

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЯРОСЛАВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Анфимова Полина Александровна

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

1.5.5. Физиология человека и животных

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Маслюков Петр Михайлович

Ярославль – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	13
1.1. Общие сведения о гипоталамусе	13
1.2. Функции некоторых ядер гипоталамуса.....	14
1.2.1. Дорсомедиальное ядро гипоталамуса	17
1.3. Теории старения	20
1.3.1 Элевационная теория старения.....	21
1.4. Изменения электрических характеристик нейронов при старении	22
1.5. Морфологические изменения нейронов при старении	23
1.5.1. Изменения числа нейронов	23
1.5.2. Возрастные особенности размеров и ультраструктуры нейронов.....	24
1.6. Биохимические изменения в нейронах	25
1.7. Особенности возрастных преобразований в гипоталамусе.....	26
1.7.1. Изменения электрической активности нейронов гипоталамуса при старении.....	26
1.7.2. Морфологические изменения в ядрах гипоталамуса при старении	28
1.7.3. Изменения биологических ритмов	29
1.7.4. Гипоталамическое микровоспаление	30
1.8. Нейрохимические изменения при старении.....	31
1.8.1. Кальций-связывающие белки	31
1.8.1.1. Роль кальция в клетке	32
1.8.1.2. Участие кальция в старении.....	33

1.8.1.3. Изменения содержания кальбиндина и кальренина с возрастом.....	34
1.8.2. Нейрональная синтаза оксида азота	35
1.8.2.1. Роль оксида азота в центральной нервной системе.....	36
1.8.2.2. Роль оксида азота в гипоталамусе	38
1.8.2.3. Изменения оксида азота с возрастом	39
1.9. Особенности нейротрансмиттерного состава при старении	39
1.9.1. Гамма-аминомасляная кислота и глутамат	39
1.9.2. Соматостатин.....	41
1.9.3. Нейропептид Y	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	46
2.1. Экспериментальные животные	46
2.2. Электрофизиологические методы исследования.....	47
2.2.1. Регистрация и анализ фоновой активности нейронов дорсрмедиального ядра гипоталамуса при старении	47
2.3. Иммуногистохимический анализ	49
2.3.1. Перфузия и забор материала	49
2.3.2. Выявление иммунопозитивных структур.....	49
2.3.3. Анализ данных иммуногистохимических методов исследования.....	51
2.4. Вестерн-блоттинг	51
2.4.1. Забор материала и подготовка проб	51
2.4.2. Электрофорез белков	52
2.4.3. Визуализация и детекция белковых полос	53
2.5. Статистическая обработка данных	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	55

3.1. Особенности фоновой электрической импульсации нейронов дорсомедиального ядра гипоталамуса при старении	55
3.1.1. Количество зарегистрированных нейронов и частота импульсации.....	55
3.1.2. Параметры разрядов по данным интервальных гистограмм.....	56
3.1.3. Частота импульсации отдельных типов нейронов	60
3.2. Изменение баланса возбуждение/торможение	62
3.2.1. Иммуногистохимическое исследование везикулярного переносчика глутамата и глутаматдекарбоксилазы	62
3.2.2. Вестерн-блоттинг везикулярного переносчика глутамата и глутаматдекарбоксилазы	65
3.3. Изменение кальциевого сигналинга.....	66
3.3.1. Иммуногистохимическое исследование кальбиндин иммунореактивных нейронов.....	66
3.3.2. Иммуногистохимическое исследование кальренин иммунореактивных нейронов.....	68
3.3.3. Колокализация кальбиндина и кальренина	68
3.3.4. Вестерн-блоттинг кальбиндина и кальренина	70
3.4. Изменение NOS	72
3.4.1. Иммуногистохимическое исследование NOS иммунореактивных нейронов.....	72
3.4.2. Вестерн-блоттинг нейрональной синтазы NO	73
3.4.3. Колокализация nNOS и КБ при старении.....	75
3.5. Изменение нейропептидного состава	77
3.5.1. Иммуногистохимическое исследование нейропептид Y иммунореактивных нейронов	77

3.5.2. Колокализация нейропептида Y с нейрональной NO синтазой и кальбиндином	77
3.5.3. Иммуногистохимическое исследование соматостатин иммунореактивных нейронов	81
3.5.4. Колокализация соматостатина с нейрональной синтазой NO, нейропептидом Y и кальбиндином	81
3.5.5. Вестерн-блоттинг нейропептида Y и соматостатина	83
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	95
ВЫВОДЫ	96
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100

ВВЕДЕНИЕ

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 кальретинина (КР), нейропептидов, в том числе нейропептида Y (НПУ), 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, сопровождающийся нарушением кальциевого сигналинга и увеличением экспрессии nNOS. При этом в нейронах уменьшается количество кальбиндина и увеличивается количество кальретинина. 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. Статистический 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.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Общие сведения о гипоталамусе

Гипоталамус – это небольшой участок промежуточного мозга весом 3-5 грамм (что составляет около 2% от массы всего мозга). Основная функция гипоталамуса заключается в обеспечении гомеостаза организма. Кроме того, гипоталамус играет решающую роль в интеграции работы соматической, автономной и эндокринной систем. Также гипоталамус отвечает за терморегуляцию, контроль энергии, цикл сон-бодрствование, процесс запоминания, баланс натрия и воды, рост и контроль гипофиза, регуляцию полового поведения и размножения [75, 238, 180, 11]. Гипоталамус является центральным регулятором внутренней среды организма. Существует теория, что возрастные изменения гипоталамуса являются одной из причин старения организма [7].

В гипоталамусе позвоночных выделяется ряд ядерных групп и волоконных трактов [131]. Со структурной точки зрения гипоталамус образован скоплением нейронов серого вещества, организуемых в ядра, а также белым веществом, образованным миелинизированными нервными волокнами [180].

В срединно-сагиттальном разрезе гипоталамус человека ограничен спереди терминальной пластинкой, сзади плоскостью, проведенной между задней комиссурой и каудальным краем мамиллярного тела, сверху гипоталамической бороздой. Вентрально гипоталамус охватывает дно третьего желудочка. Внизу гипоталамус образует серый бугор – трубчатую структуру, состоящую из серого вещества, которая лежит между зрительным перекрестом спереди и мамиллярными телами сзади. Срединное возвышение представляет собой небольшую выпуклость в сером бугре, продолжающуюся вниз и образующую воронкообразную ножку, прикрепляющуюся к задней доле гипофиза [180, 92].

Большинство авторов выделяют три области: хиазматическая (преоптическая) область (содержащая супрахиазматическое ядро (СХЯ),

половодиморфное ядро, а также супраоптическое (СОЯ) и паравентрикулярное (ПВЯ) ядра); туберальная область (содержащая вентромедиальное (ВМЯ), дорсомедиальное (ДМЯ) и дугообразное (ДЯ) ядра); латеральными структурами являются латеральное туберальное ядро и туберомиллярное ядро (ТМЯ) и мамиллярный комплекс. Хиазматическая область лежит над перекрестом зрительных нервов, а также кпереди от него. В него входят стенки преоптического кармана. Его задняя граница определяется магноцеллюлярными нейросекреторными ядрами [44]. Конусообразная туберальная область окружает воронку и простирается до нейрогипофиза, в то время как мамиллярные тела доминируют в мамиллярной области, примыкающей к покрышке среднего мозга [43].

1.2. Функции некоторых ядер гипоталамуса

Большая часть ядер гипоталамуса (кроме супраоптического и паравентрикулярного) имеют плохо очерченные границы. В связи с этим их трудно идентифицировать как центры со специфическими функциями [11].

Супрахиазматическое ядро млекопитающих является главным элементом циркадной сети, контролирующей суточные ритмы. СХЯ принимает и транслирует световые сигналы, исходящие от нейронов сетчатки и передаваемые через ретиногипоталамический тракт. Его нейроны демонстрируют 24-часовые ритмы электрической активности, которые продолжаются в отсутствие внешних временных сигналов и даже тогда, когда ткань СХЯ изолирована и поддерживается в культуре. Кроме СХЯ в гипоталамусе имеются другие автономные циркадные осцилляторы в том числе дугообразное и дорсомедиальное ядра. Более того, исследования показывают, что взаимодействие ДМЯ-СХЯ может служить внутригипоталамической системой, контролирующей активность, подавляя циркадные заранее определенные временные паттерны [16, 21, 94, 31, 97].

Вентромедиальное и дорсомедиальное ядра гипоталамуса участвуют в регуляции энергетического баланса, полового и оборонительного поведения [169, 228, 166]. Однако нейроны в медиобазальной области гипоталамуса модулируют не только метаболический гомеостаз, но и продолжительность жизни, главным образом контролируя метаболизм глюкозы через вегетативную нервную систему и косвенно регулируя секрецию инсулина, глюкагона и гормона роста/IGF1 [68, 155]. ДМЯ гипоталамуса также играет важную роль для регуляции циркадных ритмов и получает информацию от систем, которые контролируют наличие пищи [91, 94] а также участвует в регуляции переключения фаз сна с быстрого на медленный [63].

Дугообразное ядро гипоталамуса действует как важнейший центр, контролирующий потребление пищи и энергетический гомеостаз, изменяя экспрессию специфических нейропептидов, таких как нейропептид Y (НПУ), агути-родственный пептид (AgRP), проопиомеланокортин (POMC) и транскрипт, регулируемый кокаином и амфетамином (CART) [71, 103, 15, 166]. Нейроны гипоталамуса, связанные с агути-пептидом (НПУ/AgRP) и проопиомеланокортином (POMC/CART), интегрируют пищевые и гормональные сигналы для контроля энергетического баланса. Избыток питательных веществ и снижение энергозатрат способствуют развитию ожирения и непереносимости глюкозы – отличительных признаков метаболического синдрома. AgRP способствует потреблению пищи, тогда как нейроны POMC экспрессируют препропептид POMC, который впоследствии расщепляется с образованием адренотропного гормона (АКТГ) и меланоцитстимулирующего гормона (МСГ). МСГ активирует центральные рецепторы меланокортина, сокращая потребление пищи и способствуя расходованию энергии, модулируя симпатическую активность на периферии [115]. Скоординированная работа этих нейронов и их нисходящих проекций в ПВЯ, латеральную область гипоталамуса (ЛГ), ДМЯ и ВМЯ способствует контролю энергетического баланса [103].

