

Хилажева Елена Дмитриевна

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

1.5.24. Нейробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в научно-исследовательском институте молекулярной медицины и патобиохимии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Комлева Юлия Константиновна, доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Гуреев Артем Петрович, доктор биологических наук, доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет»

Шпаков Александр Олегович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейробиологии, заместитель директора по научной работе Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__»_____2025 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета ПДС 2105.001 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Учебно-научном информационном библиотечном центре и на сайте ФГАОУ ВО «РУДН имени Патриса Лумумбы» (г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; URL: <https://www.rudn.ru/science/dissovet>).

Автореферат разослан «__»_____2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
ПДС 2105.001
кандидат медицинских наук

Людуп Алексей Валерьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В последние десятилетия отмечается устойчивая тенденция к увеличению продолжительности жизни населения, что отражает значительные успехи медицины и улучшение качества жизни (Costantini et al., 2018). 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 (Barreto et al., 2020). 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 инфламасомы 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 инфламасомы (Charles-Messance et al., 2020). 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 (Lancaster, 2018). 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 (Heneka et al., 2018). Особый интерес в контексте нейродегенерации представляет семейство NLR-рецепторов, способных формировать NLRP3 инфламмосомы — мультибелковые цитозольные комплексы, обеспечивающие процессинг и активацию провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 (Jha et al., 2010; Mori et al., 2011). Продemonстрировано, что ее чрезмерная активация является ключевым механизмом развития многих возраст-зависимых патологий, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона (Broderick et al., 2015; Heneka et al., 2018; Jha et al., 2010). Многочисленными исследованиями установлено, что клеточный метаболизм играет центральную роль в регуляции иммунных функций, а метаболические нарушения (например, инсулинорезистентность) напрямую связаны с активацией провоспалительных путей (Franceschi et al., 2006; Meyers et al., 2020). Клинические данные подтверждают тесную связь между церебральной инсулинорезистентностью, нарушением утилизации глюкозы мозгом и развитием когнитивного дефицита (Hughes et al., 2016; Yin et al., 2016). В последние годы сформировалась концепция «метаболических инфламмосом» (метафламмосом), отражающая взаимосвязь между метаболическим стрессом и активацией воспалительных комплексов (Kanbay et al., 2019; Kuryłowicz et al., 2020). В мозговой ткани идентифицированы ключевые компоненты этих комплексов, включая фосфорилированные формы киназ IKK β , IRS1, JNK и PKR (Taga et al., 2017). Их активация сопровождается нарушением энергетического обмена и развитием инсулинорезистентности в нейронах и астроцитах. Эти метаболические сдвиги, в свою очередь, способствуют активации NLRP3 инфламмосомы, формируя порочный круг, поддерживающий хроническое нейровоспаление.

Таким образом, метаболические механизмы нейровоспаления представляют собой совокупность внутриклеточных сигнальных каскадов, связывающих энергетический дисбаланс, фосфорилирование протеинкиназ метафламмосомного комплекса и активацию NLRP3 инфламмосомы. 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 инфламмосомы, 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, метафламмация), активацию NLRP3 инфламмасы 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 метафламматического комплекса (PKR, IKK β , JNK), изменение активности GSK3 β и дисрегуляция глюкозного транспорта (GLUT4), способствуют активации NLRP3 инфламмасы 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 инфламмасы 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 инфламмасы в этих процессах.
3. Исследовать взаимосвязь между активацией метафламматического 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 инфламмасы 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 инфламмасы 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 инфламмасомы 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 метафламмасомного 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 инфламмасомы 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 инфламмасомы 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, иммуноцитохимический 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-инфламмасы в развитии возрастных нейробиологических изменений.
2. NLRP3 инфламмама является ключевым медиатором возраст-ассоциированных изменений: её активация сопровождается ростом экспрессии IL-18, HMGB1, провоспалительных киназ (PKR, IKK β , JNK), а её инактивация приводит к сохранению поведенческих характеристик и снижению проявлений клеточной сенесценции.
3. Фармакологическая блокада инфламмасы (глибенкламид, MCC950) воспроизводит эффекты генетической инактивации NLRP3, снижая уровень воспалительных маркеров и ослабляя проявления сенесценции и метаболической дисрегуляции у зрелых и стареющих животных.
4. Воспаление, индуцированное LPS, сопровождается активацией NLRP3 инфламмасы, повышением уровней IL-18, HMGB1 и JNK, а также изменениями в регуляции глюкозного транспорта (увеличение экспрессии GLUT4 при старении).
5. Возраст-ассоциированная активация NLRP3 инфламмасы 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 на 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.

Работа выполнена при поддержке гранта 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.); гранта 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.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 3 статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 2 статьи в изданиях, индексируемых в международной базе цитирования (Scopus), 4 публикации в сборнике материалов научной конференции.

Структура и объем диссертации

Диссертация оформлена в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 7.0.11-2011. 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, определены цель и задачи работы, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Первая глава содержит обзор литературы по теме исследования, включая общие механизмы старения и нейродегенерации, роль нейровоспаления и инфламмасом, метаболические механизмы регуляции воспалительного ответа, влияние

инсулинорезистентности на когнитивную дисфункцию и возможности модуляции инфламмасом.

Вторая глава описывает материалы и методы исследования. Использовались самцы мышей линии C57BL/6 трёх возрастных групп (молодые 4–5 месяцев, $n = 15$; зрелые 14–15 месяцев $n = 25$; и стареющие 24–25 месяцев; $n = 20$), а также NLRP3-нокаутные мыши (линия B6.129S6-Nlrp3^{tm1Bhk/J}) в возрасте 4–5 месяцев ($n = 12$) и 14–15 месяцев ($n = 15$). Часть экспериментов проводили *in vitro* на органотипических культурах гиппокампа и клеточных культурах астроцитов и нейронов. 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.).

Исследование состояло из четырёх 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-IV. Фармакологическая модуляция NLRP3 инфламмасом с использованием LPS (активация), глибенкламида (неспецифическая блокада) и специфического блокатора MCC950 *in vivo* и *in vitro*.

Общий дизайн исследования представлен на рисунке 1.

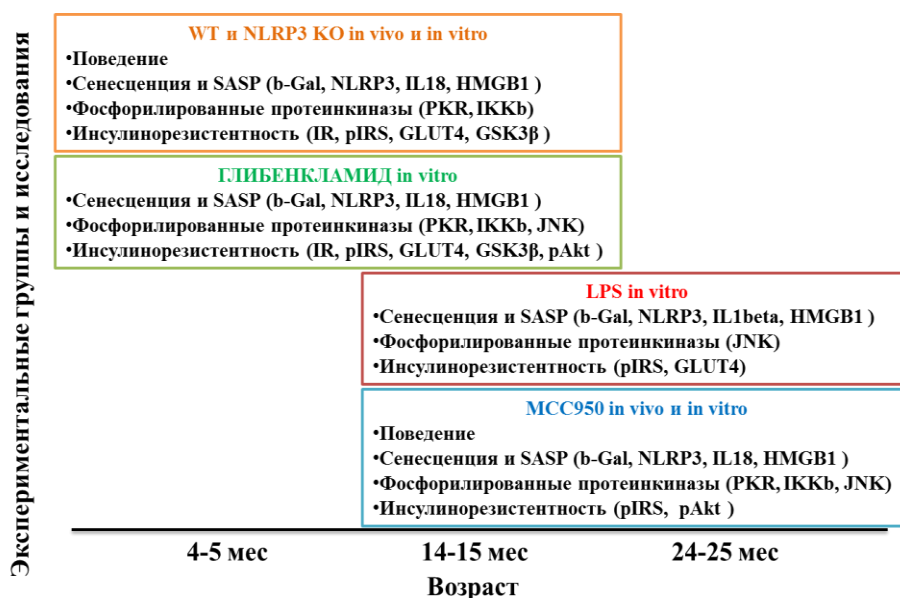


Рисунок 1 - Дизайн диссертационного исследования.

