

*На правах рукописи*

Анфимова Полина Александровна

**Нейронная организация дорсомедиального ядра гипоталамуса самцов и самок крыс при старении**

1.5.5. Физиология человека и животных

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Ярославль – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Маслюков Петр Михайлович**

**Официальные оппоненты:**

**Любашина Ольга Анатольевна**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, заведующий лабораторией кортико-висцеральной физиологии

**Романова Ирина Владимировна**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, заведующий лабораторией интегративной нейроэндокринологии

**Ведущая организация:**

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

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г. в \_\_ на заседании диссертационного совета 21.2.060.02, созданного на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34, корп. 2) и на сайте [www.rzgmu.ru](http://www.rzgmu.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук, доцент

Короткова Н.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Гипоталамус – жизненно важный центр промежуточного мозга, участвующий в интеграции эндокринной и нервной систем, а также играющий важную роль в контроле гомеостаза [11]. Гипоталамус может играть фундаментальную роль в развитии старения и контроле продолжительности жизни, в дополнение к его критическому участию в основных функциях жизнеобеспечения [73, 242, 244, 140].

При этом наиболее документированными возрастными изменениями являются повышение чувствительности гипоталамуса к гомеостатическим сигналам, дисбаланс гормонов и циркадных ритмов, нейровоспаление, потеря аутофагии и стволовых клеток в области гипоталамуса [52, 146]. Эти нарушения, в свою очередь, способствуют появлению метаболического синдрома, включая ожирение, диабет, гипертонию и снижение репродуктивных функций. Коррекция сниженных уровней некоторых гипоталамических гормонов может улучшить различные эффекты старения. Например, терапия гонадолиберином и соматолиберином уменьшает атрофию кожи, центральное ожирение, мышечную слабость, потерю костной массы и улучшает умственные функции [242, 235, 38]. Однако гормональная терапия против старения имеет множество побочных эффектов, включая повышенный риск рака [27]. В отдельных работах в экспериментах на мышах было показано, что скорость старения в значительной степени контролируется стволовыми клетками гипоталамуса, частично за счет высвобождения экзосомальных микроРНК (миРНК) [245].

Последние исследования показывают значительные изменения в работе гипоталамуса с возрастом, в частности происходит нарушение сигнальных путей (например пути фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназы (PI3K)/протеинкиназы В (АКТ)/мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR)), нарушение процессов аутофагии, дисбаланс процессов возбуждение/торможение, возникновение гипоталамического микровоспаления

[115, 51, 61]. Старение часто сопровождается ожирением, и наблюдаются нарушения в стареющих нейронах гипоталамуса, регулирующих обмен веществ и расход энергии [234, 118, 173].

Важная роль гипоталамуса в контроле старения отводится средней группе ядер, включая дорсомедиальное (ДМЯ) ядро гипоталамуса [206, 244]. ДМЯ играет важную роль в регуляции метаболических процессов и связанных с пищей циркадных ритмов. Оно участвует в интеграции информации от супрахиазматического ядра и периферических органов для модуляции различных поведенческих и физиологических ритмов, контроле времени кормления, двигательной активности, секреции кортикостерона и режима сна-бодрствования [64, 195, 153, 16, 167].

### **Степень разработанности темы**

В процессе возрастного развития изменяется химический состав нейронов центральной и периферической нервной системы. В частности, происходят изменения содержания кальций-связывающих белков кальбиндина (КБ) и кальретицина (КР), нейропептидов, в том числе нейропептида Y (НПY), соматостатина (СОМ), нейрональной синтазы оксида азота (nNOS), а также везикулярного переносчика глутамата (VGLUT2) и глутаматдекарбоксилазы (GAD65/67). При старении происходят изменения экспрессии различных гипоталамических нейротрансмиттеров и гормонов [118]. Тем не менее, имеется сравнительно мало данных относительно изменения характера импульсации и нейрохимического состава гипоталамических нейронов ДМЯ при старении.

### **Цель исследования**

Проанализировать функциональные изменения нейронов дорсомедиального ядра гипоталамуса с учетом половых различий при старении.

### **Задачи исследования**

1. Определить изменения характера фоновой электрической импульсации нейронов ДМЯ гипоталамуса при старении.

2. Установить изменения баланса возбуждения/торможения в ДМЯ при старении.

3. Выявить изменения кальциевого гомеостаза и оксида азота в нейронах ДМЯ гипоталамуса при старении.

4. Исследовать изменения нейропептидного состава нейронов ДМЯ гипоталамуса, включая нейропептид Y (НПУ), и соматостатин (СОМ) при старении.

5. Найти половые различия функциональных и морфологических особенностей нейронов ДМЯ гипоталамуса при старении.

### **Научная новизна исследования**

В настоящей работе впервые проведен комплексный анализ функциональных изменений в ДМЯ гипоталамуса при старении. Впервые охарактеризованы основные паттерны фоновой электрической активности нейронов у животных разного пола. Обнаружено, что процесс старения сопровождается снижением частоты импульсации нейронов, а также нарушением баланса процессов возбуждения/торможения. При этом выявлено усиление взаимнопротивоположных процессов торможения и возбуждения, связанных с активацией ГАМК и глутаматергической систем.

Получены новые данные об изменении нейрохимического состава нейронов ДМЯ, сопровождающемся нарушением кальциевого сигналинга и увеличением экспрессии nNOS. При этом в нейронах уменьшается количество кальбиндина и увеличивается количество кальренина. В отличие от ГАМК и глутамата, содержание нейропептидов соматостатина и нейропептида Y в ядре при старении не изменяется.

Впервые проанализированы половые различия по изученным функциональным характеристикам нейронов ДМЯ. Достоверных различий по характеру фоновой электрической активности, а также нейрохимическому составу нейронов ДМЯ при старении не было выявлено. При этом наблюдались половые различия по локализации кальбиндина, а также колокализации соматостатина и нейропептида Y.

## **Теоретическая и практическая значимость**

Проводимое исследование морфологических и функциональных характеристик гипоталамических нейронов при старении, позволяют существенно расширить представления о возрастных изменениях нервной системы, а также могут быть использованы как нормативные при изучении функциональных особенностей внутренних органов и систем на этапах онтогенеза, а также при изучении механизмов действия лекарственных препаратов. На основе полученных представлений возможно построение моделей возрастного развития гипоталамуса с возможностью экстраполяции на человека. В целом, обоснованные в работе положения могут использоваться в учебном процессе при подготовке специалистов различного профиля. Установленные изменения в ядрах гипоталамуса при старении могут помочь в разработке препаратов, направленных на увеличение продолжительности жизни и лечения возрастных заболеваний.