ВМЯ гипоталамуса также является важным центром регуляции энергетического баланса. Воздействие гормона лептина на нейроны ВМЯ

гипоталамуса играет важную роль в снижении массы тела и в сопротивлении ожирению, вызванному диетой [71]. Стероидогенный фактор 1 (SF1) необходим для развития нейронов ВМЯ, а в головном мозге SF1 специфически экспрессируется в ВМЯ [212, 170]. Нейроны иммунореактивные к SF1 экспрессируют как рецепторы лептина (LepRs), так и рецепторы инсулина (InsRs) [212]. Важно отметить, что SF1 нейроны в составе ВМЯ управляют различными аспектами метаболизма глюкозы посредством специальных сигнальных путей, включающих регуляторы и датчики питательных веществ, включая рецепторы лептина и инсулина, PI3K, SOCS3, SIRT1, FOXO1 и сам SF1. Более того, ВМЯ также участвует в модуляции расхода энергии в процессе термогенеза, и SF1 нейроны, по-видимому, необходимы для регуляции термогенеза, вызванного диетой [170].

Гистаминергическая система туберомамиллярного ядра заднего гипоталамуса играет особую роль в поддержании бодрствования. Эта система работает совместно с орексин/гипокретинергической системой мозга, нейроны которой располагаются в заднелатеральном гипоталамусе и перифорникальной области, рядом с гистаминергическими нейронами ТМЯ. Эти ядра частично перекрываются и образуют функциональное единство [8].

Гомеостатический контроль температуры тела необходим для выживания. Млекопитающие поддерживают температуру тела путем саморегуляции, независимо от температуры окружающей среды. Преоптическая область (ПОА) гипоталамуса, состоящая из медиального преоптического и переднего гипоталамических ядер, вместе с задним гипоталамусом регулирует температуру тела. ПОА содержит нейроны, чувствительные к локальным изменениям температуры. Они изменяют скорость своего разряда в зависимости от потепления или охлаждения ПОА [139].

Хорошо изучена эндокринная роль гипоталамуса. Супраоптическое и паравентрикулярное ядра ответственны за выработку гормонов вазопрессина и окситоцина [45]. Морфология клеток ПВЯ весьма различна: оно состоит из крупных, мелких и дистально проецирующихся нейронов. ПВЯ ответственно за

пищевое и социальное поведение, беременность и лактацию, работу щитовидной железы, а также реакцию организма на стресс. СОЯ принимает участие в регуляции водно-солевого баланса, а также в работе щитовидной железы [186, 45].

1.2.1. Дорсомедиальное ядро гипоталамуса

ДМЯ расположено билатерально в медиобазальном гипоталамусе, по обе стороны от третьего желудочка. На срезах в фронтальной проекции, оно расположено в промежуточной области между перивентрикулярной и латеральной зонами гипоталамуса и лежит непосредственно дорсально по отношению к ВМЯ [101].

ДМЯ участвует в регуляции метаболических процессов, приема пищи, питьевого поведения, секреции кортикостерона, двигательной активности и бодрствования, контроля деятельности автономной нервной системы, терморегуляции. ДМЯ, наряду с СХЯ, является важным циркадным центром в мозге млекопитающих. При этом ядро также участвует в интеграции циркадной информации из СХЯ и периферических органов для модуляции различных форм поведения и физиологических процессов [153]. ДМЯ также проявляет внутренние свойства циркадных часов [167], которые влияют на ритмы питания, а также на бодрствование и локомоторную активность [64].

ДМЯ имеет обширные внутри- и внегипоталамические связи и, таким образом, участвует в широком спектре основных функций организма, особенно в нейроэндокринном и автономном гомеостазе. В целом, связи между ДМЯ и высшими областями мозга невелики, при этом ДМЯ посылает проекции в таламическое паравентрикулярное ядро, септальную область, гиппокамп и миндалевидное тело и получает входные сигналы в основном из септальной области, префронтальной коры и субикулюма [217]. Нисходящие проекции направлены к стволу, включая околотоводопроводное серое вещество, ядро одиночного пути, к области рострально-вентролатерального продолговатого

мозга (RVLM), каудально-вентролатерального продолговатого мозга (CVLM) и ядра шва. В дополнение к различным нисходящим и восходящим проекциям, существуют обширные взаимосвязи между ядрами гипоталамуса. Например, ДМЯ имеет основные проекции ко всем ядрам в перивентрикулярной зоне, за исключением дугообразного ядра, и получает входные сигналы почти от всех основных ядер в передней, средней и задней частях гипоталамуса [217].

В то время как у грызунов ДМЯ можно разделить на отдельные субъядра и их легко различить [176], у людей они менее дифференцированы и их сложнее идентифицировать с помощью анатомических методов [28]. Компактный отдел (ДМЯк) простирается по диагонали от его вентромедиального угла и состоит из плотно упакованных мелких нейронов, которые разделяют всю структуру на дорсальный (ДМЯд) и вентральный (ДМЯв) отделы (Рисунок 1) [176].

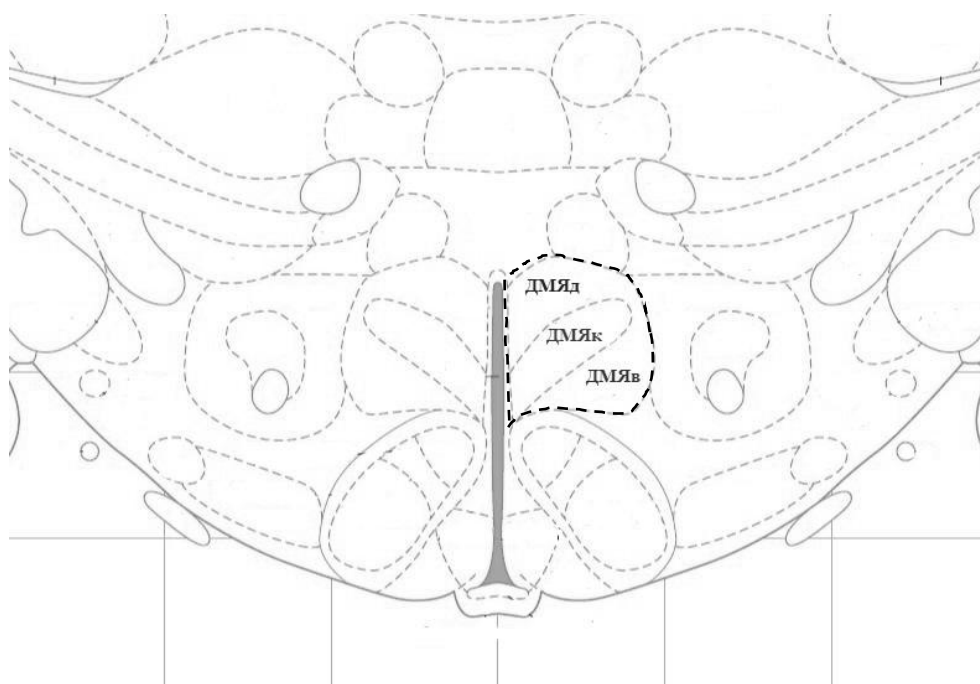


Рисунок 1 – Отделы дорсомедиального ядра гипоталамуса: ДМЯв – вентральный отдел, ДМЯд – дорсальный отдел, ДМЯк – компактный отдел (ростро-каудально: 3,12 мм от брегмы) согласно атласу мозга крысы [176].

Хотя большинство исследований рассматривают ДМЯ как единое целое, имеются ограниченные данные, указывающие на различные свойства, различающие эти три части с точки зрения молекулярных характеристик, а также

функционально. Во-первых, было показано, что ритмические изменения экспрессии часовых генов и электрическая активность на срезах являются наиболее сильными в ДМЯк [94], что позволяет предположить, что эта часть является локальным автономным осциллятором. С другой стороны, именно нейроны ДМЯв создают эфферентную связь с СХЯ [16]. ДМЯв также наиболее чувствителен к различным метаболическим состояниям и метаболически значимым сигнальным молекулам [188]. Наконец, ДМЯд посылает нисходящие связи в автономную нервную систему, регулируя термогенез и частоту сердечных сокращений [74].

ДМЯ содержит глутамат- и ГАМК-ергические нейроны, последние составляют большинство [171, 179]. Также в нейронах ДМЯ выявлены нейропептиды, включая нейропептид Y (НПУ) [37], кокаин- и амфетамин-регулируемый транскрипт (CART) [79]. В нейронах также экспрессируются различные нейропептидные рецепторы, включая рецептор лептина, меланокортина 3/4, НПУ и холецистокинина [171]. Исследования по нокдауну и сверхэкспрессии в конкретных регионах показали, что нейроны НПУ в ДМЯ, которые являются ГАМКергическими и нечувствительными к лептину [37], играют роль в стимулировании потребления пищи у крыс [119]. Однако сообщалось, что уровень экспрессии НПУ у мышей, получавших нормальную пищу, очень низок, что ставит под сомнение его физиологическую роль, в то время как при ожирении, вызванном диетой, он повышается [134]. Было обнаружено, что ГАМКергические нейроны в ДМЯв, экспрессирующие рецептор лептина, подавляют потребление пищи путем ингибирования нейронов ДЯ, которые экспрессируют AgRP [90]. Кроме того, было показано, что нейроны, экспрессирующие рецептор лептина в дорсальной области ДМЯ, играют роль в контроле расхода энергии и массы тела [189]. Галанин-экспрессирующие нейроны в ДМЯ вовлечены в баланс медленноволнового/парадоксального сна посредством различных проекций к преоптической области и ядру шва [63].

Наряду с классическими медиаторами и нейропептидами, в ДМЯ часть нейронов содержит фермент синтеза NO – нейрональную синтазу оксида азота. У

мышь в ДМЯ подавляющее большинство (85%) nNOS-ИР нейронов являются глутаматергическими и содержат везикулярный транспортер VGLUT2, и лишь 15% - транспортер ГАМК VGaT [58, 59].

Экспериментально доказана роль ДМЯ в регуляции старения [220]. Мышь с подавлением сигнального пути NF-κB в медиобазальном гипоталамусе демонстрирует увеличение продолжительности жизни [242]. Нейроны, содержащие регуляторную субъединицу 17 протеинфосфатазы 1 типа в ДМЯк, стимулируют содержание белого жира путем регуляции активности симпатической нервной системы. Хомогенетическая активация нейронов данного типа значительно улучшила связанную со старением дисфункцию белой жировой ткани, повысила физическую активность, а также увеличили продолжительность жизни у мышей [219].

1.3. Теории старения

Старение можно определить как прогрессирующую потерю функции, сопровождающуюся снижением фертильности и ростом смертности с возрастом [120]. В настоящее время существует множество теорий, объясняющих процесс старения [3, 239]. Однако ни одна из них не является всеобъемлющей.