Фармакологическая модуляция инфламмасом. Блокатор MCC950 вводили мышам дикого типа (12 и 24–25 месяцев) интраперитонеально по 1 мг/кг в течение трёх дней до теста кондиционирования страха и за час до проведения теста с 1 по 3 день; контрольной группе вводили DMSO. *In vitro* применяли два ингибитора: глибенкламид (200 мкМ, 1 ч) и

MCC950 (1 мкМ, 6 ч) при стандартных условиях (37 °С, 5% CO₂). Для индукции нейровоспаления использовали Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (10 мкМ, 6 ч).

Нейроповеденческое тестирование животных. В работе были использованы тесты «Условно-рефлекторного замирания» для оценки когнитивных функций и «Трехкамерный тест» для оценки социальности и социальных предпочтений.

Получение органотипических и клеточных культур. После эвтаназии животных выделяли гиппокамп и готовили срезы толщиной 250 мкм, которые инкубировали в среде DMEM с 25% FBS, L-глутамином и антибиотиком при 37 °С, 5% CO₂. Для получения клеточных культур гиппокампальные нейросферы культивировали в среде NeuroCult NS-A, формирование нейросфер наблюдали через 48 ч (Khilazheva et al., 2015). На третьем пассаже клетки ресуспендировали в дифференцировочной среде на основе DMEM с 20% FBS и антибиотиками, культивировали 5–7 дней для спонтанной дифференцировки в астроциты и нейроны. Дифференцированные клетки переносили в 24- или 96-луночные планшеты для дальнейших экспериментов (Рисунок 2).

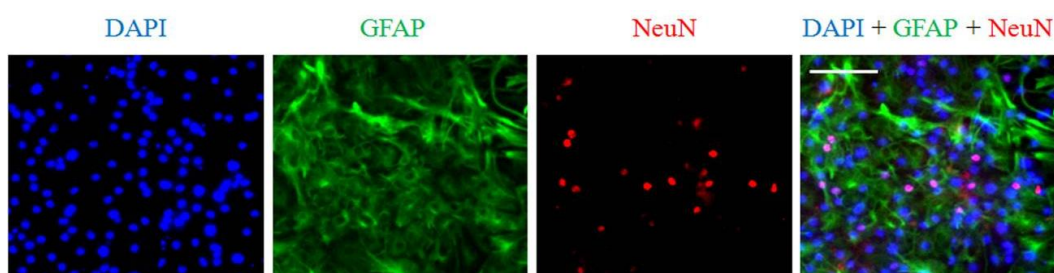


Рисунок 2 - Сокультура астроцитов и нейронов, полученных от мышей в возрасте 14 месяцев: ядра клеток окрашены DAPI (голубой), показана экспрессия маркера астроцитов GFAP (зеленый) и маркера нейронов NeuN (красный). Шкала - 50 мкм.

Иммуногистохимия и конфокальная микроскопия. После анестезии животных проводили транскардиальную перфузию 4% PFA, затем фиксировали мозг и готовили срезы толщиной 50 мкм. Срезы блокировали и окрашивали первичными антителами к маркерам нейронов, астроцитов и сигнальных белков: GFAP (644702, Biolegend), NeuN (ab134014, Abcam), NLRP3 (ab51952, Abcam), JNK (J4750, Sigma), IRS1 (phospho S312, ab66154, Abcam), IL18 (sc6177-4, Santa Cruz), IKK β (ab178870, Abcam) и PKR (ab32506, Abcam), с последующей инкубацией вторичными антителами AlexaFluor 488/555 (ab150117/ab150078, Abcam). 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 and Franklin, 2004) были взяты по крайней мере из двух срезов от семи мышей на группу.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Культуры клеток окрашивали методом двойного непрямого иммуноцитохимического анализа с использованием первичных антител: NLRP3 (ab2307396, Abcam), IL18 (sc6177-4, Santa Cruz), pIKK β (ab178870, Abcam), PKR

(ab32506, Abcam), IRS1 (phospho S312, ab66154, Abcam), HMGB1 (ab77302, Abcam), JNK (J4750, Sigma) и phospho-Akt (AF0016, Affinity Bioscience) в разведении 1:300 (18 ч при 4 °C), вторичные антитела AlexaFluor 488/555 (ab150117/ab150078, Abcam) 1:500, 2 ч при 37 °C. 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.

Исследование иммуносенесценции. Клеточную сенесценцию оценивали с использованием набора Senescence Detection Kit (K320, BioVision) по инструкции производителя. Голубую окраску сенесцентных клеток регистрировали визуально и спектрофотометрически при 620 нм (Anthos, Biochrom) для клеточных культур или с помощью светового микроскопа Olympus BX45 для срезов. Изображения анализировали в ImageJ, количественную оценку проводили минимум по пяти полям зрения на образец.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Суммарную РНК выделяли с использованием набора «РНК-Экстрэн» (Синтол, EX-515) в соответствии с протоколом производителя. Обратную транскрипцию проводили с помощью набора MMLV RT (Евроген, №SK021). Для оценки количества фрагментов кДНК гена инсулина и референсных генов *Gapdh* и *Actb* использовали готовые наборы праймеров и зондов («ДНК-Синтез») и набор qPCRMix-HS (Евроген, №PK145L, Россия). ПЦР проводили на амплификаторе LightCycler 96 (Roche); относительный количественный анализ экспрессии генов выполняли с помощью программного обеспечения LightCycler 96 Software.

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.

Третья глава диссертационной работы посвящена описанию полученных результатов.

Четвертая глава диссертации посвящена анализу и обсуждению полученных результатов с привлечением сведений по изучаемой теме, представленных в современной научной литературе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Результаты поведенческого тестирования молодых и зрелых мышей дикого типа и мышей с делецией гена *Nlrp3*. В тесте «Открытое поле» общая дистанция между контрольными и NLRP3-нокаутными мышами значимо не различалась. Однако у зрелых *Nlrp3*^{-/-} мышей отмечено увеличение времени в центральной зоне ($42,95 \pm 6,85$ с против $17,05 \pm 4,16$ с у контроля, $p=0,012$), а у зрелых контрольных мышей — увеличение времени на периферии ($383,62 \pm 66,17$ с против $237,32 \pm 9,27$ с у молодых, $p=0,035$). Молодые контрольные мыши проявляли больший интерес к несоциальному объекту по сравнению с *Nlrp3*^{-/-} и зрелыми мышами дикого типа. При старении у мышей дикого типа сокращалась общая дистанция ($17,29 \pm 0,89$ м против $31,03 \pm 2,15$ м у нокаутных, $p=0,0004$) и увеличивалось время на периферии ($403,07 \pm 46,92$ с, $p=0,0059$), что указывает на развитие тревожности. *Nlrp3*^{-/-} мыши таких возрастных изменений не демонстрировали (Рисунок 3). Взаимодействие с социальным объектом также снижалось у стареющих мышей дикого типа ($40,88 \pm 10,14$ с против $161,63 \pm 21,77$ с у молодых, $p=0,0029$), тогда как *Nlrp3*^{-/-} мыши сохраняли стабильное время взаимодействия.