## **Методология и методы исследования**

Работа выполнена на 80 крысах линии Wistar в соответствии с действующими «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных».

Объект исследования: ДМЯ гипоталамуса.

Для исследования выбраны следующие возрастные группы: крысы 2-3 месяца (молодые) и 24-36 месяца (старые). Для оценки половых различий в процессе старения, работа выполнена на самцах и самках.

В качестве методов исследования использовали:

1. Электрофизиологические. Регистрация и анализ фоновой электрической импульсации нейронов дорсомедиального ядра гипоталамуса при старении.

2. Иммуногистохимические. Определение кальбиндина, кальретинина, нейропептида Y, нейрональной NO-синтазы, соматостатина, везикулярного

переносчика глутамата VGLUT2 и глутаматдекарбоксилазы GAD65/67 при помощи двойного мечения антителами в нейронах дорсомедиального ядра гипоталамуса при старении.

3. Вестерн-блоттинг. Выявление экспрессии кальбиндина, кальретинина, нейропептида Y, нейрональной NO-синтазы, соматостатина, везикулярного переносчика глутамата VGLUT2 и глутаматдекарбоксилазы GAD65/67 в нейронах дорсомедиального ядра гипоталамуса при старении.

4. Статистическая обработка данных при помощи программы Sigma Plot 12.0.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Частота импульсации нейронов дорсомедиального ядра гипоталамуса с возрастом снижается.

2. В дорсомедиальном ядре гипоталамуса крыс при старении увеличивается экспрессия маркеров возбуждающей (глутамат) и тормозной (ГАМК) передачи.

3. При старении происходят разнонаправленные сдвиги нейрохимического состава нейронов дорсомедиального ядра гипоталамуса крыс.

### **Степень достоверности данных**

Достоверность представленных в работе данных основывается на использовании современных общепринятых экспериментальных методик. Результаты исследования статистически достоверны и воспроизводимы. Для обзора литературы и обсуждения результатов исследования использовались актуальные тематические источники.

### **Апробация результатов исследования**

Результаты диссертационного исследования представлены в рамках следующих всероссийских и международных конференций: Всероссийская конференция с международным участием, посвященная 145-летию кафедры физиологии человека и животных «Самойловские чтения. Современные проблемы нейрофизиологии» (Казань, 2019); Конференция молодых ученых и

студентов «Физиология и физика в современной медицине», посвященная 100-летию МГМСУ им. А.И. Евдокимова (Москва, 2022); VI Междисциплинарная конференция с международным участием «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», посвященная 90-летию со дня рождения академика К.В. Судакова (Москва, 2022); III-й объединенный научный форум (VII съезд физиологов СНГ, VII съезд биохимиков России, X российский симпозиум «Белки и пептиды») (Сочи, 2022); XXIX Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2023» (Санкт-Петербург, 2023); IV Международная научная конференция «Современные проблемы нейробиологии» (Ярославль 2023); XXIV съезд Физиологического Общества имени И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023).

### **Личный вклад автора**

Все этапы исследовательской работы проходили при непосредственном личном участии соискателя, а именно: формулировка цели и задач исследования, разработка схем и методов экспериментов, их проведение, статистическая обработка и анализ полученных результатов, написание статей и тезисов, представление результатов исследования на российских и международных конференциях.

### **Публикации по теме исследования**

По результатам исследования было опубликовано 13 работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных изданиях, включенных в перечень ВАК и индексируемых в базах РИНЦ, Web of Science или Scopus.

### **Структура и объем работы**

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, а также заключения и выводов. Список использованной литературы включает 248 источников (в том числе зарубежных авторов – 233, отечественных авторов – 15). Материалы диссертации изложены на 129 страницах. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 8 таблицами.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Использовались 80 крыс самцов и самок линии Вистар в возрасте 2-3 месяца (молодые, масса тела 160-180 г) и 24 месяца (старые, масса тела 450-500 г). Для исследования определены четыре группы: молодые самцы, молодые самки, старые самцы, старые самки. В каждой группе: пять особей для иммуногистохимического исследования, пять для вестерн-блоттинг анализа и десять – для электрофизиологических методов. Молодые самки находились в фазе диэструса, что определялось по вагинальному мазку, окрашенному метиленовым синим по Леффлеру.

В качестве методов исследования использовались:

### **1. Электрофизиологические методы исследования**

Проводился анализ фоновой электрической активности в нейронах ДМЯ гипоталамуса у наркотизированных животных при самостоятельном дыхании. Внеклеточные записи проводили с помощью одного вольфрамового микроэлектрода (диаметр наконечника 2-3 мкм, импеданс 1 МОм), вставленного вертикально в левое ДМЯ гипоталамуса согласно координатам атласа мозга крысы [176]. Электрическую активность усиливали и фильтровали с помощью системы Neurolog (Digitimer, Великобритания) с полосой пропускания от 0,3 до 3,0 кГц. Затем сигнал был захвачен аналого-цифровым преобразователем Micro1401 и записан с помощью программного обеспечения Spike2 (CED, Великобритания). На основе записей активности были построены гистограммы интервалов между скачками, а также были рассчитаны среднее значение и режим интервалов между спайками. Сортировка по спайкам с дальнейшим кластерным анализом проводилась с использованием программного обеспечения Spike2.

### **2. Иммуногистохимические методы исследования**

Для выявления нейронов, содержащих кальбиндин, кальретинин, нейропептид Y, нейрональную синтазу NO, соматостатин, VGLUT2 и GAD65/67 применялся метод двойного флюоресцентного иммуномечения. Для расчета процента иммунопозитивных нейронов кроме метки к интересующему

белку производилась окраска всей популяции нейронов. Срезы толщиной 12 мкм инкубировались с первичными антителами, разведенными на фосфатном буфере, в течение 24 ч при комнатной температуре. После трехкратного промывания срезы инкубировались 2 часа при комнатной температуре с вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом FITC (дающим зеленую флюоресценцию), или с флуорохромом CY3 (дающим красную флюоресценцию). С целью контроля, для исключения неспецифической реакции, часть срезов инкубировалась без первичных антител. Затем срезы снова промывались, заключались с помощью среды towio1 под покровное стекло и хранились при + 4° С. Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD камерой Tucsen TCC 6.1ICE с программным обеспечением IS Capture 3.6 (Китай). Для анализа размеров и процентного соотношения иммунопозитивных нейронов на цифровых изображениях гистологических препаратов использовали программу ImageJ (НИН, США).