Теории старения традиционно разделяют на стохастические (вероятностные, старение вследствие суммы неблагоприятных случайных событий) и теории запрограммированного старения (старение как действие заложенной природой, эволюцией программы). Однако при рассмотрении причин и механизмов старения наблюдается интеграция различных процессов, которые могут быть отнесены и к стохастическому, и к запрограммированному подходам. К стохастическим относят такие причины как соматические мутации, повреждения ДНК, нарушение репарации ДНК, повреждение белков, перекрестные сшивки жизненно важных макромолекул. К теориям запрограммированного старения – генетические и иммунологические теории, укорочение теломер,

нейроэндокринные и метаболические теории, свободнорадикальные и эволюционные теории [2].

1.3.1 Элевационная теория старения

Одной из наиболее интересных и глубоко разработанных теорий в геронтологии является элевационная (нейроэндокринная) теория старения, которая была предложена советским ученым В.М. Дильманом. Согласно этой теории, старение начинается с постоянного повышения порога чувствительности гипоталамуса к регуляторным сигналам, поступающим от нервной системы и желез внутренней секреции. Теория Дильмана считает, что старение и связанные с ним болезни не запрограммированы, а являются побочным продуктом реализации генетической программы онтогенеза. Поэтому, если стабилизировать состояние гомеостаза на уровне, достигаемом к окончанию развития организма то, как полагал В.М. Дильман, возможно увеличить видовые пределы жизни человека [3, 1, 6].

Существует закон постоянства внутренней среды организма, согласно которому он может существовать в условиях, когда состав его внутренней среды сохраняется в определенных, довольно узких пределах. Так как постоянство внутренней среды должно строго соблюдаться в каждый момент развития и роста организма, необходимы и специальные механизмы его поддержания – системы гомеостаза. Чтобы обеспечить потребности роста и развития организма, гомеостатические системы должны увеличивать свою мощность. То есть увеличение мощности гомеостатических систем и отклонение гомеостаза и есть развитие [7].

Закон отклонения гомеостаза распространяется на три тесно связанных между собой свойства живого организма. Это свойства, отличающие живую систему от неживой. К ним относятся способность организма к размножению, приспособлению (адаптации) и регулированию потока энергии (или обмен веществ). Рост тела, усиление защитных функций и развитие способности к

размножению достаточно наглядно характеризуют увеличение мощности энергетической, адаптационной и половой (репродуктивной) систем по мере развития организма. Таким образом, элевационная теория раскрывает роль возрастных изменений, закономерно происходящих в трех основных супергомеостатах – репродуктивном, адаптационном и метаболическом [7, 2, 4].

1.4. Изменения электрических характеристик нейронов при старении

Электрические свойства во многом определяют функции нейронов. Одним из важных параметров клетки является мембранный потенциал покоя (МПП). Согласно исследованиям, величина МПП нейронов ЦНС крыс с возрастом не меняется. Однако в некоторых типах нейронов происходит снижение возбудимости и скорости реполяризации, увеличивается длительность овершута и следовой гиперполяризации. Также при старении существенно снижается лабильность, способность генерировать частые ПД, спонтанная фоновая активность нейронов [14].

С возрастом снижается внутренняя возбудимость нейронов, о чем свидетельствует увеличение величины чувствительного к кальцию компонента постгиперполяризации (АНР) [124]. Это связывают с изменениями в регуляции внутриклеточного нейронального кальция, а именно с усилением Ca^{2+} -активируемого K^+ тока. Более того, несколько исследований также продемонстрировали связь между этими возрастными изменениями кальция и кальцийзависимыми процессами и когнитивным дефицитом у пожилых животных. Например, электрофизиологические записи отдельных нейронов у пожилых животных показали, что увеличение Ca^{2+} тока было вызвано увеличением количества каналов (в противоположность изменению функции каналов) и, что важно, что это увеличение плотности каналов коррелировало со степенью нарушения обучения, зависящего от гиппокампа [161].

Кроме того, возрастные изменения гомеостаза Ca^{2+} могут приводить к длительному Ca^{2+} ответу. Такой эффект может быть объяснен либо повышенным

притоком Ca^{2+} , либо дефицитом в системах очистки от Ca^{2+} – нарушении его буферизации. Эти процессы приводят к функциональным изменениям, т.е. изменениям в эффективности синапсов. Накопленное к настоящему времени множество данных об изменениях гомеостаза Ca^{2+} в стареющих нейронах показывает, что общая продолжительность цитоплазматических Ca^{2+} -сигналов становится больше. Вполне возможно, что эти длительные Ca^{2+} -сигналы могут оказывать локальный эксайтотоксический эффект, влияя преимущественно на наиболее активные синапсы [218].

Отдельный интерес вызывает влияние старения на отдельные субпопуляции нейронов и их синаптические контакты, которые составляют субстрат нейронной пластичности. В частности, это касается ГАМКергических нейронов и синапсов. Вызванные старением нарушения ГАМКергической системы приводят к дисбалансу процессов возбуждение/торможение. При этом наблюдается уменьшение количества тормозных синаптических контактов, частоты спонтанных тормозных постсинаптических потенциалов (ТПСП) и амплитуды токов при стимуляции ГАМК-рецепторов [193].

1.5. Морфологические изменения нейронов при старении

Множество исследований показывают изменения функций мозга, связанные со старением. Были описаны изменения размера сомы, потеря или регрессия дендритов и дендритных шипиков, а также изменения в экспрессии рецепторов нейромедиаторов в определенных нейронах.

1.5.1. Изменения числа нейронов

Часто старение связывают с уменьшением количества нейронов. Однако не все исследования подтверждают эти данные. По данным некоторых исследований преимущественная потеря нейронов наблюдается в коре, гиппокампе, базальных ганглиях и мозжечке [14, 3]. С молодого до старого возраста в разных участках

коры происходит снижение плотности нейронов от 10 до 60%. При использовании грызунов в качестве объекта исследования наблюдается большая противоречивость данных при исследовании даже одного поля коры. Это может быть связано с межвидовыми и межлинейными различиями. Исследования ствола мозга показали значительно меньшие изменения в количестве нейронов: клеточный состав большинства ядер (за исключением голубого пятна, черного вещества и некоторых других) остается неизменным до старости [14]. Поскольку некоторая часть нейронов теряются при нормальном старении, дендриты выживших соседних нейронов могут пролиферировать, регрессировать или оставаться неизменными. В случае возрастной дендритной регрессии было трудно определить, предшествует ли регрессия гибели нейронов или является следствием потери афферентного питания [87].

1.5.2. Возрастные особенности размеров и ультраструктуры нейронов

В процессе старения нейроны и их отростки уменьшаются в размерах. При этом степень изменения размеров в разных областях и даже в разных слоях коры различна. У экспериментальных животных наблюдается уменьшение размеров нейронов в соматосенсорной и слуховой коре, обонятельной луковице, гипоталамусе и мозжечке. Старение нейронов сопровождается изменениями в дендритной системе, которые несинхронно развиваются в разных отделах нервной системы. Возрастные изменения структуры ядра включают в себя изменение объема, формы и структуры ядра. Имеет место уменьшение объема ядер, увеличение их складчатости. Однако вышеуказанные изменения встречаются не во всех отделах нервной системы [14].

С возрастом происходят нарушения в энергетических и белоксинтезирующих системах. Уменьшается количество вещества Ниссля, количество РНК. Происходит редукция и фрагментация цистерн зернистого эндоплазматического ретикулума, заполнение их электроноплотным содержимым, уменьшение количества рибосом. Значительного изменения

количества и размера митохондрий не происходит. Однако с возрастом происходит изменение ультраструктуры митохондрий, что свидетельствует о метаболических нарушениях в них [14].

1.6. Биохимические изменения в нейронах

При старении наблюдается существенные изменения в концентрации некоторых нейромедиаторов. Особенно это заметно на адренергической, дофаминергической и серотонинергической системах. Возрастная динамика в этих системах характеризуется десинхронизацией уровней нейромедиаторов: в пожилом возрасте содержание норадреналина и дофамина падает, в то время как содержание серотонина остается неизменным или даже немного увеличивается [3].

В клетках нервной системы при старении может меняться состав липидов, что приводит к изменению текучести мембран. Происходит усиление свободнорадикальных процессов [3]. Важным признаком старения являются отложения липофусцина в клетках [14, 3]. В гипоталамусе наблюдается большое количество липофусцина в глиальных клетках, в то время как в нейронах его количество невелико [14].

Гормон роста (ГР) и инсулиноподобный фактор роста (ИФР)-1 регулируют развитие и функционирование клеток во всем организме. Некоторые заболевания, которые приводят к снижению физических и умственных функций, характеризуются мутациями, которые нарушают передачу сигналов ГР или ИФР-1. В течение жизни наблюдается значительное снижение как ГР, так и ИФР-1 [3, 20]. Поскольку ГР и ИФР-1 являются главными регуляторами клеточных функций, нарушение передачи сигналов ГР и ИФР-1 при старении/болезнях приводит к значительным изменениям в структуре и функциях тканей, особенно в головном мозге [20].

При старении происходят изменения экспрессии сигнального пути mTOR, в т.ч. компонентов mTORC1 и mTORC2. RICTOR является компонентом mTORC2.

Выключение RICTOR в ЦНС приводило к повышению потребления пищи и ожирению, гипергликемии натощак. Подобный фенотип также наблюдался после нокаута RICTOR, особенно в нейронах, иммунопозитивных к POMC, тогда как нокаут в нейронах, иммунопозитивных к AgRP имел минимальные эффекты. Хотя механизм, с помощью которого mTORC2 регулирует толерантность к глюкозе в POMC нейронах не ясен, мыши с выключением рецептора инсулина в нейронах демонстрировали частично сходные фенотипы с мышами, лишенными RICTOR в POMC нейронах, что указывает на критическую роль mTORC2 в регуляции метаболизма [187].

1.7. Особенности возрастных преобразований в гипоталамусе

Недавние исследования на млекопитающих показали, что гипоталамус является ключевым двунаправленным интегратором гуморальной и нейронной информации из периферических тканей, тем самым влияя на старение как в мозге, так и на «системном» уровне [197, 140].

1.7.1. Изменения электрической активности нейронов гипоталамуса при старении

Изменения электрической активности нейронов гипоталамуса изучались в супрахиазматическом ядре, преоптической области и средней (туберальной) области, включая дугообразное, вентромедиальное и дорсомедиальное ядра.