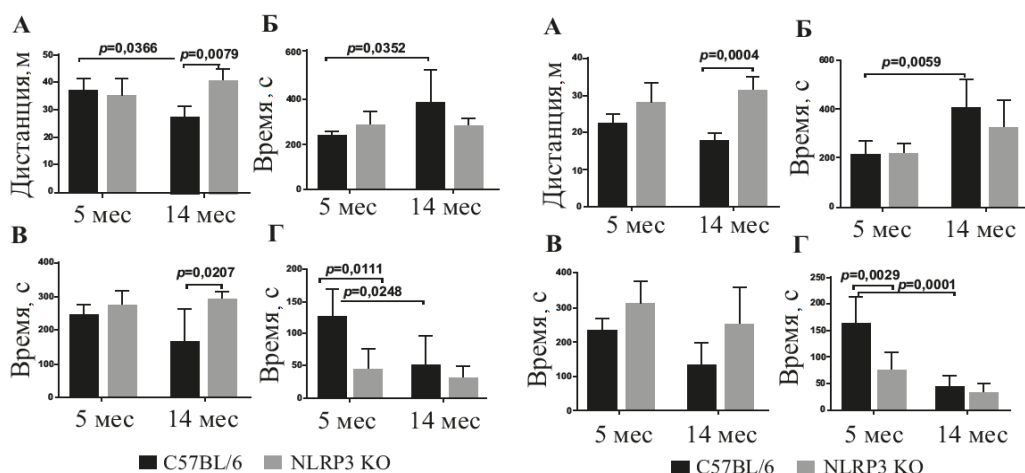


Рисунок 3 - Слева - вторая сессия теста «Открытое поле» с несоциальным неодушевленным предметом в тесте; Справа - третья сессия теста «Открытое поле» с социальным живым объектом. (А) – Пройденная дистанция, м; (Б) – Время, проведенное на периферии, с; (В) – Время в средней зоне, с; (Г) – Время в центральной зоне, с. C57BL/6 – контрольные мыши дикого типа; NLRP3 KO – нокаутные мыши по гену *Nlrp3*.

Таким образом, мы можем предположить, что при старении у мышей наблюдается развитие тревожности и нарушение социальной активности, но не у мышей с делецией гена *Nlrp3*. При изучении памяти страха в тесте кондиционирования страха у мышей наблюдалось значимое влияние возраста на уровень замиранья ($F(1,26)=8,17$, $p=0,0083$), без эффекта генотипа. На третий день эксперимента выявлено влияние группы и тона стимулов ($F(3,30)=4,66$, $p=0,0086$ и $F(3,30)=92,85$, $p<0,0001$), при этом зрелые мыши дикого типа

демонстрировали сокращение времени замирания в сравнении с молодыми ($74,84 \pm 5,68\%$ против $98,74 \pm 0,94\%$, $p=0,021$) (Рисунок 4).

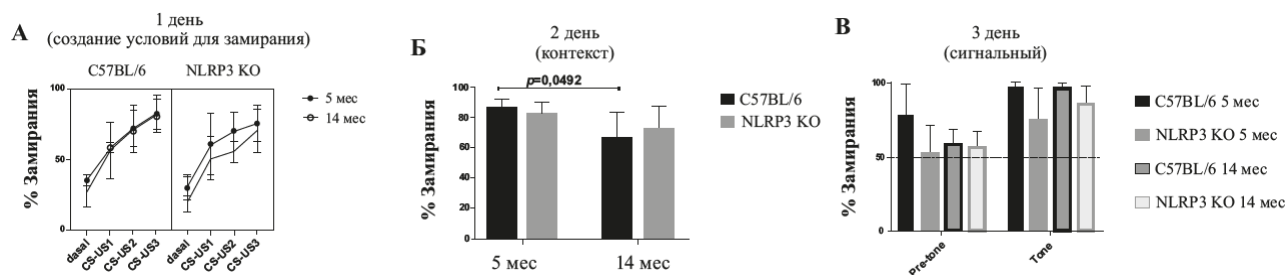


Рисунок 4 – (А) Процент времени замирания в первый день создания условий для запоминания в тесте «Условно-рефлекторного замирания». Basal – до подачи белого шума, CS-US1 – первая пара стимулов, CS-US2 – вторая пара стимулов, CS-US3 – третья пара стимулов. (Б) Число эпизодов замирания в первый день создания 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*.

Изучение сенесценции и развития SASP фенотипа с возрастом у мышей дикого типа и мышей с делецией гена *Nlrp3*. Количественный анализ показал индукцию SA- β -gal в гиппокампе стареющих мышей дикого типа, чего не наблюдалось у *Nlrp3*^{-/-} (взаимодействие возраст \times генотип: $F(1,14)=7,51$, $p=0,016$). В сокультурах нейронов и астроцитов выявлено значимое влияние возраста и генотипа на активность β -галактозидазы (возраст \times генотип: $F(1,20)=11,3$, $p=0,0031$; возраст: $F(1,20)=41,69$, $p<0,0001$; генотип: $F(1,20)=31,39$, $p<0,0001$), отражающее накопление сенесцентных клеток у зрелых животных. Анализ экспрессии IL-18 и NLRP3 в гиппокампе показал значимое влияние взаимодействия факторов возраста и генотипа (IL-18: $F(1,16)=328$, $p<0,0001$; NLRP3: значимое увеличение у зрелых WT по сравнению с молодыми, $p=0,048$), тогда как у *Nlrp3*^{-/-} экспрессия NLRP3 отсутствовала. *In vitro* данные по экспрессии NLRP3 и IL-18 полностью соответствовали наблюдениям *in vivo*. Репрезентативные изображения IL-18 и SA- β -gal приведены на Рисунке 5, суммарные изменения – в Таблице 1.

Таблица 1- Изменение экспрессии компонентов инфламмосомы и факторов SASP.

Маркеры	C57BL/6		NLRP3 KO	
	5 мес.	14 мес.	5 мес.	14 мес.
<i>in vivo</i>				
SA- β -gal	1.02 \pm 0.23 %	3.56 \pm 0.84 %*	1.77 \pm 0.49 %	0.83 \pm 0.15 %* [#]
NLRP3	1063 \pm 19.12 мкм ²	2789 \pm 531 мкм ² *	-	-
IL-18	283.1 \pm 35.55 мкм ²	2038 \pm 89.24 мкм ² *	99.36 \pm 9.64 мкм ²	84.9 \pm 14.9 мкм ² [#]
<i>in vitro</i>				
SA- β -gal	0.052 \pm 0.001 y.e.	0.083 \pm 0.005 y.e.*	0.04 \pm 0.01 y.e.	0.055 \pm 0.002 y.e. [#]
NLRP3	5,920.32 y.e.	15.64 \pm 1.06 y.e.*	-	-
IL-18	5.12 \pm 0.34 y.e.	9.86 \pm 0.41 y.e.*	0.44 \pm 0.19 y.e. [#]	0.52 \pm 0.18 y.e. [#]
HMGB1	1.92 \pm 0.37 y.e.	6.30 \pm 0.59 y.e.*	3.72 \pm 0.38 y.e.	4.90 \pm 0.45 y.e.