### **3. Вестерн-блоттинг**

После погружения животного в глубокий уретановый наркоз, производили забор материала и готовили пробы, которые охлаждали в снегу и замораживали. В день проведения электрофореза пробы размораживали, разводили в буфере. Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в 10% геле, используя оборудование для вестерн-блоттинга. Разделение белков проводили сначала при напряжении 80 В, а через 20 мин увеличивали до 130 В. Гель с белковыми фракциями переносили на PVDF мембрану в течение 90 минут при напряжении 100 В.

Мембрану после блокировки инкубировали в течение ночи при + 4 ° С в первичных антителах к исследуемым белкам. После промывки проводили инкубацию при комнатной температуре 1 ч в соответствующих вторичных антителах, конъюгированных с пероксидазой. Визуализацию сигнала проводили с помощью хемилюминесцентной системы в темной камере. Блоты

оцифровывали с помощью системы гель-документирования Syngene G:BOX Chemi XR5E (Syngene). Полученные данные анализировали с помощью денситометрии с использованием программы обработки изображений ImageJ (NIH). Экспрессию общего белка нормализовали по экспрессии белка GAPDH.

#### **4. Статистическая обработка данных**

Математическая обработка данных проведена с использованием пакета прикладных программ Sigma Plot (StatSoft, USA). Все величины представлены как средняя арифметическая  $\pm$  ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Нормальность распределения количественных значений проверялась на основе критерия Шапиро-Уилка. Достоверность различий средних величин определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с коррекцией Бонферрони, а также t-критерия Стьюдента (для парных сравнений). Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **Особенности фоновой электрической импульсации нейронов ДМЯ при старении**

Частота импульсации нейронов ДМЯ составила  $2,5 \pm 0,12$  Гц у молодых самцов и  $2,4 \pm 0,21$  Гц у молодых самок крыс (статистически значимых различий нет,  $p > 0,05$ ). Однако у старых крыс этот параметр снизился до  $1,8 \pm 0,17$  Гц у самцов и  $1,7 \pm 0,11$  Гц у самок крыс (различия между молодыми и старыми крысами были статистически значимыми для каждого пола,  $p < 0,05$ ). Достоверных половых различий по частоте импульсации нейронов в каждой возрастной группе не отмечалось ( $p > 0,05$ ). Скорость возбуждения нейронов может снижаться из-за увеличения продолжительности периода следовой гиперполяризации [168, 192] и нарушения  $Ca^{2+}$ -буферизации [162, 123].

#### **Параметры разрядов по данным интервальных гистограмм**

Паттерны разрядов большинства нейронов ДМЯ были нерегулярными, включая периоды относительно стабильной активности, прерываемые паузами. Основываясь на особенностях интервальных гистограмм, были отобрали нейроны с постоянной ритмической активностью, нерегулярной аритмической

активностью, с широким распределением интервалов между всплесками и клетки с залпами из двух или трех импульсов у самцов и самок во всех возрастных группах. Аналогичные группы нейронов были обнаружены в ВМЯ гипоталамуса [194]. У молодых крыс нейроны, разряжающиеся в стохастическом порядке, а также клетки с разрядами в виде парных или тройных спайков имели более высокую среднюю частоту импульсации по сравнению со старыми крысами (статистически значимые различия,  $p < 0,05$ ). Частоты импульсации нейронов с широким распределением межспайковых интервалов, а также с парными или тройными залпами импульсов достоверно не отличались у молодых и старых животных ( $p > 0,05$ ) (Рисунок 1).

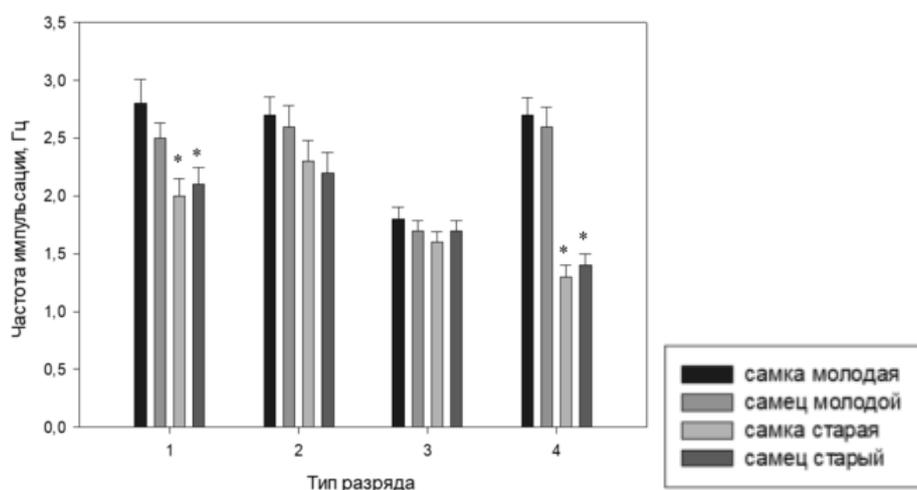


Рисунок 1 – Частота импульсации нейронов, разряжающихся в стохастическом порядке (1), с постоянной частотой (2), с широким распределением межспайковых интервалов (3) и с парными или тройными спайками (4) у молодых и старых самок и самцов крыс.

\*  $p < 0,05$  – при сравнении с молодыми

### **Изменение баланса возбуждение/торможение Иммуногистохимическое исследование везикулярного переносчика глутамата и глутаматдекарбоксилазы**

Результаты иммуногистохимического исследования выявили небольшой процент VGLUT2-ИР нейронов, при этом значительная доля нейронов была GAD65/67 ИР в ДМЯ гипоталамуса молодых самцов и самок крыс (Рисунок 2, Таблица 1). VGLUT2-ИР и GAD65/67-ИР нейроны располагались диффузно в различных частях ядра: ДМЯк, ДМЯд и ДМЯв. Нами не было обнаружено достоверных половых различий ( $p > 0,05$ ). С возрастом процент VGLUT2-ИР и

GAD65/67-ИР нейронов достоверно не изменился у крыс обоих полов ( $p>0,05$ ). При старении наблюдается нарушение регуляции ГАМК и глутаматергической передачи сигналов. Однако, согласно исследованиям, изменения данных систем в нейронах неодинаковы и зависят от популяции нейронов [193].