Частота импульсации нейронов, выделяющих гонадотропин-релизинг гормон (ГнРГ), в преоптической области снижается с возрастом, что может быть связано со снижением стимулирующего влияния глутамата и кисспептина на эти нейроны, и увеличением тормозного тонуса ГАМК-ергической системы. В ПОА снижение частоты разрядов старых ГнРГ-нейронов наблюдается вместе с увеличением ее вариабельности. Мембранные характеристики ГнРГ-нейронов не менялись с возрастом. Однако амплитуда следовой деполяризации, вызванной

импульсом тока продолжительностью 200 мс, была значительно меньше у пожилых животных [227].

Большинство нейронов СХЯ пожилых мышей имеют измененные ритмы мембранного потенциала и мембранной проводимости [48]. Во взрослых нейронах СХЯ циркадная модуляция активности ионных каналов необходима для контроля возбудимости мембран и генерации ритмов электрической активности. Днем ионные токи способствуют повышению возбудимости мембран и более высокой частоте импульсации, а ночью способствуют гиперполяризации мембраны и снижению возбудимости [96].

В нейронах СХЯ старых мышей по сравнению с молодыми животными наблюдался значительно более деполяризованный МПП и более высокое входное сопротивление в ночное время, отсутствие циркадной модуляции мембранного потенциала и суточного ритма входного сопротивления, а также увеличенный потенциал действия и сниженная амплитуда последующей гиперполяризации. В течение дня частота разрядов в старых нейронах была значительно ниже по сравнению с молодыми нейронами. Разница в частоте возбуждения нейронов днем и ночью, наблюдаемая в молодых клетках, отсутствовала в старых. Емкость клеток нейронов СХЯ была значительно снижена у старых по сравнению с молодыми животными. С возрастом количество глутаматергических волокон в ретиногипоталамическом тракте уменьшается, однако амплитуда и частота возбуждающих постсинаптических токов увеличиваются [83, 84].

В ДМЯ и ВМЯ частота импульсации нейронов с возрастом снижается [227, 157, 159]. РОМС нейроны ДЯ у мышей в возрасте 6 месяцев и старше имели более гиперполяризованный МПП, более низкую частоту импульсации, а также более низкое входное сопротивление по сравнению с РОМС-нейронами молодых мышей в возрасте 1 месяца. Было показано, что усиление передачи сигналов mTOR вызывает подавление работы РОМС нейронов. Активность mTOR значительно повышена в РОМС нейронах пожилых мышей по сравнению с молодыми. Удаление негативного регулятора mTOR в РОМС нейронах приводит к гипертрофии их сомы, гиперполяризации мембранного потенциала покоя и

снижению возбудимости. Также наблюдается значительное увеличение общей проводимости АТФ-чувствительного калиевого канала (КАТР). Нейроны РОМС старых мышей, получавших ингибитор mTOR рапамицин, были более возбудимыми, имели сниженную активность канала КАТР и более деполяризованный мембранный потенциал покоя [234].

В отличие от РОМС-нейронов, орексигенные нейроны пожилых мышей гипервозбудимы, в них наблюдается спонтанное возбуждение, а мембранный потенциал покоя более деполяризован. Эти нейроны демонстрировали более низкую экспрессию каналов KCNQ2 и нарушенный M-ток, опосредованный KCNQ2/3 каналами, что приводило к повышенной возбудимости старых нейронов [138].

1.7.2. Морфологические изменения в ядрах гипоталамуса при старении

С возрастом выявлена тенденция к увеличению объема гипоталамической области и, как следствие, к уменьшению плотности нейронов. В отношении ядер гипоталамуса, в ряде проведенных исследований наблюдается потеря нейронов медиальной преоптической области, передней гипоталамической области и дугообразного ядра. Уменьшение числа нейронов из-за старения в этих трех областях колебалось от 23 до 50%. Никакой потери нейронов из-за старения не наблюдалось в СОЯ, ПВЯ, ВМЯ и ДМЯ [108]. Другие исследования показали значительное уменьшение числа нейронов на единицу площади в вентромедиальных и дугообразных ядрах [196].

Размеры нейронов ряда гипоталамических ядер увеличиваются при старении, например РОМС-нейроны мыши [234]. У человека у представителей обоих полов увеличиваются также размеры нейронов, содержащих кисспептин и нейрокинин В [107]. В СОЯ крыс средний объем ядер нейросекреторных клеток достоверно снижается при старении как за счет уменьшения относительного количества нейронов с крупными ядрами, так и в связи с появлением большого числа малоактивных нейронов с мелкими ядрами [14, 143]. Размер ядрышек

нейронов СОЯ увеличивался в возрасте от 3 до 12 месяцев, отчасти из-за слияния ядрышек, и не менялся в возрасте от 12 до 32 месяцев, что указывает на сохранение общей клеточной функции в пожилом возрасте [87].

СОЯ представляет собой модельную систему, в которой отсутствует возрастная потеря нейронов, но имеется возрастная потеря афферентов. В нейросекреторных клетках гипоталамуса на начальном этапе старения наблюдается укорочение дендритов. В дальнейшем происходит уменьшение ветвления дендритов, их набухание, укорочение и редукция шипиков [143, 14, 87, 3].

1.7.3. Изменения биологических ритмов

Старение характеризуется изменением биологических ритмов, что приводит к нарушению режима сна и бодрствования и снижению способности адаптироваться к изменениям условий освещенности окружающей среды [55, 22, 83, 62, 49]. У пожилых людей наблюдаются аномальные, фрагментированные циклы сна и бодрствования [231]. Последние данные экспериментов на модельных организмах, исследований экспрессии генов и клинических испытаний показывают, что дисфункции циркадных часов способствуют старению и возрастным патологиям, тем самым предполагая функциональную связь между циркадными часами и возрастным снижением функций мозга [121]. Влияние возраста на систему циркадных часов широко изучалось на грызунах. Были показаны нарушения ритма в виде повышенной фрагментации и снижения амплитуды ритма суточной двигательной активности, а также снижение точности начала фазы активности. Также исследования на грызунах и приматах показали, что чувствительность системы циркадного времени к кратковременным манипуляциям световым воздействием может снижаться с возрастом [22, 246]. Кроме того, с возрастом модифицируется циркадный ритм нейропептидов в СХЯ. Эти изменения могут влиять на способность СХЯ передавать ритмическую информацию к другим нервным участкам-мишеням и тем самым изменять

экспрессию некоторых биологических ритмов [55]. Например, экспрессия генов нейронов, выделяющих вазоинтестинальный полипептид (ВИП), основного компонента циркадной колебательной системы, нарушается в мозге старых крыс. Более того, у старых крыс не было выявлено существенных различий в уровне мРНК ВИП между светлой и темновой фазами [116]. Также было обнаружено возрастное снижение пиковых уровней мелатонина [246]. Недавние исследования обнаружили доказательства возрастных изменений в циркадной регуляции калиевых токов; эти изменения предположительно приводят к уменьшению амплитуды электрического ритма СХЯ [83].

1.7.4. Гипоталамическое микровоспаление

В процессе старения гипоталамус атипично подвергается активации провоспалительной сигнализации, что приводит к хроническому и стабильному фоновому воспалению, называемому «гипоталамическим микровоспалением». За последнее десятилетие исследований был достигнут прогресс в установлении причинно-следственной связи этого воспаления гипоталамуса с механизмом старения, а также с метаболическим синдромом, что способствует развитию теории «гипоталамического микровоспаления». В целом общепризнано, что микровоспаление гипоталамуса возникает на ранних стадиях старения и метаболического синдрома, развивается многогранно и прогрессирует вместе с прогрессированием заболевания, в то время как ингибирование ключевых воспалительных компонентов в гипоталамусе имеет широкий спектр эффектов в противодействии этим нарушениям [51]. Избыточное питание связано с хроническим метаболическим воспалением тканей. Гипоталамическая программа IKK β /NF- κ B представляет собой общий нейронный механизм энергетического дисбаланса, лежащего в основе ожирения, и позволяют предположить, что подавление гипоталамического IKK β /NF- κ B может представлять собой стратегию борьбы с ожирением и связанными с ним заболеваниями [243]. Воспалительный процесс в гипоталамусе может привести к

усилению глутаматергической передачи, которая вызывает гипертонию, являющейся компонентом метаболического синдрома [238].

1.8. Нейрохимические изменения при старении

Поскольку было установлено, что старение не связано с массивной потерей нейронов, как считалось в середине 20-го века, научный интерес был обращен на влияние старения на отдельные субпопуляции нейронов, их нейромедиаторный состав и их синаптические контакты [193]. В процессе возрастного развития изменяются цитохимические характеристики нейронов центральной и периферической нервной системы. В частности, происходят изменения содержания кальций-связывающих белков кальбиндина (КБ) и кальренина (КР), нейропептидов, в том числе нейропептида Y (НПУ) и соматостатина (СОМ), а также синтазы оксида азота (nNOS) [145, 148]. При старении происходят изменения экспрессии различных гипоталамических нейротрансмиттеров и гормонов [118].

1.8.1. Кальций-связывающие белки

Клеточные механизмы, регулирующие гомеостаз свободного Ca^{2+} в цитозоле, играют большую роль в старении мозга. Экспрессия различных Ca^{2+} -связывающих белков снижена в некоторых областях мозга старых животных. Ca^{2+} -связывающие белки принято разделять на Ca^{2+} -сенсоры и Ca^{2+} -буферы. Сенсоры претерпевают конформационные изменения при связывании Ca^{2+} и запускают опосредованные Ca^{2+} нисходящие сигналы. Буферы регулируют внутриклеточные колебания Ca^{2+} [18, 50, 202]. Кальбиндин D28K (КБ) и кальренин (КР) рассматриваются как «быстрые» буферы, также они могут функционировать как сенсоры Ca^{2+} [33, 202, 200, 203].

КБ и КР обнаруживаются в отдельных группах нейронов центральной и периферической нервной систем [106, 199, 201, 10]. В гипоталамусе КБ и КР

наблюдаются в медиальной преоптической области, паравентрикулярном, супрахиазматическом, супраоптическом, дугообразном, вентромедиальном, дорсомедиальном ядрах, латеральном гипоталамусе и мамиллярных телах [56, 89, 88, 32, 78, 39, 160].

Предполагается, что кальций-связывающие белки играют важную роль в нейропротекции. Кальбиндин защищает клетки от гибели при глутаматной эксайтотоксичности. В то время как общий уровень кальбиндина в гиппокампе и черной субстанции снижается при болезни Паркинсона, клетки черной субстанции, которые экспрессируют кальбиндин, относительно не повреждаются. У пациентов с болезнью Хантингтона наблюдается значительное и специфическое снижение уровня кальбиндина в хвостатом ядре и скорлупе [210].