Примечание: * – статистически значимые отличия по сравнению с группой 5 мес. ($p<0,05$);

– статистически значимые отличия по сравнению с группой C57BL/6 ($p<0,05$).

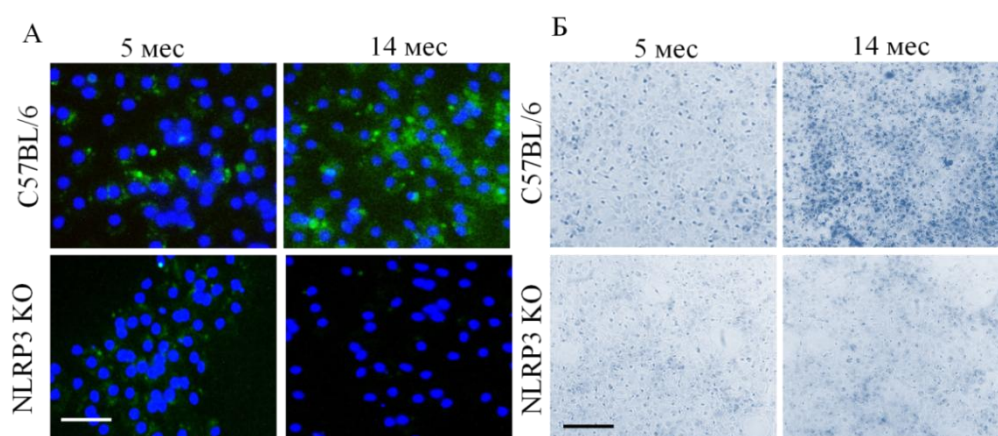


Рисунок 5 – (А) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия IL-18 (зеленый). Шкала 50 мкм. (Б) Репрезентативные снимки окраски SA-β-gal *in vitro*. C57BL/6 – мыши дикого типа, NLRP3 KO – нокаутные мыши по гену *Nlrp3*.

Изучение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом у молодых и зрелых мышей дикого типа и мышей с делецией гена *Nlrp3*. Анализ экспрессии PKR в гиппокампе показал значимое влияние генотипа ($F(1,16)=26,65$, $p<0,0001$), возраста ($F(1,16)=7,07$, $p=0,017$) и их взаимодействия ($F(1,16)=10,81$, $p=0,0046$). В клеточных культурах наблюдалось аналогичное влияние генотипа ($F(1,16)=38,41$, $p<0,0001$), возраста ($F(1,16)=328,6$, $p<0,0001$) и взаимодействия ($F(1,16)=37,27$, $p<0,0001$). Экспрессия фосфорилированной ИККβ в гиппокампе также зависела от возраста и генотипа (взаимодействие $F(1,15)=18,23$, $p=0,0007$; генотип $F(1,15)=35,98$, $p<0,0001$; возраст $F(1,15)=11,92$, $p=0,0036$). В культурах клеток *in vitro* отмечено аналогичное влияние (генотип $F(1,16)=35,78$, $p<0,0001$; возраст $F(1,16)=20,45$, $p=0,0003$). Данные показывают, что старение сопровождается увеличением фосфорилированной ИККβ у мышей дикого типа, тогда как у *Nlrp3*^{-/-} таких изменений не наблюдалось. Репрезентативные изображения экспрессии PKR приведены на Рисунке 6, суммарные изменения - в Таблице 2.

Таблица 2- Изменения экспрессии компонентов метафламмасомного комплекса.

Маркеры	C57BL/6		NLRP3 KO	
	5 мес.	14 мес.	5 мес.	14 мес.
<i>in vivo</i>				
ИККβ	5920±943.9 мкм ²	12780±89 мкм ² *	4384.12±686.42 мкм ²	3658.14±691.22 мкм ² #
PKR	2566.26±559.33 мкм ²	8343±1856.21 мкм ² *	745.41±124.94 мкм ²	133.67±27.42 мкм ² #
<i>in vitro</i>				
ИККβ	8.36±0.51 у.е.	12.3±0.69 у.е.*	6.5±0.22 у.е.	7.56±0.64 у.е.#
PKR	6.42±0.26%	3,7±0.23%*	1.23±0.15%	3,7±0.23%*#

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с группой 5 мес. ($p<0,05$);

- статистически значимые отличия по сравнению с группой C57BL/6 ($p<0,05$).

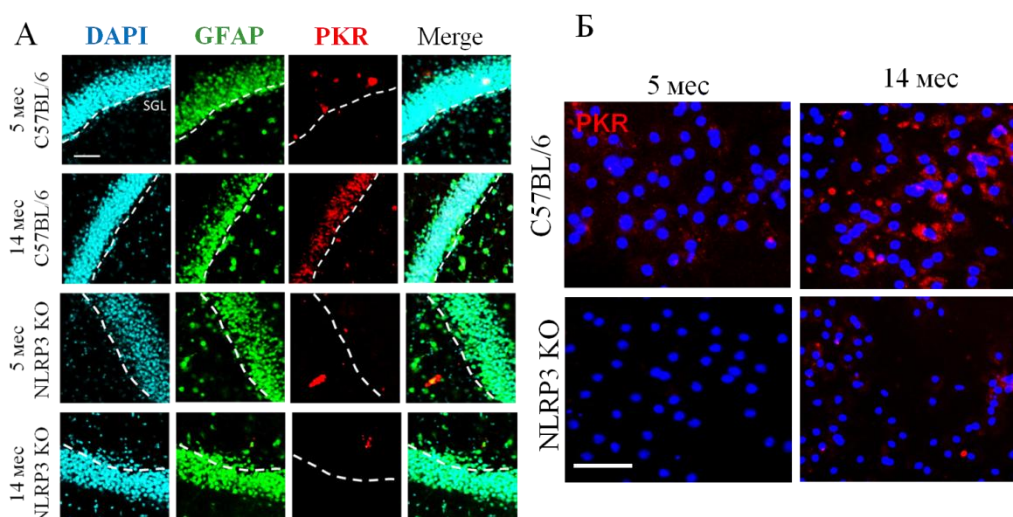


Рисунок 6 – (А) Тройное иммунофлуоресцентное окрашивание: в первой колонке ядра клеток прокрашены DAPI (голубой), во второй колонке – экспрессия NeuN (зеленый), в третьей колонке – экспрессия PKR (красный), в четвертой колонке представлено наложение сигналов (Merge). SGZ – субгранулярная зона. Шкала 100 мкм. (Б) Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия PKR (красный). Шкала 50 мкм.