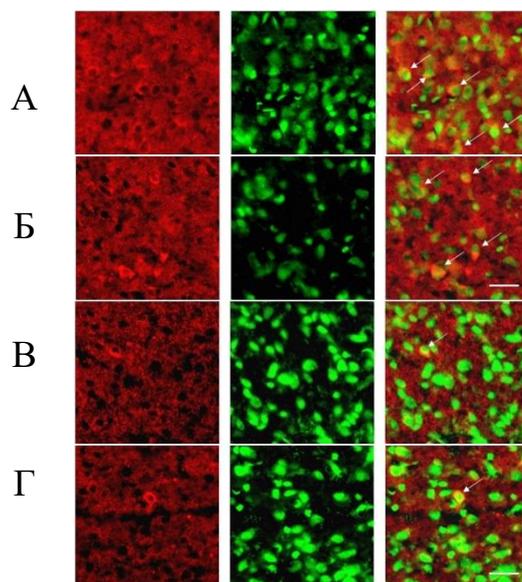


Рисунок 2 – Иммуногистохимическая реакция к VGLUT2 (А, Б) и GAD65/67 (В, Г). Двойное иммуномечение: VGLUT2 – CY3 (красный, левый ряд), вся популяция нейронов – NeuroTrace Green (зеленый, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 20 мкм.

Примечание – А, В – у молодых самцов, Б, Г – у старых самцов.

Таблица 1 – Процент VGLUT2 и GAD65/67-ИР нейронов в дорсомедиальном ядре при старении ( $n=5$  в каждой возрастной группе для самок и самцов)

Иммунореактивность	самки		самцы	
	молодые	старые	молодые	старые
VGLUT2	$4,3 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,4$
GAD65/67	$65,7 \pm 5,8$	$61,3 \pm 4,9$	$63,6 \pm 5,7$	$70,0 \pm 6,8$

### Вестерн-блоттинг везикулярного переносчика глутамата и глутаматдекарбоксилазы

У крыс всех возрастных групп и полов в блотах, полученных из дорсомедиальных ядер гипоталамуса, определялись полосы белков VGLUT2 и GAD65/67, соответствующие молекулярной массе белка 65 кДа (Рисунок 3). Экспрессия GAD65/67 и VGLUT2 значительно увеличилась в дорсомедиальном ядре у старых крыс по сравнению с молодыми ( $p<0,05$ ).

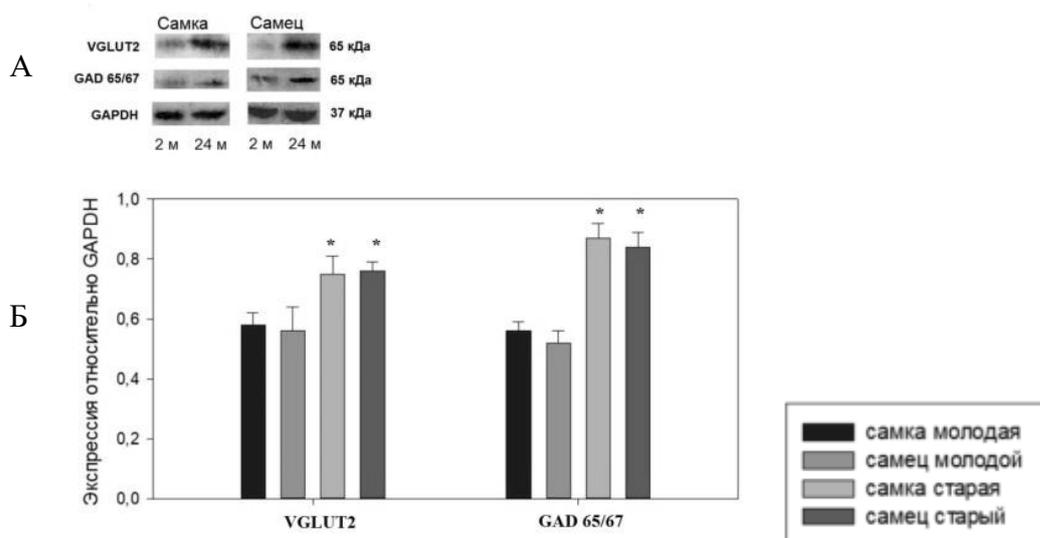


Рисунок 3 – Изменение экспрессии VGLUT2 и GAD65/67 в дорсомедиальном ядре у молодых и старых самцов и самок крыс

\* $p < 0,01$  по сравнению с молодыми крысами

Примечание – А – Иммуноблоттинговые полосы VGLUT2, GAD65/67 и GAPDH, Б – Изменение экспрессии VGLUT2 и GAD65/67 относительно GAPDH.

### Изменение кальциевого сигналинга

#### Иммуногистохимическое исследование кальбиндин иммунореактивных нейронов

В ДМЯ молодых крыс обоего пола и старых самок наибольшее количество КБ-ИР нейронов выявлено в его вентральной части - ДМЯв, а меньшее количество КБ-ИР нейронов - в дорсальной части - ДМЯд (Рисунок 4, Таблица 2). В компактной части ДМЯ (ДМЯк) обнаружено лишь несколько КБ-ИР нейронов. В ДМЯв обоих возрастных групп наблюдалось достоверно большее число нейронов у самок по сравнению с самцами ( $p < 0,05$ ). С возрастом количество КБ-ИР нейронов достоверно уменьшалось во всех частях исследованных ядер, включая ДМЯд и ДМЯв у самцов и самок по сравнению с молодыми ( $p < 0,05$ ).

Экспрессия КБ имеет половой диморфизм в преоптической области и переднем гипоталамусе грызунов. В ПОА иммунореактивность к КБ была в несколько раз выше у самцов по сравнению с самками [210, 77, 232, 39]. Однако не было обнаружено явных различий в количестве нейронов КБ-ИР в мышине ВМЯ [77]. Различия в ДМЯ, связанные с полом, были выявлены у

молодых и старых крыс. Mele и соавт. (2016) подтвердили половой диморфизм ДМЯ гипоталамуса, например, в отношении экспрессии рецептора Y1.

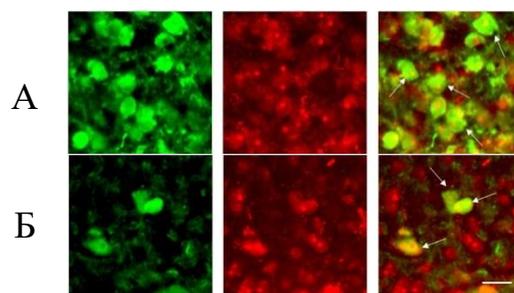


Рисунок 4 – Иммуногистохимическая реакция к КБ. Двойное иммуномечение: КБ – FITC (зеленый, левый ряд), вся популяция нейронов – NeuroTrace Red (красный, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 10 мкм.  
Примечание – А – у молодых самцов, Б – у старых самцов.