Наблюдается нарушение молекулярных механизмов, регулирующих внутриклеточный уровень Ca^{2+} в старых нейронах [222]. Тем не менее, существуют противоречивые данные об экспрессии КБ и КР в головном мозге во время старения. Согласно некоторым исследованиям, степень экспрессии КБ и КР была существенно снижена в гиппокампе, но не в мозжечке и коре головного мозга пожилых грызунов [224, 240]. Ahn и соавт. (2017) обнаружили снижение КБ и увеличение экспрессии КР в коре головного мозга пожилых крыс и мышей по сравнению с молодыми животными.

1.8.1.1. Роль кальция в клетке

Основным внутриклеточным мессенджером, который опосредует многие физиологические реакции нейронов на химическую и электрическую стимуляцию, является Ca^{2+} . Внутриклеточная кальциевая сигнальная система участвует в регуляции широкого спектра физиологических реакций. При правильном контроле потоки Ca^{2+} через плазматическую мембрану и между внутриклеточными компартментами играют критическую роль в фундаментальных функциях нейронов, включая регуляцию роста нейритов и синаптогенеза, синаптическую передачу и пластичность, а также выживание

клеток. Эта система использует трансмембранный градиент для ионов Ca^{2+} , который намного превышает трансмембранные градиенты для всех других физиологически значимых ионов. Даже незначительные изменения проницаемости мембраны для ионов Ca^{2+} приводят к огромным изменениям концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, обеспечивая сигнальную систему. Приток Ca^{2+} через потенциал-зависимые и лиганд-зависимые каналы в плазматической мембране является критическим сигналом для высвобождения нейротрансмиттеров из пресинаптических терминалов и для реакций постсинаптического нейрона [222, 149].

Различные внутриклеточные ферменты связывают ионы Ca^{2+} с различным сродством. Эти ферменты действуют как эффекторы сигнальной системы, поскольку при связывании Ca^{2+} они изменяют свою каталитическую активность. В нервной системе лучшим примером роли ионов Ca^{2+} является синаптическая передача. Кальций, поступающий в пресинаптические окончания после деполяризации, вызванной появлением потенциала действия, запускает слияние везикул нейромедиатора с плазмалеммой, что позволяет осуществлять химическую передачу нервного импульса. Тем не менее, это поступление кальция может быть токсичным, и при определенных условиях нейроны, перегруженные Ca^{2+} , погибают. Очевидно, что это не единственные роли Ca^{2+} в нервных клетках, и изменения в Ca^{2+} токе регулируют многие другие функции нейронов (например, возбудимость, метаболизм и экспрессию генов и т. д.) [218, 149].

1.8.1.2. Участие кальция в старении

Кальциевая гипотеза старения была выдвинута в 1982 году и основывалась исключительно на токсическом воздействии избытка Ca^{2+} на нервные клетки. Основная идея гипотезы была проста: она постулировала, что недостаточная эффективность гомеостатических систем Ca^{2+} в старых нейронах вызывает хроническое повышение уровня Ca^{2+} тока, что приводит к синаптической дисфункции, нарушению пластичности и в конечном итоге дегенерации

нейронов. В конце концов, эта хроническая дисрегуляция Ca^{2+} тока приводит, согласно кальциевой гипотезе, к гибели нейронов [218].

Во время нормальной физиологической активности внутриклеточная концентрация Ca^{2+} увеличивается лишь временно (от секунд до нескольких минут) и не оказывает неблагоприятного воздействия на нейроны. Ca^{2+} удаляется из цитоплазмы активностью $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника плазматической мембраны, Ca^{2+} -АТФаз и Ca^{2+} -связывающих белков плазматической мембраны и эндоплазматического ретикулума (например кальбиндин и парвальбумин). Однако при патологических состояниях и, что более коварно, при нормальном старении способность нейронов контролировать потоки Ca^{2+} и восстанавливаться после нагрузки Ca^{2+} нарушается. Окислительный стресс является важным фактором, вовлеченным в нарушение нейронального гомеостаза Ca^{2+} и гибель нейронов [149].

1.8.1.3. Изменения содержания кальбиндина и кальретинина с возрастом

Нейроны, содержащие кальбиндин-D28k и кальретинин, являются химически различными подгруппами гамкергических интернейронов, а белки известны как высокоаффинные цитозольные кальций (Ca^{2+}) связывающие белки, которые регулируют концентрацию свободного Ca^{2+} в цитозоле внутри нейронов [17]. За счет буферизации внутриклеточных нагрузок Ca^{2+} , Ca^{2+} -связывающие белки, такие как КБ может служить эндогенным антиэксцитотоксическим белком [149].

Процент нейронов содержащих КБ по данным исследований снижался на 23% во всех слоях соматосенсорной коры у взрослых крыс по сравнению с молодыми крысами. У пожилых крыс среднее процентное содержание КБ-иммунореактивных нейронов во всех слоях было значительно снижено на 42 и 29% по сравнению с молодыми и взрослыми крысами соответственно. Кроме того, предыдущие исследования продемонстрировали значительное связанное с

возрастом снижение мРНК КБ и иммунореактивности к КБ в полосатом теле и гиппокампе грызунов в процессе старения [17].

У взрослых крыс среднее процентное количество иммунореактивных к КР нейронов значительно увеличилось во всех слоях на 70% по сравнению с молодыми крысами. У пожилых крыс среднее процентное количество КР-иммунореактивных нейронов было значительно снижено на 35% по сравнению со взрослыми крысами; однако оно было значительно увеличено на 35% по сравнению с молодыми крысами. Этот вывод аналогичен предыдущему исследованию, которое показало, что количество КР-иммунореактивных нейронов значительно уменьшилось в височных областях, включая кору слуховых ассоциаций, среднюю височную кору и нижнюю височную кору головного мозга пожилых людей по сравнению с молодыми. Кроме того, сообщалось, что количество КР-иммунореактивных нейронов и уровни белка КР были заметно снижены в полосатом теле и гиппокампе пожилых грызунов [17].

1.8.2. Нейрональная синтаза оксида азота

Оксид азота (NO) – это свободная газообразная сигнальная молекула, которая имеет решающее значение для ряда клеточных процессов и участвует в регуляции сердечно-сосудистой, нервной и иммунной систем. NO вырабатывается ферментом синтазой оксида азота (NOS) в реакции, которая превращает аминокислоту L-аргинин в L-цитрулин [141, 24]. NO является посредником, который модулирует функцию нейронов. Использование доноров NO и ингибиторов NO-синтазы в качестве фармакологического инструмента показало, что этот свободный радикал, вероятно, участвует в регуляции возбудимости и возбуждения, в долговременной потенциации и длительной депрессии, а также в процессах памяти. Более того, NO модулирует высвобождение нейромедиаторов. Исследования *in vivo* и *in vitro* показали, что во всех исследованных структурах мозга эндогенный NO модулирует высвобождение ряда нейромедиаторов, таких как ацетилхолин, катехоламины, возбуждающие и тормозные аминокислоты,

серотонин, гистамин и аденозин. В большинстве случаев повышенный уровень NO в тканях увеличивает высвобождение нейротрансмиттеров, хотя наблюдаются и эффекты снижения [182]. Хотя NO является важнейшей молекулой, обеспечивающей синаптическую пластичность и передачу сигналов нейронами, при выработке избыточного количества NO он превращается из физиологического нейромодулятора в нейротоксический фактор [247].

Существует три типа NOS: нейрональная синтаза оксида азота (nNOS), эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS) и индуцибельная синтаза оксида азота (iNOS). Из трех форм NOS в настоящей работе рассмотрена функция nNOS. Нейрональная NOS экспрессируется в большом количестве в нейронах центральной и периферической нервной системы, и меньшем в астроцитах и нейрональных стволовых клетках. В течение последних нескольких лет все большее число исследований демонстрировало важность nNOS в различных синаптических сигнальных событиях. nNOS участвует в модулировании физиологических функций, таких как обучение, память и нейрогенез, а также участвует в ряде заболеваний человека [247, 9].

1.8.2.1. Роль оксида азота в центральной нервной системе

За последние годы было продемонстрировано, что нейрогенез происходит и в нервной системе взрослого человека. Нейрогенез является важным явлением, участвующим в процессе развития мозга, и он также может быть вызван после травм головного мозга, таких как инсульт или судороги. В головном мозге взрослого человека были идентифицированы два основных участка нейрогенеза. Они включают субвентрикулярную и субгранулярную зоны зубчатой извилины. Процесс нейрогенеза состоит из трех основных этапов: пролиферации предшественников, миграции, дифференцировки, интеграции и выживания. Интересно, что было продемонстрировано, что субвентрикулярная зона зубчатой извилины окружена nNOS-позитивными нейронами, и клетки, экспрессирующие nNOS, также были идентифицированы в нейрональных предшественниках

зубчатой извилины. Эти данные свидетельствуют о том, что nNOS могут принимать участие в регуляции нейрогенеза [247].

Долговременная потенция (LTP) – это форма синаптической пластичности, которая является предполагаемым механизмом формирования памяти в гиппокампе. Было показано, что NO играет важную роль в LTP. Более того, существует впечатляющее количество доказательств того, что ингибирование NOS ухудшает обучение и/или память, хотя в некоторых исследованиях не удалось обнаружить какого-либо влияния на обучение и/или память [247].

Теория эксайтотоксичности, впервые предложенная Оли в 1971 году для выяснения патофизиологии ишемии головного мозга, является общепринятой. Она определяется как чрезмерное синаптическое высвобождение глутамата или чрезмерная стимуляция его мембранных рецепторов, приводящая к повреждению или гибели нейронов. Связываясь с четырьмя основными типами рецепторов: метаботропными рецепторами, NMDA-рецепторами, рецепторами альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA) и каинатными рецепторами, глутамат начинает свое действие постсинаптически. Нейрональная NO синтаза расположена в нейронах преимущественно на постсинаптической мембране и ассоциирована с глутаматными NMDA рецепторами. Нормальная работа комплекса NMDA/nNOS обеспечивает приток ионов кальция, активацию фермента и образование NO. При патологии нейрональная синтаза NO способна производить супероксид-анион, который при его взаимодействии с NO образует пероксинитрит, который является мощным окислителем и наделен свойствами как сигнальной молекулы, так и токсичного соединения. Гиперпродукция NO приводит к NO-индуцированному повреждению нейронов и нарушению центральной регуляции физиологических процессов и нейродегенерации [9].