Изучение экспрессии маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности у молодых и зрелых мышей дикого типа и мышей с делецией гена *Nlrp3*. В сокультурах астроцитов и нейронов экспрессия инсулиновых рецепторов (IR) и патологически фосфорилированного IRS1 не различалась между группами. В культурах клеток *in vitro* выявлено снижение GLUT4 при старении во всех группах, при этом у *Nlrp3*^{-/-} экспрессия GLUT4 была значимо ниже, чем у контроля ($p < 0,0001$, Tukey). Старение также сопровождалось повышением экспрессии GSK3 β у контрольных мышей ($p < 0,0001$), тогда как у *Nlrp3*^{-/-} такого увеличения не наблюдалось ($p = 0,99$). Репрезентативные изображения IR и GLUT4 приведены на Рисунке 7, суммарные изменения — в Таблице 3.

Таблица 3 - Изменения экспрессии маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности.

Маркеры	C57BL/6		NLRP3 KO	
	5 мес.	14 мес.	5 мес.	14 мес.
<i>in vivo</i>				
pIRS1-Ser	2809 \pm 367.33 мкм ²	3118 \pm 391.32 мкм ²	3781.83 \pm 488.86 мкм ²	2519.3 \pm 579.75 мкм ²
<i>in vitro</i>				
IR	8.56 \pm 0.23 y.e.	9.94 \pm 0.91 y.e.	8.42 \pm 0.24 y.e.	8.3 \pm 0.32 y.e.
pIRS1-Ser	13.36 \pm 1.02 y.e.	10.72 \pm 1.13 y.e.	10.84 \pm 0.98 y.e.	11.68 \pm 0.85 y.e.
GLUT4	30.8 \pm 1.5 y.e	24.2 \pm 2.22 y.e. *	20.4 \pm 1.43 y.e. #	16.0 \pm 1.3 y.e. * #
GSK3 β	4.6 \pm 0.68%	13.2 \pm 0.86%*	2.6 \pm 0.4%	2.8 \pm 0.58%#

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с группой 5 мес. ($p < 0.05$);

- статистически значимые отличия по сравнению с группой C57BL/6 ($p < 0.05$).

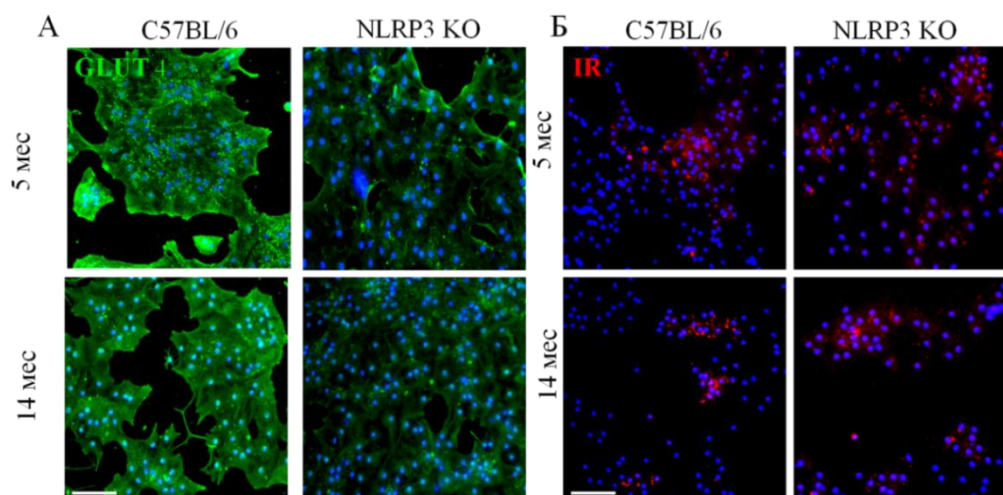


Рисунок 7 – Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание: (А) ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия GLUT4 (зеленый). (Б) ядра клеток – синий (DAPI), экспрессия IR (красный). Шкала 50 мкм.

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

Изучение сенесценции и развития SASP фенотипа в органотипических культурах гиппокампа при аппликации LPS. В органотипических срезах гиппокампа стареющих мышей дикого типа (24 мес.) отмечено увеличение доли сенесцентных клеток по сравнению с 14-месячными ($p \leq 0,001$, Tukey). Воздействие LPS ещё более усиливало сенесценцию у старших животных ($p \leq 0,01$). LPS также вызывало значимое увеличение числа клеток, экспрессирующих NLRP3, IL-1 β и HMGB1 во всех возрастных группах ($p < 0,0001$, Tukey). Суммарные изменения экспрессии приведены в Таблице 4.

Таблица 4 - Изменение экспрессии компонентов инфламмасы и факторов SASP.

Маркеры	C57BL/6		LPS	
	14 мес.	24 мес.	14 мес.	24 мес.
<i>in vitro</i>				
SA- β -gal	5.44 \pm 0.2%	8.18 \pm 0.32%*	6,6 \pm 0.21%	10,46 \pm 0.59%* [#]
NLRP3	12.08 \pm 1.03%	23.18 \pm 1.65%*	24.18 \pm 0.79% [#]	36.64 \pm 1.7% [#]
IL-1 β	15.26 \pm 0.92%	25.6 \pm 2.29%*	29.86 \pm 1.16% [#]	36.78 \pm 0.87%* [#]
HMGB1	7.24 \pm 1.28%	12.62 \pm 0.96%*	17.26 \pm 0.72% [#]	22.52 \pm 1.06%* [#]

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с группой 14 мес. ($p < 0.05$);

- статистически значимые отличия по сравнению с группой C57BL/6 ($p < 0.05$).

Изучение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом и маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности в органотипических культурах гиппокампа при аппликации LPS. Добавление LPS в культуру клеток вызывало значимое увеличение числа JNK+ клеток в обеих возрастных группах ($p < 0,0001$, Tukey). Статистически значимых изменений экспрессии фосфорилированного IRS1 не выявлено. При этом количество GLUT4+ клеток

увеличивалось в срезах от 24-месячных мышей под действием LPS по сравнению с контролем ($p=0,012$, Tukey). Выявленные изменения экспрессии представлены в Таблице 5.

Таблица 5 - Изменение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом и маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности.

Маркеры	C57BL/6		LPS	
	14 мес.	24 мес.	14 мес.	24 мес.
<i>in vitro</i>				
JNK	5.02±0.37%	9.22±0.33%*	19.60±1.05% [#]	22.74±1.61% [#]
pIRS1-Ser	10.01±0.71%	12.94±0.54%	10.46±0.53%	12.96±0.44%
GLUT4	31.96±0.84%	23.04±1.01%*	34.6±0.98%	27.84±0.91%* [#]

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с группой 14 мес. ($p<0.05$);

- статистически значимые отличия по сравнению с группой C57BL/6 ($p<0.05$).

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

Изучение сенесценции и развития SASP фенотипа в культурах клеток при аппликации глибенкламида. Глибенкламид достоверно снижал экспрессию NLRP3 и секрецию IL-18 в культурах клеток обеих возрастных групп ($p<0,0001$, Tukey), тогда как показатели SASP, включая HMGB1 и активность SA- β -gal, оставались неизменными. Активность SA- β -gal возрастала с возрастом ($F(1,20)=60,04$, $p<0,0001$), при этом клетки среднего возраста демонстрировали более высокую активность, чем молодые ($p<0,0001$, Tukey). Экспрессия NLRP3 и IL-18 в культурах *in vitro* снижалась под действием глибенкламида при значимом влиянии факторов возраста и обработки ($p<0,0001$). Экспрессия HMGB1 изменялась с возрастом, но на глибенкламид не реагировала. Выявленные изменения экспрессии представлены в Таблице 6.