Таблица 2 – Процент КБ-ИР нейронов в дорсомедиальном ядре при старении (n=5 в каждой возрастной группе для самок и самцов)

Ядро		самки		самцы	
		молодые	старые	молодые	старые
ДМЯ	ДМЯд	30,5±1,2	20,3±1,9*	28,3±1,7	22,2±1,3*
	ДМЯв	71,3±1,6	39,9±3,3*	50,1±2,6**	28,6±2,7***
Примечание – *p<0,05 по сравнению с молодыми, **p<0,05 по сравнению с самками					

### Иммуногистохимическое исследование кальретицин иммунореактивных нейронов

Иммунореактивность к КР обнаруживалась преимущественно в телах нейронов (Таблица 3) преимущественно в ДМЯд и ДМЯв. Только отдельные нейроны выявлялись в компактной части ДМЯ. В отличие от КБ, процент КР-ИР нейронов достоверно увеличивался в ДМЯд и ДМЯв у обоих полов с возрастом ( $p<0,05$ ). Не было отмечено достоверных половых различий по процентам КР-ИР нейронов в отдельных возрастных группах ( $p>0,05$ ). Согласно литературным данным, снижение уровня КБ не было связано с изменениями КР и парвальбумина в гиппокампе и периринальной коре [66, 165, 82]. An и соавт. (2017) также показали снижение КБ и увеличение экспрессии КР в коре головного мозга пожилых крыс и мышей по сравнению с молодыми животными.

Таблица 3 – Процент КР-ИР нейронов в ДМЯ при старении (n=5 в каждой возрастной группе для самок и самцов)

Ядро		самки		самцы	
		молодые	старые	молодые	старые
ДМЯ	ДМЯд	13,3±2,4	32,3±1,8*	9,1±0,8	39,3±5,8*
	ДМЯв	10,2±1,9	31,7±2,1*	15,4±2,6	31,0±2,7*
Примечание – *p<0,05 по сравнению с молодыми					

### Колокализация кальбиндина и кальретинина

В ДМЯ были обнаружены три группы нейронов: иммунореактивные только к КБ (КБ(+)/КР(-)); только КР-ИР (КБ(-)/КР(+)) и нейроны иммунореактивные к обоим белкам (КБ(+)/КР(+)). В ДМЯв у молодых животных подавляющее большинство нейронов было КБ(+)/КР(-), тогда как у старых крыс наибольшее количество было КБ(-)/КР(+) у обоих полов (Таблица 4). В ДМЯв молодых крыс процент нейронов КБ(+)/КР(-) был выше у самок по сравнению с самцами (p<0,05). Различные субпопуляции нейронов экспрессировали эти два кальций-связывающих белка в гиппокампе крысы [154] и дугообразном ядре гипоталамуса [88]. В кишечной нервной системе крыс большинство нейронов колокализовали КБ и КР у молодых и старых крыс [147]. Некоторые исследования экспрессии генов КБ и КР показывают, что эти кальций-связывающие белки могут выполнять сходную функцию, и один из них может компенсировать потерю другого [35].

Таблица 4 – Процентное соотношение КБ (+)/КР (-), КБ (+)/КР (+), КБ (-)/КР (+) нейронов по сравнению с общим количеством КБ- и КР-иммунореактивных клеток в дорсомедиальном ядре при старении (n=5 в каждой возрастной группе для самок и самцов)

Ядро		самки		самцы	
		молодые	старые	молодые	старые
ДМЯд	КБ(+)/КР(-)	65,1±3,3	31,2±1,8*	59,0±3,7	32,7±2,5*
	КБ(+)/КР(+)	19,8±2,4	22,8±2,1	27,4±0,6	16,1±2,1*
	КБ(-)/КР(+)	15,2±3,5	46,3±5,4*	14,4±3,1	51,4±4,4*
ДМЯв	КБ(+)/КР(-)	84,3±4,1	21±2,6*	69,1±4,1**	19,2±3,9*
	КБ(+)/КР(+)	7,9±1,3	25,2±2,6*	16,0±1,3**	35,3±3,7*,**
	КБ(-)/КР(+)	8,3±2,1	46,7±4,7*	14,9±2,1**	46,2±2,2*
Примечание – *p<0,05 по сравнению с молодыми, **p<0,05 по сравнению с самками					

## Вестерн-блоттинг кальбиндина и кальретинина

При исследовании КБ и КР методом вестерн-блоттинга белки выявлялись в виде полос массой 30 кДа для кальбиндина и 26 кДа для кальретинина. Относительно GAPDH экспрессия КБ значительно снижалась, а экспрессия КР значительно повышалась в ДМЯ при старении (Рисунок 5). Мы не наблюдали различий в экспрессии КБ и КР в ДМЯ связанных с полом ( $p > 0,05$ ).

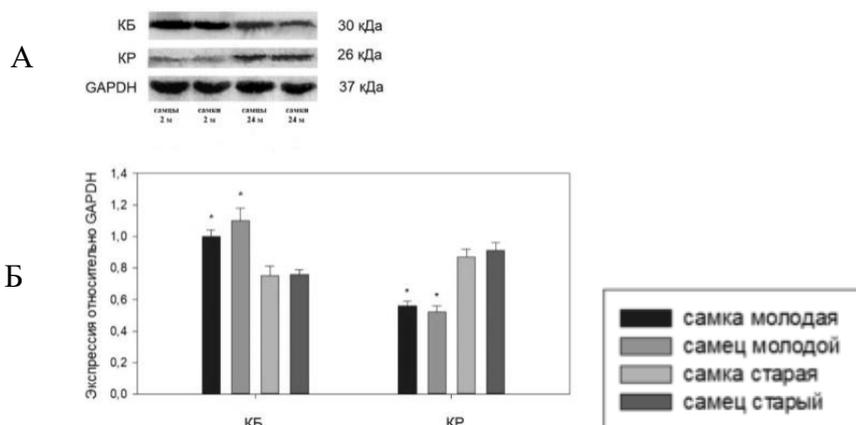


Рисунок 5 – Изменение экспрессии кальбиндина и кальретинина в дорсомедиальном ядре у молодых и старых самцов и самок крыс

\* $p < 0,01$  по сравнению со старыми крысами

Примечание – А – Иммуноблоттинговые полосы КБ, КР и GAPDH, Б – Изменение экспрессии КБ и КР относительно GAPDH.