Активация NMDA-рецептора в значительной степени опосредует эксайтотоксичность глутамата и повреждение нейронов. Чрезмерная стимуляция NMDA-рецепторов приводит к перегрузке клетки Ca^{2+} и, следовательно, активации Ca^{2+} -чувствительных ферментов. nNOS, Ca^{2+} -чувствительные

ферменты, играют важную роль в опосредовании эксайтотоксичности. В первичных культурах кортикальных нейронов удаление nNOS с помощью трансгенной технологии делает эти нейроны устойчивыми к нейротоксичности NMDA. Кроме того, культуры нейронов, полученные от трансгенных мышей с нулевым уровнем nNOS, в основном устойчивы к кислородно-глюкозной депривации по сравнению с культурами дикого типа. Эти исследования *in vitro* показывают, что NO, полученный из nNOS, является основным источником нейротоксичности для нейронов [247].

1.8.2.2. Роль оксида азота в гипоталамусе

Нейрональный NO вырабатывается в нескольких областях и ядрах гипоталамуса, включая ПОА, СОЯ, ПВЯ, ДЯ, ВМЯ и ДМЯ, субфорникальный орган и вентральное преаммилярное ядро [69, 95, 58, 59]. nNOS в значительной степени ограничен областями гипоталамуса, участвующими в контроле энергетического гомеостаза и размножения [57]. NO играет роль в центральной гормональной регуляции овуляции и является ключевой молекулой в предовуляторном выбросе гонадотропин-рилизинг-гормона и лютеинизирующего гормона [164, 40]. Считается, что основное воздействие NO на нейроны, выделяющие ГнРГ способствует синхронной активности между ними [58]. Популяция нейронов nNOS в ВМЯ играет важную роль в половом поведении, опосредованном нейронами кисспептина [100]. Нейроны, экспрессирующие nNOS в ВМЯ, участвуют в контроле гомеостаза глюкозы [81]. В ПВЯ активность nNOS модулирует аппетит, регулируя воздействие на потребление пищи и двигательную активность [177]. Экспрессия рецепторов лептина в нейронах nNOS имеет решающее значение для интеграции метаболических сигналов, и нейроны nNOS также передают изменения уровней лептина нейронам ГнРГ в гипоталамусе [137].

1.8.2.3. Изменения оксида азота с возрастом

С возрастом происходит усиление регуляции nNOS [86, 225, 34, 117]. Имеются лишь ограниченные данные об экспрессии nNOS в нейронах гипоталамуса во время старения. Ядра гипоталамуса ДЯ, ВМЯ и ДМЯ играют решающую роль в организации вегетативных, репродуктивных и вызванных страхом поведенческих реакций. Существует гипотеза, что нейроны в туберальной области гипоталамуса контролируют не только энергетический баланс и гомеостаз глюкозы, но и продолжительность жизни, в основном контролируя метаболизм глюкозы во всем организме (частично непосредственно через вегетативную нервную систему, частично путем регуляции пути ГР/ИФР-1 и секреции инсулина) [68, 155].

1.9. Особенности нейротрансмиттерного состава при старении

1.9.1. Гамма-аминомасляная кислота и глутамат

Важнейшим тормозным медиатором в ЦНС является ГАМК, а возбуждающим – глутамат. В разных отделах головного мозга при старении наблюдается дисрегуляция ГАМК и глутаматергических систем, приводящая к разнонаправленным изменениям содержания ГАМК и глутамата и дисбалансу процессов возбуждение/торможение [102, 125, 130, 136]. Изменение баланса возбуждение/торможение (Е/И) наблюдаются при различных нейродегенеративных заболеваниях, расстройствах аутистического спектра, а также при старении [191, 135, 47, 208].

Во многих структурах мозга можно наблюдать возрастную регрессию, потерю и дисфункцию тормозных синапсов и ГАМК-ергических нейронов в гиппокампе, префронтальной коре, а также снижение плотности гамкергических связей было обнаружено в лобной и теменной коре. Несколько исследований продемонстрировали снижение частоты спонтанных ТПСП, а также снижение

амплитуды и частоты токов, опосредованных ГАМКА-рецепторами, в гиппокампе у старых животных [193].

Данные свидетельствуют, что нейроны ДЯ и ДМЯ содержат медиаторы глутамат и ГАМК, при этом доля последнего преобладает [226]. В ВМЯ ядре преобладают глутаматергические нейроны, а доля ГАМК-ергических — невелика [233]. Примечательно, что подавляющее большинство эффектов лептина против ожирения опосредовано ГАМК-ергическими нейронами; глутаматергические нейроны играют лишь незначительную роль. Лептин, воздействуя непосредственно на пресинаптические ГАМК-ергические нейроны, многие из которых, по-видимому, не экспрессируют AgRP, снижает тормозной тон постсинаптических нейронов POMC. Поскольку нейроны POMC предотвращают ожирение, их растормаживание действием лептина на пресинаптические ГАМК-ергические нейроны, вероятно, опосредует, по крайней мере частично, эффекты лептина против ожирения [226].

Одной из отличительных черт старения является снижение когнитивных функций. Исследования последних нескольких лет продемонстрировали ухудшение экспрессии и функции субъединицы рецептора NMDA с возрастом. Однако прямая связь между нарушением функции памяти и снижением количества NMDA-рецепторов до сих пор неоднозначна. Недавние исследования указывают на связь между возрастной гипофункцией NMDA-рецепторов и ухудшением памяти и предоставляют доказательства того, что возрастной усиленный окислительный стресс может способствовать изменениям, связанным со старением [125].

Имеются данные, свидетельствующие о том, что система ГАМК в ДЯ, где экспрессируются орексигенный нейропептид Y и агутин родственный пептид, а также анорексигенный проопиомеланокортин, играет важную роль в энергетическом балансе. Удаление рецепторов ГАМКВ в нейронах POMC у мышей-самцов на диете с высоким содержанием жиров приводит к ожирению, резистентности к инсулину и воспалению гипоталамуса. Более того, снижение экспрессии POMC у мышей с отсутствующими рецепторами ГАМКВ с

ожирением позволяет предположить, что регуляция экспрессии РОМС через рецепторы ГАМКВ необходима для правильного энергетического баланса [110].

1.9.2. Соматостатин

Соматостатин (СОМ) является одновременно нейрогормоном и нейромедиатором, который существует в двух биологически активных формах, содержащих 14 и 28 аминокислот [127]. СОМ участвует в контроле различных физиологических процессов с помощью связанных с G-белком рецепторов (GPCR) пяти подтипов: sst1-sst5 [175, 127]. СОМ ингибирует высвобождение гормона роста гипофиза, гипоталамического соматолиберина и гормонов желудочно-кишечного тракта, а также регулирует высвобождение кортиколиберина, норадреналина и самого СОМ в гипоталамусе [127, 207].

Количество СОМ-ИР нейронов снижается в соматосенсорной и моторной коре головного мозга пожилых крыс, а также в слуховой коре человека, начиная со среднего возраста. Избирательная потеря клеток СОМ также была показана в гиппокампе крыс. Более того, более низкие уровни мРНК для СОМ наблюдались в лобной, височной, двигательной, зрительной и соматосенсорной коре и гиппокампе приматов. Имеются данные об изменениях в соматостатинергической системе при депрессии, шизофрении, биполярном расстройстве и болезни Альцгеймера [193].

В гипоталамусе большинство нейронов, содержащих СОМ, расположены в передней части ПВЯ. СОМ также встречается, хотя и с меньшей плотностью, в СХЯ, ДЯ и ВМЯ гипоталамуса [126, 215, 248]. СОМ-иммунопозитивные нейроны в гипоталамусе крыс и овец совместно экспрессируют рецепторы лептина [127]. Лептин и некоторые другие гормоны играют противоположные роли в потреблении пищи, ожирении и расходовании энергии [29]. СОМ нейроны в ПОА и ДЯ синаптически связаны с нейронами, экспрессирующими кисспептин, который является регулятором репродуктивной системы [185, 76].

Согласно литературным данным, уровень соматолиберина в среднем возвышении у пожилых крыс снижался, в то время как уровень соматостатина в среднем возвышении, а также уровни соматолиберина и соматостатина в клеточных телах оставались неизменными. Было обнаружено, что индуцированное соматостатином ингибирование соматотропина было сенсibilизировано у пожилых крыс, что указывает на возможную причину возрастного снижения уровня соматотропина в плазме крови [118].

1.9.3. Нейропептид Y

Одним из широко распространенных в центральной и периферической нервной системе пептидов является нейропептид Y. НPY состоит из 36 аминокислотных остатков. Он получил свое название по COOH концу, на котором находится молекула тирозина (tYrosine). Всего в состав молекулы НPY входят пять тирозиновых остатков. Нейропептид Y относится к семейству панкреатических полипептидов, к которым принадлежат панкреатический полипептид (PP), НPY, а также пептид YY, содержащий тирозин в COOH и NH₂ концевых участках [5, 25, 13]. Действие НPY на периферические органы-мишени преимущественно реализуется через постсинаптические Y1R, Y5R и пресинаптические Y2R рецепторы [25, 152, 229].

НPY и его рецепторы играют исключительно разнообразную роль в нервной системе, включая регуляцию насыщения, эмоционального состояния, сосудистого тонуса, гастроинтестинальной секреции [150, 25, 184, 105]. НPY представляет собой мощный гипоталамический орексигенный пептид. В гипоталамусе НPY преимущественно экспрессируется в ДЯ и ДМЯ и играет ключевую роль в регуляции потребления пищи и массы тела. Нейроны ДЯ имеют гормональные рецепторы и чувствительны к лептину, инсулину и грелину. Нейроны POMC/CART активируются лептином и инсулином, а клетки НPY/AGRP стимулируются грелином. Рецептор к НPY Y1 (Y1R) экспрессируется в ядрах гипоталамуса, участвующих в регуляции пищевого

поведения и энергетического баланса, и играет решающую роль в контроле энергетического гомеостаза. Центральное введение НПУ через интрацеребровентрикулярную или внутригипоталамическую инъекцию вызывает значительное увеличение потребления пищи и массы тела, а при длительном введении может в конечном итоге привести к ожирению [36, 151, 37]. Роль гипоталамического Y1R в генетическом ожирении также была подтверждена наблюдением, что истощение гена *Npy1r* уменьшает гиперфагию и частично корректирует синдром ожирения у мышей *ob/ob* [181].