Таблица 6 - Изменения сенесценции и развития SASP фенотипа в культурах клеток.

Маркеры	C57BL/6		Глибенкламид	
	5 мес.	14 мес.	5 мес.	14 мес.
<i>in vitro</i>				
SA- β -gal	0.052±0.001 y.e.	0.083±0.005 y.e.*	0.046±0.002 y.e.	0.067±0.003 y.e.*
NLRP3	5.92±0.32 y.e.	15.64±1.06 y.e.*	3.94±0.81 y.e. [#]	8.64±0.39 y.e.* [#]
IL18	5.12±0.34 y.e.	9.86±0.41 y.e.*	2.30±0.22 y.e. [#]	5.06±0.41 y.e.* [#]
HMGB1	1.92±0.37 y.e.	6.30±0.59 y.e.*	2.48±0.54 y.e.	5.86±0.96 y.e.*

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с группой 5 мес. ($p<0.05$);

- статистически значимые отличия по сравнению с группой C57BL/6 ($p<0.05$).

Изучение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом в культурах клеток при аппликации глибенкламида. Инкубация с глибенкламидом вызывала значимое снижение экспрессии PKR, p-IKK β и JNK в клетках среднего возраста ($p<0,05$, Tukey). Анализ показал значимое влияние возраста на p-IKK β ($F(1,16)=43,3$, $p<0,0001$) и PKR ($F(1,16)=511,0$, $p<0,0001$), а также влияние блокатора на PKR

($F(1,16)=5,73$, $p=0,02$) и JNK ($F(1,16)=15,17$, $p=0,001$) с дополнительным взаимодействием факторов для JNK ($F(1,16)=5,84$, $p=0,03$) (Таблица 7).

Таблица 7 - Изменения экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом в культурах клеток в экспериментальных группах.

Маркеры	C57BL/6		Глибенкламид	
	5 мес.	14 мес.	5 мес.	14 мес.
<i>in vitro</i>				
IKK β	8.36 \pm 0.51 у.е.	12.30 \pm 0.69 у.е. *	6.44 \pm 0.38 у.е.	9.36 \pm 0.45 у.е.* [#]
PKR	1.22 \pm 0.21 %	6.42 \pm 0.25 %*	1.20 \pm 0.14 %	5.42 \pm 0.19 %* [#]
JNK	1.92 \pm 0.31 у.е.	6.38 \pm 0.37 у.е. *	1.49 \pm 0.22 у.е.	4.55 \pm 0.21 у.е.* [#]

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с группой 5 мес. ($p<0,05$);

- статистически значимые отличия по сравнению с группой C57BL/6 ($p<0,05$).

Изучение экспрессии маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности в культурах клеток при аппликации глибенкламида. Обработка клеток глибенкламидом вызывала значимое увеличение экспрессии инсулиновых рецепторов в клетках, полученных от молодых мышей ($p=0,014$, Tukey), подтверждая стимулирующее действие блокатора. Статистически значимых изменений в экспрессии p-IRS1 и pAkt не выявлено. У клеток зрелых животных глибенкламид вызывал значимое снижение экспрессии GSK3 β с 13,2 \pm 0,86% до 9,6 \pm 0,51% ($p<0,005$, Tukey). Выявленные изменения экспрессии представлены в Таблице 8.

Таблица 8 - Изменения экспрессии маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности.

Маркеры	C57BL/6		Глибенкламид	
	5 мес.	14 мес.	5 мес.	14 мес.
<i>in vitro</i>				
IR	8.56 \pm 0.23 у.е	9.94 \pm 0.91 у.е	11.58 \pm 0.52 у.е. [#]	10.3 \pm 0.88 у.е.
p-IRS-Ser	13.36 \pm 1.02 у.е.	10.72 \pm 1.13 у.е.	10.56 \pm 0.97 у.е.	10.44 \pm 0.78 у.е.
GLUT4	30.8 \pm 1.5 у.е.	24.2 \pm 2.22 у.е.*	31.0 \pm 1.9 у.е.	24.1 \pm 1.2 у.е. *
GSK3 β	4.6 \pm 0.68%	13.2 \pm 0.86%*	3.6 \pm 0.52%	9.6 \pm 0.51%* [#]
pAkt	1.02 \pm 0.18 у.е.	3.07 \pm 0.31 у.е.*	1.03 \pm 0.26 у.е.	2.20 \pm 0.59 у.е.

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с группой 5 мес. ($p<0,05$);

- статистически значимые отличия по сравнению с группой C57BL/6 ($p<0,05$).

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

Результаты поведенческого тестирования животных после введения MCC950.

Введение MCC950 вызывало значимое снижение времени замирания в первый день кондиционирования страха у 12-месячных мышей по сравнению с DMSO ($p\leq 0,01$), также наблюдались межвозрастные различия ($p\leq 0,05$). На второй день выявлено влияние возраста ($F(1,17)=29,61$, $p<0,0001$) и вводимого вещества ($F(1,17)=9,084$, $p=0,0078$), без значимого взаимодействия факторов. У 24–25-месячных мышей увеличивалось время замирания,

возможно, из-за стресса от инъекции. На третий (сигнальный) день выявлено значимое взаимодействие факторов ($F(1,21)=10,85$, $p=0,0035$), при этом возраст не влиял на сигнальную память после введения блокатора. Результаты подтверждают защитную роль NLRP3 при старении и влияние MCC950 на сенсорную память (Рисунок 8).

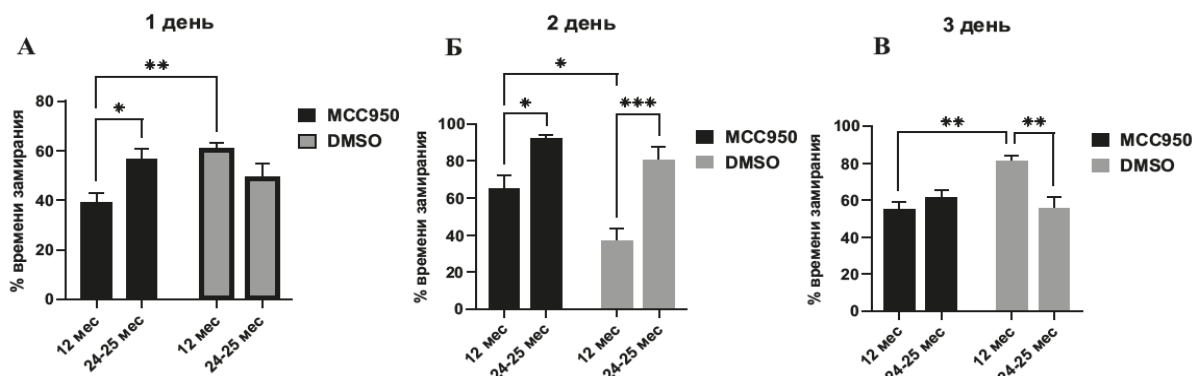


Рисунок 8 – Процент времени замирания (А) В первый день (Б) Во второй день создания условий для запоминания в тесте «Условно-рефлекторного замирания». (В) В контекстный день. MCC950 – мыши с введением MCC950; DMSO– мыши с введением растворителя DMSO.