## Изменение NOS

### Имуногистохимическое исследование NOS иммунореактивных нейронов

В ДМЯ молодых самцов и самок выявлялись pNOS-ИР нейроны со слабой иммунофлюоресценцией (Рисунок 6). Их процент у молодых самцов составил  $21,2 \pm 2,8$  и  $17,1 \pm 4,0$  у молодых самок. У старых животных процент pNOS-ИР нейронов и степень иммунофлюоресценции к pNOS значительно увеличивались в ДМЯ ( $p < 0,05$ ), и составил  $53,9 \pm 1,8$  у старых самцов и  $57,3 \pm 1,9$  у старых самок. ИР нейроны были локализованы диффузно в различных частях ядра: ДМЯк, ДМЯд и ДМЯв. Не было выявлено достоверных различий по процентам pNOS-ИР нейронов между самцами и самками в каждой возрастной группе ( $p > 0,05$ ). Предыдущие исследования показали связанное со старением увеличение индуцибельной изоформы NOS в гипоталамусе крыс [223, 85]. Избыточный синтез NO ответственен за гибель клеток, или,

альтернативно, повышенное высвобождение NO может быть защитным механизмом, пытающимся противодействовать апоптозу [205].

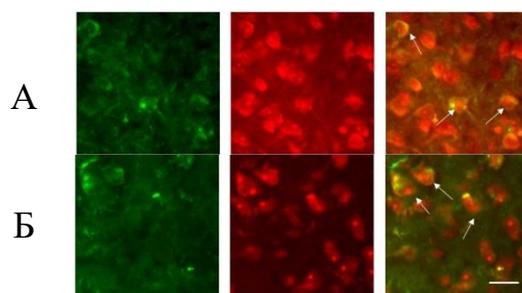


Рисунок 6 – Иммуногистохимическая реакция к pNOS. Двойное иммуномечение: pNOS – FITC (зеленый, левый ряд), вся популяция нейронов – NeuroTrace Red (красный, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 10 мкм.  
Примечание – А – у молодых самцов, Б – у старых самцов.

### Вестерн-блоттинг нейрональной синтазы NO

Исследование pNOS методом вестерн-блоттинга выявило полосы белка с молекулярной массой 160 кДа. Экспрессия pNOS значительно повышалась в ДМЯ при старении (Рисунок 7). Мы не обнаружили статистически значимых различий между экспрессией pNOS у самцов и самок крыс ( $p > 0,05$ ).

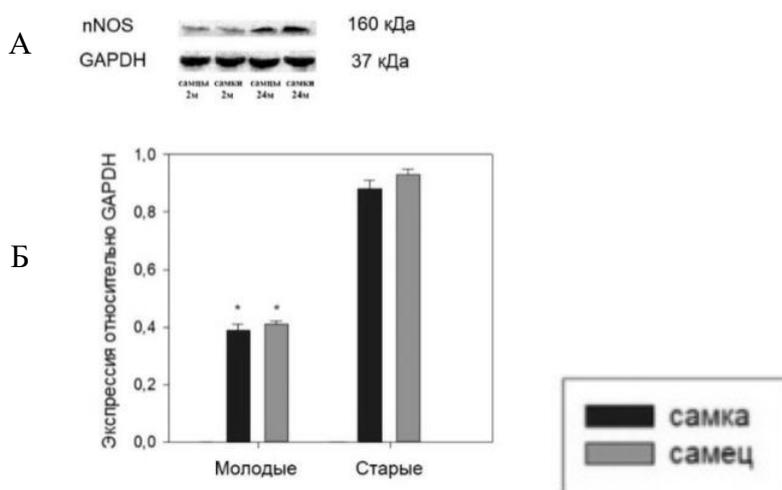


Рисунок 7 – Изменение экспрессии pNOS в дорсомедиальном ядре у молодых и старых самцов и самок крыс.  $*p < 0,01$  по сравнению со старыми крысами  
Примечание – А – Иммуноблоттинговые полосы pNOS и GAPDH, Б – Изменение экспрессии pNOS относительно GAPDH.

### Колокализация pNOS и КБ при старении

У молодых самцов и самок крыс, наибольший процент нейронов является pNOS(-)/КБ(+) (Таблица 5). При старении достоверно снижается доля КБ-ИР

нейронов, не содержащих nNOS-ИР, а также клеток, ИР к обоим маркерам у самцов и самок ( $p < 0,001$ ). В то же время, процент nNOS(+)/КБ(-) значительно возрастает у животных обоих полов ( $p < 0,001$ ).

Таблица 5 – Процентное соотношение nNOS (+)/КБ (-), nNOS (+)/КБ (+), nNOS (-)/КР (+) нейронов по сравнению с общим количеством nNOS- и КБ-иммунореактивных клеток в дорсомедиальном ядре при старении ( $n=5$  в каждой возрастной группе для самок и самцов)

	самки		самцы	
	молодые	старые	молодые	старые
nNOS(+)/КБ(-)	26,2±2,1	68±6,2*	24,8±1,7	74±5,9*
nNOS(-)/КБ(+)	45,4±3,7	13±2,1*	44,5±4,1	15±2,3*
nNOS(+)/КБ(+)	28,4±4,2	19±1,8*	30,7±2,5	12±1,8*

Примечание – \* $p < 0,001$  по сравнению с молодыми

### Изменение нейропептидного состава

#### Иммуногистохимическое исследование нейропептид Y иммунореактивных нейронов

У всех крыс в ДМЯ выявлялась плотная сеть интенсивно флюоресцирующих НPY-ИР волокон и небольшой процент НPY-ИР нейронов:  $6,4 \pm 0,9$  у самцов и  $5,2 \pm 0,5$  у самок (Рисунок 8). НPY-ИР нейроны были локализованы диффузно в различных частях ядра: ДМЯк, ДМЯд и ДМЯв. Процент НPY-ИР нейронов в ядре достоверно не изменяется с возрастом у самцов и самок ( $p > 0,05$ ) и составил  $5,5 \pm 0,7$  и  $7,1 \pm 0,6$  соответственно. Не было выявлено достоверных различий по процентам НPY-ИР нейронов между самцами и самками в каждой возрастной группе ( $p > 0,05$ ).

#### Колокализация нейропептида Y с нейрональной NO синтазой и кальбиндином

У молодых крыс, независимо от пола, лишь отдельные НPY-ИР нейроны содержат nNOS (<1%). Однако процент НPY-ИР нейронов, колокализирующих nNOS достоверно увеличивается у старых самок до  $23 \pm 3,5$ , а у самцов до  $19 \pm 2,8$  ( $p < 0,001$ ). Колокализация НPY и КБ отсутствовала во всех возрастных группах у самцов и самок.