Роль НПУ дугообразного ядра в регулировании энергетического баланса хорошо изучена. ДЯ содержит две различные популяции нейронов: орексигенные НПУ/AgRP-нейроны и анорексигенные POMC-нейроны. Оба типа нейронов содержат рецепторы к лептину [151, 213]. Лептин – гормон, вырабатываемый жировой тканью, регулирует энергетический гомеостаз, нейроэндокринную функцию, обмен веществ, иммунную функцию и другие системы посредством воздействия на центральную нервную систему и периферические ткани [174]. Лептин воздействует на нейроны ДЯ, снижая экспрессию гена *Npy/AgRP* и повышая экспрессию гена *Pomc*. В базальном состоянии анаболические пути (нейроны, содержащие НПУ/AgRP), которые стимулируют потребление пищи и снижают энергозатраты, сильно подавляются в ответ на физиологические концентрации лептина, тогда как катаболические пути стимулируются для предотвращения чрезмерного увеличения веса. В свою очередь, снижение энергетического баланса, связанное с низким уровнем циркулирующего лептина, активирует анаболические пути и подавляет катаболические, и эта регуляция необходима для активной защиты от дефицита жировых отложений. Анатомически нейроны ДЯ проецируются в ПВЯ и ЛГ, воздействуя на локальные нейроны и регулируя общий баланс между потреблением пищи и расходом энергии [151].

Данные о сверхэкспрессии или индукции НПУ в ДМЯ у животных с повышенной потребностью в энергии и в некоторых моделях ожирения у грызунов указывают на роль НПУ ДМЯ в поддержании энергетического

гомеостаза. В подтверждение этой точки зрения, опосредованная аденоассоциированным вирусом сверхэкспрессия НПУ в ДМЯ вызывает увеличение потребления пищи и массы тела и усугубляет гиперфагию и ожирение, вызванные диетой с высоким содержанием жиров. Снижение уровня НПУ в ДМЯ также предотвращает гиперфагию, вызванную диетой с высоким содержанием жиров, ожирение и нарушение гомеостаза глюкозы [36]. Нейроны, экспрессирующие НПУ в ДМЯ, были обнаружены уже давно. Также сообщалось об изменениях экспрессии гена *Npy* в ДМЯ на различных моделях ожирения у грызунов. Данные свидетельствуют о том, что регуляция или контроль экспрессии гена *Npy* в ДЯ и ДМЯ различаются. В то время как в ДЯ НПУ находится под контролем циркулирующего лептина, регуляция НПУ в ДМЯ от него не зависит, так как нейроны ДМЯ не содержат рецепторов к лептину [36, 151]. Экспрессия гена *Npy* в ДМЯ регулируется мозговым холецистокинином (ХЦК) и другими молекулами, которые еще предстоит идентифицировать. Определение экспрессии генов также показало, что экспрессия гена *Npy* повышается в ДЯ в ответ на острую нехватку пищи, когда уровни циркулирующего лептина значительно снижаются, тогда как экспрессия в ДМЯ *Npy* значительно повышается только у крыс с хроническим ограничением в пище [36]. Детальное изучение действия НПУ ДМЯ показывает, что он специфически влияет на объем ночного приема пищи и оказывает ингибирующее действие на сигналы насыщения во время приема пищи. Кроме того, НПУ ДМЯ модулирует расход энергии, вероятно, влияя на образование бурых адипоцитов и термогенную активность. В целом, недавние результаты дают четкие доказательства, демонстрирующие критическую роль НПУ ДМЯ в контроле энергетического баланса, а также подразумевают потенциальную роль НПУ ДМЯ в поддержании гомеостаза глюкозы [36].

Недавние исследования показывают, что как нейроны ДЯ, так и нейроны ДМЯ непосредственно контролируют расход энергии, модулируя симпатическую активность посредством активации рецепторов γ_1 , локализованных на нейронах, продуцирующих тирозингидроксилазу в ПВЯ [151].

При старении в лобной коре, полосатом теле и гипоталамусе наблюдалось снижение содержания НПУ [122]. Кроме того, в ДЯ вызванное голоданием увеличение мРНК нейропептида Y и снижение мРНК проопиомеланокортина были меньше у крыс среднего возраста, чем у молодых крыс [114].

Нарушение аутофагии является основным признаком старения, и любое вмешательство, которое усиливает аутофагию, потенциально может замедлить старение. НПУ, являющийся одним из основных нейропептидов, присутствующих в гипоталамусе, стимулирует аутофагию в гипоталамусе грызунов за счет активации рецепторов НПУ Y1 и Y5, и этот эффект тесно связан с согласованной активацией сигнальных путей PI3K, MEK/ERK и PKA. Было показано, что у пожилых животных аутофагия и уровень НПУ в гипоталамусе снижается [23].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Экспериментальные животные

Наиболее часто используемыми лабораторными животными, в частности, при исследовании нервной системы, являются крысы. Крыса используется многими исследователями для выявления морфологических и функциональных особенностей узлов симпатической нервной системы. Исследование возрастного развития автономной нервной системы также в большой степени проводится на этих животных.

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 групп: 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. Все животные содержались в акриловых клетках с деревянными опилками в акклиматизированном помещении (цикл свет/темнота 12/12 ч; $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$) со свободным доступом к пище и воде. Исследование проводилось с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ № 775 от 12.08.1977 г. МЗ СССР). На проведение исследования получено разрешение Этического комитета Ярославского государственного медицинского университета (№ 41 от 22.10.2020 г.).

2.2. Электрофизиологические методы исследования

2.2.1. Регистрация и анализ фоновой активности нейронов дорсомедиального ядра гипоталамуса при старении

Проводился анализ фоновой электрической активности в нейронах ДМЯ гипоталамуса у наркотизированных животных при самостоятельном дыхании. Крыс анестезировали уретаном (1,3 г/кг) и фиксировали в стереотаксической раме (RWD, Китай). Была произведена трепанация черепа над проекцией ДМЯ. Внеклеточные записи проводили с помощью одного вольфрамового микроэлектрода (диаметр наконечника 2-3 мкм, импеданс 1 МОм, Microprobes, MD, США), вставленного вертикально в левое ДМЯ гипоталамуса согласно координатам атласа мозга крысы [176]: ростро-каудальный 3,0-3,5 мм от bregma; медиально-латеральный 0,3-0,5 мм; дорсально-вентральный 8,1–8,4 мм (молодые), 8,3–8,6 мм (взрослые и старые) (Рисунок 2) с помощью одноосного масляного гидравлического микроманипулятора MO-10 (Narishige, Япония).

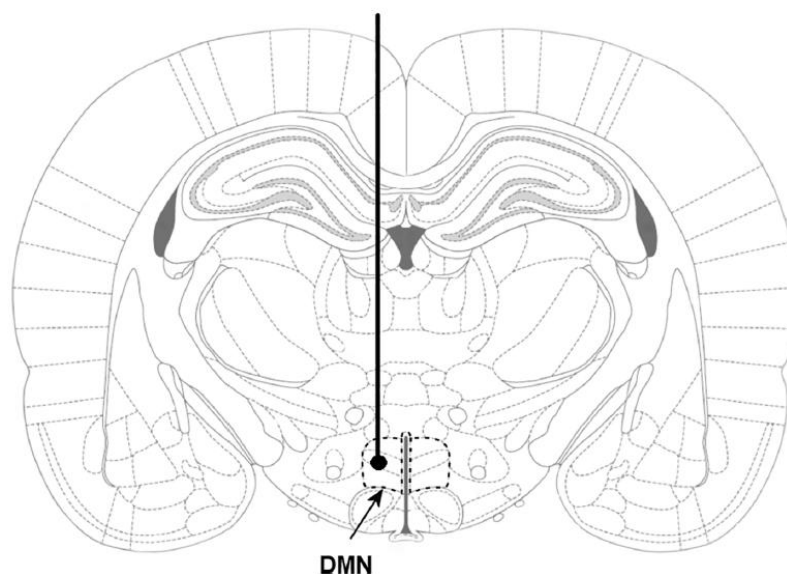


Рисунок 2 – Схема введения электродов и зона регистрации в дорсомедиальном ядре гипоталамуса (ростро-каудально: 3,12 мм от брегмы) согласно атласу мозга крысы [176].

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). Электрод находился в ДМЯ в течение одного часа перед началом записи. Запись длилась 10 минут. В анализ были включены только нейроны со стабильным паттерном разрядки и аналогичной средней частотой срабатывания на протяжении всего периода записи.

Гистограммы интервалов между скачками были построены на основе записей активности (интервал 10 мс, продолжительность регистрации – 10 мин). Были рассчитаны среднее значение и режим интервалов между спайками. Сортировка по спайкам с дальнейшим кластерным анализом проводилась с использованием программного обеспечения Spike2 (Cambridge Electronic Design, Кембридж, Великобритания).

Для определения места введения электрода использовался гистологический метод. Место регистрации отмечали пропусканием постоянного тока (0,05 мА в течение 15 мин). После этого крыс перфузировали 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma, США) на стандартном фосфатном буфере (PBS, Биоло Т, Россия) и выделяли головной мозг. Головной мозг фиксировался в течение суток в этом же растворе. Затем, делалась серия коронарных срезов медиобазальной области гипоталамуса толщиной 50 мкм с помощью криотома, срезы помещали на предметные стекла, а затем окрашивали тионином. Области регистрации определялись при помощи стереомикроскопа. Данные исключались, если зарегистрированные нейроны не были расположены в ДМЯ.

2.3. Иммуногистохимический анализ

2.3.1. Перфузия и забор материала

Животных умерщвляли летальной дозой уретана (3 г/кг, внутривенно). Проводили транскардиальную перфузию раствором стандартного фосфатно-солевого буфера (PBS; 0,01 M, pH 7,4) (Биоло Т, Россия), а затем 4% раствором параформальдегида (Sigma, США) на PBS. После перфузии головной мозг извлекали и иссекали участок гипоталамуса, содержащий ДЯ, ВМЯ и ДМЯ согласно координатам атласа мозга крыс [176], после чего помещали в ту же фиксирующую смесь, в которой производили перфузию, на 2 ч. Затем участок два раза по 10 минут промывался раствором PBS, и переносился в 30% раствор сахарозы на ночь при температуре 4°C. Серии срезов толщиной 12 мкм изготавливали на криотоме.

2.3.2. Выявление иммунопозитивных структур

Для выявления нейронов, содержащих кальбиндин, кальретинин, нейропептид Y, нейрональную синтазу NO, соматостатин, VGLUT2 и GAD65/67 применялся метод двойного иммуномечения. Использовались первичные антитела кролика к КБ, КР, НPY, VGLUT2, GAD65/67, nNOS и первичные антитела козы к nNOS и COM (Таблица 1). Для расчета процента иммунореактивных (ИР) нейронов кроме метки к интересующему белку производилась окраска всей популяции нейронов с помощью красителя, флуоресцирующего в зеленой области спектра – NeuroTrace Green Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США) или в красной области спектра – NeuroTrace Red Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США) – разведение 1:150. Вторичные антитела к кролику и к козе (Таблица 2) были конъюгированы с флуорохромом флюоресцеин-изотиоцианатом (FITC, разведение 1:100, Jackson Immunoresearch, США), дающим зеленую флуоресценцию, а к кролику и козе - с

флуорохромом - индокарбоцианином (CY3, Jackson, США, разведение 1:100), дающим красную флуоресценцию.