Изучение сенесценции и развития SASP фенотипа при модуляции NLRP3 прямым блокатором MCC950. В гиппокампе контрольных мышей (DMSO) наблюдалась возрастная индукция SA- β -Gal, тогда как у мышей, получавших MCC950, количество сенесцентных клеток оставалось стабильным ($F(1,36)=13,61$, $p=0,0007$; $F(1,36)=13,52$, $p=0,0008$; $F(1,36)=22,87$, $p<0,0001$). В сокультурах нейронов и астроцитов также зафиксировано влияние возраста ($F(1,20)=31,05$, $p<0,0001$), при этом MCC950 не изменял активность β -галактозидазы. Экспрессия NLRP3 в гиппокампе и *in vitro* снижалась под действием MCC950 у зрелых и стареющих животных ($p<0,0001$ – $0,0261$), с значимым влиянием возраста и блокатора ($F(1,16)=4,58$ – $128,2$, $p<0,05$ – $<0,0001$). Аналогично IL-18 демонстрировал снижение экспрессии в обеих возрастных группах ($F(1,16)=42,75$ и $122,3$, $p<0,0001$). HMGB1 проявлял тенденцию к снижению в присутствии MCC950, статистически значимых изменений не выявлено ($F(1,16)=37,88$ и $6,31$, $p<0,05$ – $<0,0001$). Выявленные изменения представлены в Таблице 9.

Таблица 9 -Изменения сенесценции и развития SASP фенотипа.

Маркеры	C57BL/6		MCC950	
	12-14 мес.	24-25 мес.	12-14 мес.	24-25 мес.
<i>in vivo</i>				
SA- β -gal	4,88 \pm 0.33 %	8,27 \pm 0,66 %*	4,85 \pm 0.37 %	4,38 \pm 0.46 % [#]
NLRP3	10,59 \pm 0,58	8,26 \pm 0,5*	4,02 \pm 0,24* [#]	6,36 \pm 0,43* [#]
<i>in vitro</i>				
SA- β -gal	0.083 \pm 0.005 y.e.	0.17 \pm 0.02 y.e. *	0.06 \pm 0.004 y.e.	0.143 \pm 0.022 y.e.*
NLRP3	24.88 \pm 2.02 y.e.	15.64 \pm 1.06 y.e. *	9.02 \pm 0.36 y.e. [#]	4.81 \pm 0.45 y.e. [#]
IL18	9.86 \pm 0.41 y.e.	14.48 \pm 0.72 y.e. *	4.97 \pm 0.52 y.e. [#]	7.61 \pm 0.51 y.e. * [#]
HMGB1	6.30 \pm 0.59 y.e.	11.90 \pm 1.04 y.e. *	5.36 \pm 0.69 y.e.	9.05 \pm 0.61 y.e. *

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с группой 12-14 мес. ($p<0.05$);

- статистически значимые отличия по сравнению с группой C57BL/6 ($p<0.05$).

Изучение экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом и маркеров инсулиновой сигнализации и инсулинорезистентности в культуре клеток при воздействии MCC950. Инкубация клеток с MCC950 достоверно снижала экспрессию PKR и p-IKK β . Для p-IKK β выявлено значимое влияние возраста ($F(1,16)=38,39$, $p<0,0001$) и блокатора ($F(1,16)=25,30$, $p=0,0001$); для PKR — возраст ($F(1,16)=50,33$, $p<0,0001$) и блокатор ($F(1,16)=8,32$, $p=0,01$). Экспрессия JNK демонстрировала значимое влияние возраста, блокатора и их взаимодействия ($F(1,16)=5,64-115,6$, $p<0,05- <0,0001$), при этом у стареющих животных интенсивность JNK была выше, чем у мышей среднего возраста ($p<0,0001$, Tukey). MCC950 не оказывал значимого влияния на экспрессию pIRS-Ser. Для pAkt выявлено значимое влияние возраста, блокатора и их взаимодействия ($F(1,16)=5,16-84,73$, $p<0,05- <0,0001$). В клетках от стареющих животных инкубация с MCC950 приводила к достоверному снижению pAkt по сравнению с контролем ($p=0,0005$, Tukey). Выявленные изменения представлены в Таблице 10.

Таблица 10 - Изменения экспрессии фосфорилированных протеинкиназ - компонентов метафламмасом в культурах клеток в экспериментальных группах.

Маркеры	C57BL/6		MCC950	
	12-14 мес.	24-25 мес.	12-14 мес.	24-25 мес.
<i>in vitro</i>				
IKK β	12.30 \pm 0.69 у.е.	17.77 \pm 0.88 у.е. *	9.36 \pm 0.45 у.е.	13.17 \pm 0.88 у.е. * [#]
PKR	6.42 \pm 0.26 у.е.	13.55 \pm 1.38 у.е. *	5.44 \pm 0.21 у.е.	9.60 \pm 0.82 у.е. * [#]
JNK	6.38 \pm 0.37 у.е.	14.97 \pm 1.08 у.е. *	4.4 \pm 0.26 у.е.	9.87 \pm 0.57 у.е. * [#]
p-IRS-Ser	10.72 \pm 1.13 у.е.	15.62 \pm 0.64 у.е. *	9.4 \pm 0.69 у.е.	13.87 \pm 1.05 у.е. *
pAkt	3.07 \pm 0.31 у.е.	7.52 \pm 0.56 у.е. *	1.99 \pm 0.32 у.е.	7.52 \pm 0.56 у.е. * [#]

Примечание: *-статистически значимые отличия по сравнению с группой 12-14 мес. ($p<0.05$);

- статистически значимые отличия по сравнению с группой C57BL/6 ($p<0.05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведённого исследования получены новые данные о роли инфламмасы 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 инфламмасы 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 инфламмасы 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 метафламмасы 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 инфламмасы 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 инфламмасы 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 инфламмасы подавляется фармакологической блокадой, что подтверждает участие NLRP3 в индукции воспалительно-сенесцентного состояния.

3. Выявлено повышение экспрессии компонентов метафламмасом (PKR и ИКК 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 инфламмасы в регуляции метаболических процессов мозга.

4. Снижение экспрессии NLRP3 фармакологическими и генетическими методами предотвращает фосфорилирование ключевых протеинкиназ метафламмасомного комплекса (PKR, ИКК 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 метафламмасы как целевого подхода для контроля возрастных нейровоспалительных изменений.

5. Генетическая и фармакологическая блокада NLRP3 инфламмасы 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 НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи, опубликованные в журналах, индексируемых в международных базах научного цитирования:

1) **Khilazheva E.D.**, Mosiagina A.I., Panina Yu.A., Belozor O.S., Komleva Yu.K. Impact of NLRP3 depletion on aging-related metaflammation, cognitive function, and social behavior in mice // International Journal of Molecular Sciences. - 2023. - Vol.24, №23. - P.16580-16600.