## Иммуногистохимическое исследование соматостатин иммунореактивных нейронов

СОМ-ИР нейроны были обнаружены в ДМЯ у животных всех возрастных групп у самцов и самок (Рисунок 8). Процент СОМ-ИР нейронов у молодых животных составил  $6,6 \pm 0,9$  у самцов и  $5,4 \pm 0,6$  у самок. При этом меченые нейроны располагались диффузно в различных частях ядра: ДМЯк, ДМЯд и ДМЯв. Ранее присутствие СОМ было отмечено в ядрах ДЯ, ВМЯ, ДМЯ, ПВЯ взрослых крыс [175, 248, 127] и туберальном ядре взрослых мышей [142].

Процент СОМ-ИР нейронов в ДМЯ существенно не изменяется с возрастом у обоих полов и составил  $5,7 \pm 0,6$  у старых самцов и  $7,3 \pm 0,4$  у старых самок ( $p > 0,05$ ). Не было выявлено достоверных различий по процентам СОМ-ИР нейронов между самцами и самками в каждой возрастной группе ( $p > 0,05$ ).

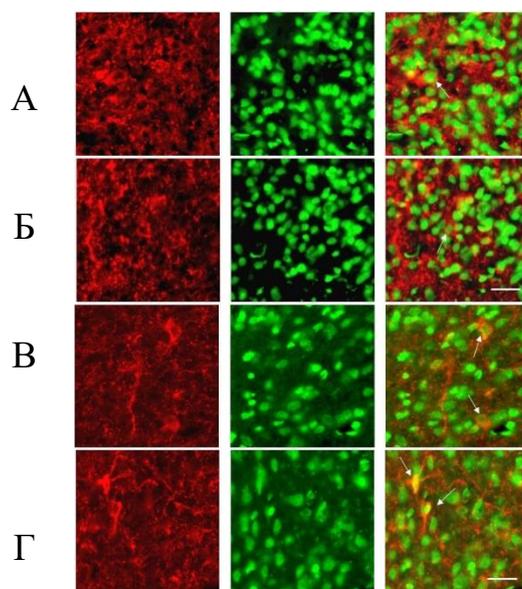


Рисунок 8 – Иммуногистохимическая реакция к НPY (А, Б) и СОМ (В, Г). Двойное иммуномечение: НPY, СОМ – CY3 (красный, левый ряд), вся популяция нейронов – NeuroTrace Green (зеленый, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 20 мкм

Примечание – А, В – у молодых самцов, Б, Г – у старых самцов.

### Колокализация соматостатина с нейрональной синтазой NO, нейропептидом Y и кальбиндином

В ДМЯ до трети СОМ-ИР нейронов были иммунореактивны к nNOS, НPY и КБ (Таблица 6). Не было выявлено достоверных различий по процентам

нейронов, колокализирующих СОМ с nNOS и КБ между молодыми и старыми крысами, а также самцами и самками ( $p > 0,05$ ).

Таблица 6 – Процент соматостатин-иммунореактивных нейронов, колокализирующих nNOS, НПУ и КБ в дорсомедиальном ядре при старении ( $n=5$  в каждой возрастной группе для самок и самцов)

Иммунореактивность	самки		самцы	
	молодые	старые	молодые	старые
СОМ/nNOS	19,2 ± 4,5	20,0 ± 5,1	20,4 ± 5,0	18,8 ± 4,9
СОМ/НПУ	9,2 ± 1,3	9,8 ± 1,9	33,0 ± 3,5*	26,6 ± 4,7*
СОМ/КБ	19,5 ± 3,6	22 ± 4,2	17 ± 1,8	18 ± 2,5

Примечание – \* $p < 0,001$  – различия достоверны по сравнению с самками

При этом в ДМЯ самцов наблюдался достоверно больший процент СОМ-ИР нейронов, колокализирующих НПУ в сравнении с самками в обеих возрастных группах ( $p < 0,001$ ). Тем не менее, достоверные различия по процентам нейронов, колокализирующих СОМ и НПУ между молодыми и старыми крысами одного пола отсутствовали ( $p > 0,05$ ).

### Вестерн-блоттинг нейропептида Y и соматостатина

У молодых и старых обоих полов в блотах, полученных из дорсомедиальных ядер гипоталамуса, определялись полосы белков СОМ и НПУ, соответствующие молекулярной массе белка 17 кДа для соматостатина и 11 кДа для нейропептида Y (Рисунок 9). Экспрессия СОМ и НПУ в дорсомедиальном ядре не менялась с возрастом у обоих полов.

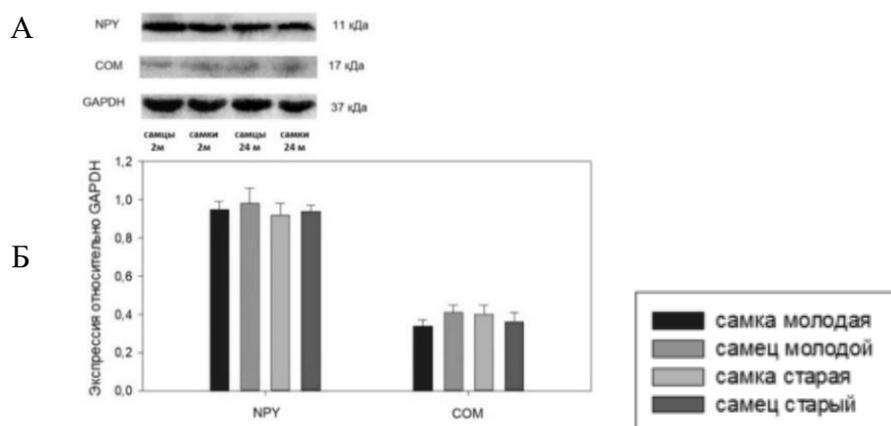


Рисунок 9 – Изменение экспрессии НПУ и соматостатина в дорсомедиальном ядре у молодых и старых самцов и самок крыс.

Примечание – А – Иммуноблоттинговые полосы НПУ, СОМ и GAPDH, Б – Изменение экспрессии НПУ и СОМ относительно GAPDH.

## ВЫВОДЫ

1. Большинство нейронов ДМЯ крыс всех возрастных групп характеризовалось нерегулярной активностью, включая периоды относительно стабильной активности, прерываемые паузами. Основываясь на особенностях интервальных гистограмм было выделено 4 типа разрядов нейронов: 1) с нерегулярной аритмической активностью (большинство нейронов), 2) постоянной ритмической активностью, 3) с широким распределением интервалов между всплесками и 4) с залпами из двух или трех импульсов у самцов и самок во всех возрастных группах.

2. При старении частота импульсации нейронов ДМЯ уменьшается. При этом нейроны, разряжающиеся в стохастическом порядке и с парными или тройными импульсами, имели более высокую среднюю частоту разрядов у молодых крыс по сравнению со старыми животными.

