. McCabe [и др.] // Cell Metabolism. – 2013. – Т. 18. – № 4. – С. 519-532

250. Youm Y.-H. The Nlrp3 inflammasome promotes age-related thymic demise and immunosenescence / Y.-H. Youm, T.D. Kanneganti, B. Vandanmagsar [и др.] // *Cell Metabolism*. – 2012. – Т. 1. – № 1. – С. 56-68
251. Youm Y.-H. The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease / Y.-H. Youm, K. Y. Nguyen, R. W. Grant [и др.] // *Nature Medicine*. – 2015. – Т. 21. – № 3. – С. 263-269
252. Yu X.-W., Oh M. M., Disterhoft J. F. CREB, cellular excitability, and cognition: Implications for aging // *Behavioural Brain Research*. 2017. № Pt B (322). С. 206–211
253. Yuan M. Reversal of Obesity- and Diet-Induced Insulin Resistance with Salicylates or Targeted Disruption of Ikk β / M. Yuan, N. Konstantopoulos, J. Lee [и др.] // *Science*. – 2001. – Т. 293. – № 5535. – С. 1673-1677
254. Zahid A. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome / A. Zahid, B. Li, A. J. K. Kombe [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2019. – Т. 10. – С. 2538
255. Zaki M. H. IL-18 Production Downstream of the Nlrp3 Inflammasome Confers Protection against Colorectal Tumor Formation / M. H. Zaki, P. Vogel, M. Body-Malapel [и др.] // *The Journal of Immunology*. – 2010. – Т. 185. – № 8. – С. 4912-4920
256. Zamzami N. Mitochondrial Implication in Accidental and Programmed Cell Death: Apoptosis and Necrosis / N. Zamzami, T. Hirsch, B. Dallaporta [и др.] // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 1997. – Т. 29. – Mitochondrial Implication in Accidental and Programmed Cell Death. – № 2. – С. 185-193
257. Zarocostas J. The UN reports global asymmetries in population growth / J. Zarocostas // *Lancet* (London, England). – 2022. – Т. 400. – № 10347. – С. 148
258. Zhang C. A small molecule inhibitor MCC950 ameliorates kidney injury in diabetic nephropathy by inhibiting NLRP3 inflammasome activation / C. Zhang, X. Zhu, L. Li [и др.]. – Текст : электронный // *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. – 2019. – Т. 12. – С. 1297-1309

259. Zhang L. Novel small molecule inhibition of IKK/NF- κ B activation reduces markers of senescence and improves healthspan in mouse models of aging / L. Zhang, J. Zhao, X. Mu [и др.]. – Текст : электронный // *Aging Cell*. – 2021. – Т. 20. – № 12. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ace.13486> (дата обращения: 20.06.2022)

260. Zhang Q. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury / Q. Zhang, M. Raoof, Y. Chen [и др.] // *Nature*. – 2010. – Т. 464. – № 7285. – С. 104-107

261. Zhang S. Early involvement of lysosome dysfunction in the degeneration of cerebral cortical neurons caused by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal / S. Zhang, E. Eitan, M. P. Mattson // *Journal of Neurochemistry*. – 2017. – Т. 140. – № 6. – С. 941-954

262. Zhang X. Regulation and functions of NLRP3 inflammasome in cardiac fibrosis: Current knowledge and clinical significance / X. Zhang, H. Qu, T. Yang [и др.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. – 2021. – Т. 143. – С. 112219

263. Zhu H. Janus Kinase Inhibition Ameliorates Ischemic Stroke Injury and Neuroinflammation Through Reducing NLRP3 Inflammasome Activation via JAK2/STAT3 Pathway Inhibition / H. Zhu, Z. Jian, Y. Zhong [и др.] // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Т. 12. – С. 714943

264. Zilliox L. A. Diabetes and Cognitive Impairment / L. A. Zilliox, K. Chadrsekaran, J. Y. Kwan, J. W. Russell // *Current Diabetes Reports*. – 2016. – Т. 16. – № 9. – С. 87

265. Zindel J. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation / J. Zindel, P. Kubes // *Annual Review of Pathology*. – 2020. – Т. 15. – С. 493-518