2) Komleva Yu.K., Potapenko I.V., Lopatina O.L., Gorina Ya.V., **Hilazheva E.D.**, Salmina A.B., Shuvaev A.N. NLRP3 inflammasome blocking as a potential treatment of central insulin resistance in early-stage Alzheimer's disease// International Journal of Molecular Sciences. - 2021. - Vol.22, №21. - P.1-26.

Научные статьи, опубликованные в журналах, входящих в Перечень ВАК

3) **Хилажева Е.Д.**, Панина Ю.А., Мосягина А.И., Белозор О.С., Комлева Ю.К. Глибенкламид предотвращает воспаление, воздействуя на активацию NLRP3 инфламмасом in

vitro // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2024. - Т.110, №5. - С.736-752.

4) Панина Ю.А., Лопатина О.Л., Мосягина А.И., Комлева Ю.К., Моргун А.В., Горина Я.В., **Хилажева Е.Д.** Нейроповеденческое тестирование как инструмент оценки когнитивных функций при экспериментальной нейродегенерации у мышей // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. - 2023. - Т.17, №4. - С.72-81.

5) **Хилажева Е.Д.**, Белозор О.С., Панина Ю.А., Горина Я.В., Мосягина А.И., Васильев А.В., Малиновская Н.А., Комлева Ю.К. Роль метаболического воспаления в развитии секреторного фенотипа клеток и когнитивной дисфункции у мышей при старении // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2022. - Т.108, №9. - С.1200-1221.

Другие публикации:

6) Панина Ю.А., **Хилажева Е.Д.**, Комлева Ю.К., Мосягина А.И. Нейровоспаление при старении и поведенческие изменения // Социальный мозг: профилактика и реабилитация негативных стрессовых воздействий. Материалы международной конференции. - Красноярск, КрасГМУ. - 2023. - С.28.

7) Комлева Ю.К., **Хилажева Е.Д.**, Панина Ю.А., Белозор О.С., Мосягина А.И. Компоненты метафламмасом: роль при старении // сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества им. И. П. Павлова. - Санкт-Петербург, ООО Издательство ВВМ. - 2023. - С.497-498.

8) Salmina A.B., Gorina Ya.V., Komleva Yu.K., **Hilazheva E.D.**, Pisareva N.V., Salmin V.V., Shuvaev A.N., Malinovskaya N.A. Aberrant neuroplasticity in aging and neurodegeneration associated with deregulation of neurogenesis and angiogenesis // Abstracts of the 13th International multiconference «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / System Biology», BGRS/SB-2022, Novosibirsk, July 4-8, 2022. - Novosibirsk, Institute of Cytology and Genetics. - 2022. - P.1070.

9) Komleva Yu.K., **Hilazheva E.D.**, Potapenko I.V., Panina Yu.A., Chernykh A.I., Salmina A.B., Lopatina O.L., Gorina Ya.V., Shuvaev A.N. Metabolic mechanisms of neuroinflammation as a target for the prevention and potential correction of central insulin resistance // RusNeuroChem. - Сборник тезисов Всероссийской с международным участием конференции Российского нейробиологического общества, 22-24 мая 2022 года. - Санкт-Петербург, ИЭФБ. - 2022. - P.106.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Akt - протеинкиназа B
BSA - альбумин бычьей сыворотки
CS - условный раздражитель
DAMP - ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны
DAPI - (4',6-diamidino-2-phenylindole) – краситель для ядер клеток
DMEM - модифицированная среда Дульбекко
GFAP - глиальный фибриллярный кислый белок
GLUT - глюкозный транспортер
GSK3 β - киназа гликогенсинтазы 3 β
HMGB1 - белок группы высокой подвижности B1, амфотерин
IKK β - ингибитор каппа-B киназы
IL - интерлейкин
IR - инсулиновый рецептор

IRS1 - субстрат инсулинового рецептора 1
JNK - c-Jun N-терминальная киназа
LPS - липополисахарид
NLRP3 - NOD-подобный рецептор, содержащий пириновый домен 3
NLRP3 KO – мыши, нокаутные по гену *Nlrp3*
PAMP - патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
PBS - фосфатно-солевой буфер
pIRS-Ser - субстрат инсулинового рецептора, фосфорилированный по серину
PKR - РНК-зависимая протеинкиназа
PRR - паттерн-распознающий рецептор
SA- β -gal - связанная со старением бета-галактозидаза
SASP - секреторный фенотип, ассоциированный со старением
US – безусловный стимул

Хилажева Елена Дмитриевна (Российская Федерация)

**Роль метаболических механизмов в развитии нейровоспаления при старении
(экспериментальное исследование)**

Диссертационная работа посвящена изучению роли NLRP3 инфламماسомы как медиатора межклеточной сигнализации и нейроиммунной коммуникации. В работе изучаются метаболические механизмы формирования возраст-ассоциированных изменений поведения животных, клеточной сенесценции; определяются возможности фармакологической модуляции NLRP3 инфламماسом для профилактики когнитивных нарушений, связанных со старением. В исследовании показана фундаментальная роль NLRP3 инфламماسомы как медиатора сигнала метаболической опасности в регуляции возраст-ассоциированных поведенческих и молекулярных изменений. Делеция гена *Nlrp3* предотвращает развитие когнитивных нарушений, связанных со старением, сохраняя сигнальную память, но снижает социальную активность, что указывает на сложную роль комплекса в регуляции поведения. Установлено, что как генетическая инактивация, так и фармакологическая блокада NLRP3 предотвращает формирование SASP-фенотипа в мозге при старении, подавляет фосфорилирование протеинкиназ метафламмасомного комплекса (PKR, IKK β , JNK) и экспрессию GSK3 β , оказывая выраженный протекторный эффект в отношении возраст-ассоциированных изменений. Фармакологическая блокада NLRP3 способствует улучшению когнитивной функции у стареющих животных, демонстрируя перспективу терапевтической коррекции возраст-ассоциированных когнитивных нарушений и нейропротекции.

Khilazheva Elena Dmitrievna (Russian Federation)

**The role of metabolic mechanisms in the development of neuroinflammation during aging
(experimental study)**

The dissertation is devoted to the study of the NLRP3 inflammasome as a mediator of intercellular signaling, neuroimmune communication. The work investigates the metabolic mechanisms underlying the formation of age-associated changes in animal behavior and cellular senescence, and determines the possibilities for pharmacological modulation of the NLRP3 inflammasome to prevent aging-related cognitive impairments. The research demonstrates the fundamental role of the NLRP3 inflammasome as a mediator of metabolic danger signals in regulating age-associated behavioral and molecular changes. Deletion of the *Nlrp3* gene prevents the development of aging-related cognitive impairments by preserving signaling memory but reduces social activity, indicating the complex role of the complex in behavior regulation. It has been established that both genetic inactivation and pharmacological blockade of NLRP3 prevent the formation of the SASP phenotype in the aging brain, suppress the phosphorylation of protein kinases in the metaflammasome complex (PKR, IKK β , JNK) and the expression of GSK3 β , exerting a pronounced protective effect against age-associated alterations. Pharmacological blockade of NLRP3 improves cognitive function in aging animals, demonstrating the potential for therapeutic correction of age-associated cognitive impairments and neuroprotection.