3. При старении в ДМЯ происходит усиление взаимнопротивоположных процессов торможения и возбуждения, связанных с активацией ГАМК и глутаматергической систем, сопровождающееся возрастанием экспрессии глутаматного транспортера VGLUT2 и фермента синтеза ГАМК GAD 65/67. Тем не менее, процент VGLUT2 и GAD 65/67-ИР нейронов в ядре при старении не менялся.

4. Экспрессия кальций-связывающих белков КБ и КР в ДМЯ в процессе старения меняется разнонаправлено. Процент КБ-ИР нейронов, а также содержание КБ уменьшались; доля КР-ИР нейронов и содержание КР увеличивалось в процессе старения в ДМЯ у животных обоего пола. При старении уменьшается доля КБ-ИР нейронов, не содержащих nNOS.

5. У старых крыс наблюдается увеличение процента нейронов, иммунопозитивных к nNOS, а также содержание nNOS по данным вестерн-блоттинга у самцов и самок. Это сопровождается снижением колокализации nNOS с КБ и увеличением колокализации nNOS с NPY.

6. Небольшая часть нейронов ДМЯ крыс содержит СОМ и НПУ. Нейроны, содержащие вышеуказанные пептиды, не колокализуют КБ. Содержание нейропептидов СОМ и НПУ при старении в ДМЯ не изменяется.

7. Половых различий по функциональным показателям импульсной активности, а также нейрохимическим особенностям нейронов ДМЯ при старении не наблюдалось. Тем не менее, у самок наблюдался больший процент КБ-ИР нейронов в вентральной части ДМЯ, а у самцов выявлен значительно более высокий процент СОМ-ИР нейронов колокализующих НПУ во всех возрастных группах.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Изменения иммуногистохимических характеристик нейронов некоторых ядер гипоталамуса при старении / Порсева В.В., Корзина М.Б., Спиричев А.А., Вишнякова П.А., Аряева Д.А., Ноздрачев А.Д., Маслюков П.М. // Морфология. – 2019. – Т. 156, №5. – С. 39-43.
2. Neurochemical properties of the hypothalamic neurons during ageing / P.M. Masliukov, K.Y. Moiseev, A.A. Spirichev, D.A. Aryaeva, P.A. Vyshnyakova. // Book of abstracts: 11 Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience. – 2019. – P. 108.
3. Changes of nNOS expression in the tuberal hypothalamic nuclei during ageing / Moiseev K.Y., Vishnyakova P.A., Porseva V.V., Masliukov A.P., Spirichev A.A., Emanuilov A.I., Masliukov P.M. // Nitric Oxide. – 2020. – V/100-101.
4. Expression of calbindin and calretinin in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei during aging / Vishnyakova P.A., Moiseev K.Y., Spirichev A.A., Emanuilov A.I., Nozdrachev A.D., Masliukov P.M. // The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology. – 2021. – V. 304, № 5. – P. 1094-1104.
5. Changes of discharge properties of neurons from dorsomedial hypothalamic nuclei during aging in rats / Moiseev K.Y., Spirichev A.A., Vishnyakova P.A., Pankrasheva L.G., Masliukov P.M. // Neuroscience Letters. – 2021. – V.762.
6. Соматостатин-содержащие нейроны туберальной области гипоталамуса крыс при старении / Вишнякова П.А., Моисеев К.Ю., Порсева В.В., Панкрасшева Л.Г., Будник А.Ф., Ноздрачев А.Д., Маслюков П.М. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2021. – Т. 107, № 12. – С. 1530–1541.
7. Влияние микроРНК дорсомедиального ядра гипоталамуса на процессы старения у крыс / Маслюков П.М., Порсева В.В., Моисеев К.Ю., Панкрасшева Л.Г., Корзина М.Б., Емануйлов А.И., Вишнякова П.А., Спиричев А.А. // Сборник материалов XVII Международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – 2021. – С. 254.

8. Сравнительный анализ диафоразной и NO-ергической нейрональной активности в ядрах гипоталамуса у молодых и старых самцов крыс / Порсева В.В., Корзина М.Б., Спиричев А.А., Панкрашева Л.Г., Вишнякова П.А., Маслюков П.М. // Сборник материалов XVII Международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – 2021. – С. 305-306.
9. Изменения нейрохимических характеристик дорсомедиального ядра гипоталамуса при старении / Вишнякова П.А. // Сборник материалов III объединенного научного форума (VII съезд физиологов СНГ, VII съезд биохимиков России, X российский симпозиум «Белки и пептиды»). – 2021. – С. 165.
10. Изменения нейрохимических параметров дорсомедиального ядра гипоталамуса при старении / Вишнякова П.А., Порсева В.В., Маслюков П.М. // Сборник тезисов Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 145-летию кафедры физиологии человека и животных «Самойловские чтения. Современные проблемы нейрофизиологии». – 2021. – С. 30-31.
11. Участие дорсомедиального ядра гипоталамуса в регуляции старения / Маслюков П.М., Порсева В.В., Анфимова П.А., Панкрашева Л.Г., Спиричев А.А., Моисеев К.Ю. // Сборник материалов конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций», посвященной 90-летию со дня рождения академика К.В. Судакова. – 2022. – С. 331-332.
12. Возрастные особенности дорсомедиального ядра гипоталамуса при старении / Анфимова П.А., Панкрашева Л.Г. // Сборник материалов конференции молодых ученых и студентов, посвященной 100-летию МГМСУ им. А.И. Евдокимова «Физиология и физика в современной медицине». – 2022. – С. 6.
13. Экспрессия GAD65/67 и VGLUT2 в медиобазальных ядрах гипоталамуса крыс при старении / П.А. Анфимова, Л.Г. Панкрашева, А.И. Емануйлов, К.Ю. Моисеев, П.М. Маслюков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 176, № 8. – С. 267-270.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СУЗ– индокарбоцианин	ДМЯв – дорсомедиальное ядро гипоталамуса, вентральная часть
FITC – флюоресцеин-изотиоцианат	ДМЯд – дорсомедиальное ядро гипоталамуса, дорсальная часть
GAD65/67 – глутаматдекарбоксилаза	ДМЯк – дорсомедиальное ядро гипоталамуса, компактная часть
nNOS – нейрональная NO-синтаза	ДЯ – дугообразное (аркуатное) ядро
PBS – стандартный фосфатно-солевой буфер	ИР – иммунореактивный
VGLUT2 – везикулярный переносчик глутамата	КБ – кальбиндин
ВМЯ – вентромедиальное ядро	КР – кальретинин
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота	НПУ – нейропептид Y
ДМЯ – дорсомедиальное ядро	СОМ – соматостатин