Таблица 1 – Использованные первичные антитела

Тип антител	Животное-донор	Разведение	Источник
Кальбиндин	Кролик	1:500	ab11426, Abcam, Великобритания
Кальретинин	Кролик	1:100	ab702, Abcam, Великобритания
НПΥ	Кролик	1:500	ab43871, Abcam, Великобритания
nNOS	Коза	1:300	ab1376, Abcam, Великобритания
	Кролик	1:200	ab76067, Abcam, Великобритания
Соматостатин	Коза	1:200	sc-7819, Santa Cruz, США
VGLUT2	Кролик	1:300	ab216463, Abcam, Великобритания
GAD65/67	Кролик	1:300	ab11070, Abcam, Великобритания

Таблица 2 – Использованные вторичные антитела

Тип антител	Животное-донор	Разведение	Источник
Антикроличий IgG CY3-конъюгированный	осел	1:100	Jackson Immunoresearch, США
Антикроличий IgG FITC-конъюгированный	осел	1:100	Jackson Immunoresearch, США
Антикозий IgG CY3-конъюгированный	осел	1:100	Jackson Immunoresearch, США
Антикозий IgG FITC-конъюгированный	осел	1:100	Jackson Immunoresearch, США

Стекла с прикрепленными срезами после промывки в PBS преинкубировались в течение 60 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% ослиной сыворотки (Jackson Immunoresearch, США), 1% тритон X-100 (Sigma, США), 0,1% бычьего сывороточного альбумина (Биоло Т, Россия). Затем срезы инкубировались одновременно с двумя антителами (произведенными от разных животных), разведенными на фосфатном буфере, в течение 24 ч при комнатной температуре. После трехкратного промывания по 10 минут раствором PBS срезы инкубировались 2 часа при комнатной температуре с вторичными

антителами, конъюгированными с флуорохромом FITC, промывались 3 раза раствором PBS и инкубировались с вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом CY3 в течение 2 часов также при комнатной температуре. С целью контроля, для исключения неспецифической реакции, часть срезов инкубировалась без первичных антител. Затем срезы снова 3 раза промывались раствором PBS, заключались с помощью среды towiol под покровное стекло и хранились при + 4° С.

2.3.3. Анализ данных иммуногистохимических методов исследования

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus BX43 (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD камерой Tucsen TCC 6.1CE 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). Долю иммунопозитивных нейронов определяли как их отношение к общему числу нейронов, которое принимали за 100%. Анализу подлежали нервные клетки, срез которых прошел через ядро с ядрышком. Для определения площади сечения нейронов в случайном порядке брались 100 нейронов, иммунопозитивных к каждому из исследованных маркеров в каждой возрастной группе.

2.4. Вестерн-блоттинг

2.4.1. Забор материала и подготовка проб

После погружения животного в глубокий уретановый наркоз (1г/мл), производили забор материала у предварительно перфузированного раствором PBS (Биоло Т, Россия) животного. Полученный материал взвешивали и гомогенизировали с буфером для лизиса (20 мМ трис-НСl, 150 мМ NaCl, 1 мМ

EDTA, 1% Triton X-100 pH 7,5) с добавлением ингибитора протеазы (P8340; Sigma-Aldrich) из расчета материал:раствор – 1:10. Полученную взвесь центрифугировали (15 минут; 12 G; 10 000 оборотов/мин) и отбирали прозрачную фракцию без осадка. К двум объемам полученного раствора добавляли один объем SDS-буфера для варения (6 % SDS (AppliChem, Германия), 0,2 М TRIS-HCl, 15% глицерин, 3% бромфеноловый синий, 10% β-меркаптоэтанол, pH 6,7). Пробы нагревали 5 мин при температуре 95°C (контроль температуры осуществлялся электронным термометром), охлаждали в снегу и замораживали.

2.4.2. Электрофорез белков

В день проведения электрофореза пробы размораживали, перемешивали и разводили в SDS-буфере (300 мкл SDS-буфера для варения (6 % SDS (AppliChem, Германия), 0,2 М TRIS-HCl, 15% глицерин, 3% бромфеноловый синий, 10% β-меркаптоэтанол, pH 6,7, 600 мкл дистиллированной H₂O, 100 мкл β-меркаптоэтанола). Затем пробы варили 5 минут при температуре 95° C, после чего сразу же охлаждали на льду. Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в 10% геле, использовали оборудование для вестерн-блоттинга. Для проведения электрофореза готовили камеру с гелем. Состав нижнего геля: 4,1 мл дистиллированной воды, 3,3 мл 30% акриламид 2,5 мл 1,5 М Трис-буфер с pH 8,8, 0,1 мл 10 % SDS, 200 мкл персульфата аммония (AppliChem, Германия), 8 мкл ТЕМЕД (AppliChem, Германия). Состав верхнего геля: 6,1 мл дистиллированной воды, 1,3 мл 30% акриламид, 2,5 мл 1,5 М Трис-буфер с pH 6,8, 0,1 мл 10% SDS, 50 мкл персульфата аммония, 2 мкл ТЕМЕД. В лунки верхнего геля (начиная с третьей лунки) помещали по 16 мкл из каждой пробы для электрофореза. В первую лунку помещали 16 мкл SDS-буфера, а во вторую - 6 мкл окрашенного маркера молекулярного веса (PierceTM Prestained Protein MW Marker; Thermo Fisher Scientific, США). Разделение белков проводили сначала при напряжении 80 В, а через 20 мин увеличивали до 130 В. Гель с белковыми фракциями переносили

на PVDF мембрану (AppliChem, Германия) в течение 90 минут при напряжении 100 В.

2.4.3. Визуализация и детекция белковых полос

Из мембраны по белковым стандартам вырезали полоски, соответствующие молекулярному весу белка интереса (согласно документам фирмы-производителя антител). Полоски мембран после блокировки 30 мин. в 3% блокирующем растворе (сухое молоко (AppliChem, Германия), разведенное на TRIS - буфере с 0,1 % Tween-20 – TBST, pH 7,6) инкубировали в течение ночи при + 4 ° С в первичных антителах к исследуемым белкам, разведенных 1:5000 на 3% блокирующем растворе. После перемешивания и промывки в TBST проводили инкубацию при комнатной температуре 1 ч в соответствующих вторичных антителах, конъюгированных с пероксидазой, разведенных на 3% блокирующем растворе. Визуализацию сигнала проводили с помощью хемилюминесцентной системы в темной камере. Для каждого белка подбирали несколько экспозиций. Антитела кролика против GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) были использованы для выявления контрольного белка в пробах (Abcam, ab9485, Великобритания, 1:2500, M=37 кД). Для визуализации сигналов применяли хемилюминесценцию (набор ECL Prime; Amersham). 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 GAPDH.

2.5. 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 $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Особенности фоновой электрической импульсации нейронов дорсомедиального ядра гипоталамуса при старении

3.1.1. Количество зарегистрированных нейронов и частота импульсации

В общей сложности в ДМЯ было зарегистрировано 27 спонтанно разряжающихся нейронов у молодых самцов, 25 у молодых самок, 26 у старых самцов, 24 у старых самок. У каждого животного регистрировалось от 1 до 4 нейронов.

С помощью гистологического метода определяли места введения электрода. Области регистрации определялись при помощи стереомикроскопа. Данные исключались, если зарегистрированные нейроны не были расположены в ДМЯ (Рисунок 3).

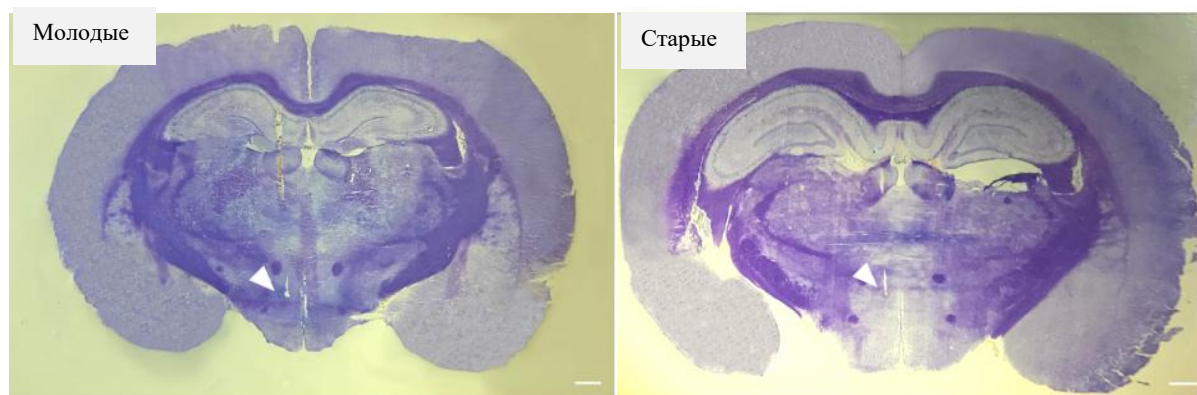


Рисунок 3 – Окрашенные тионином коронарные срезы медиобазальной области гипоталамуса молодых и старых самцов крыс. Область трека в дорсомедиальном ядре выделена стрелкой. Масштаб: 1 мм

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 ($p > 0,05$).

3.1.2. 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 отобраны нейроны с постоянной ритмической активностью, нерегулярной аритмической активностью, с широким распределением интервалов между всплесками и клетки с залпами из двух или трех импульсов (Рисунки 4, 5, 6, 7) у самцов и самок во всех возрастных группах.

Около половины нейронов (48% и 48% у молодых самцов и самок, 50% и 46% у старых самцов и самок) разряжаются в стохастическом порядке. У них было очень искаженное распределение интервалов между спайками, где только небольшое количество интервалов и длительность ниже по сравнению с режимом с экспоненциальным ростом числа больших интервалов.

26% и 24% нейронов у молодых самцов и самок, 19% и 25% у старых самцов и самок разряжались с постоянной частотой во время стабильной активности. Такие нейроны имели сравнительно симметричную дисперсию интервалов между спайками, в то время как интервалы были тесно сгруппированы вокруг моды.

Третья группа нейронов ДМЯ (19% и 20% у молодых самцов и самок, 23% и 25% у старых самцов и самок) имела широкое распределение с интервалом между пиками.

В последней группе были парные или тройные залпы импульсов, характеризующиеся небольшим интервалом между ними (7% и 8% у молодых самцов и самок, 8% и 4% у старых самцов и самок) (Рисунки 4, 5, 6, 7).

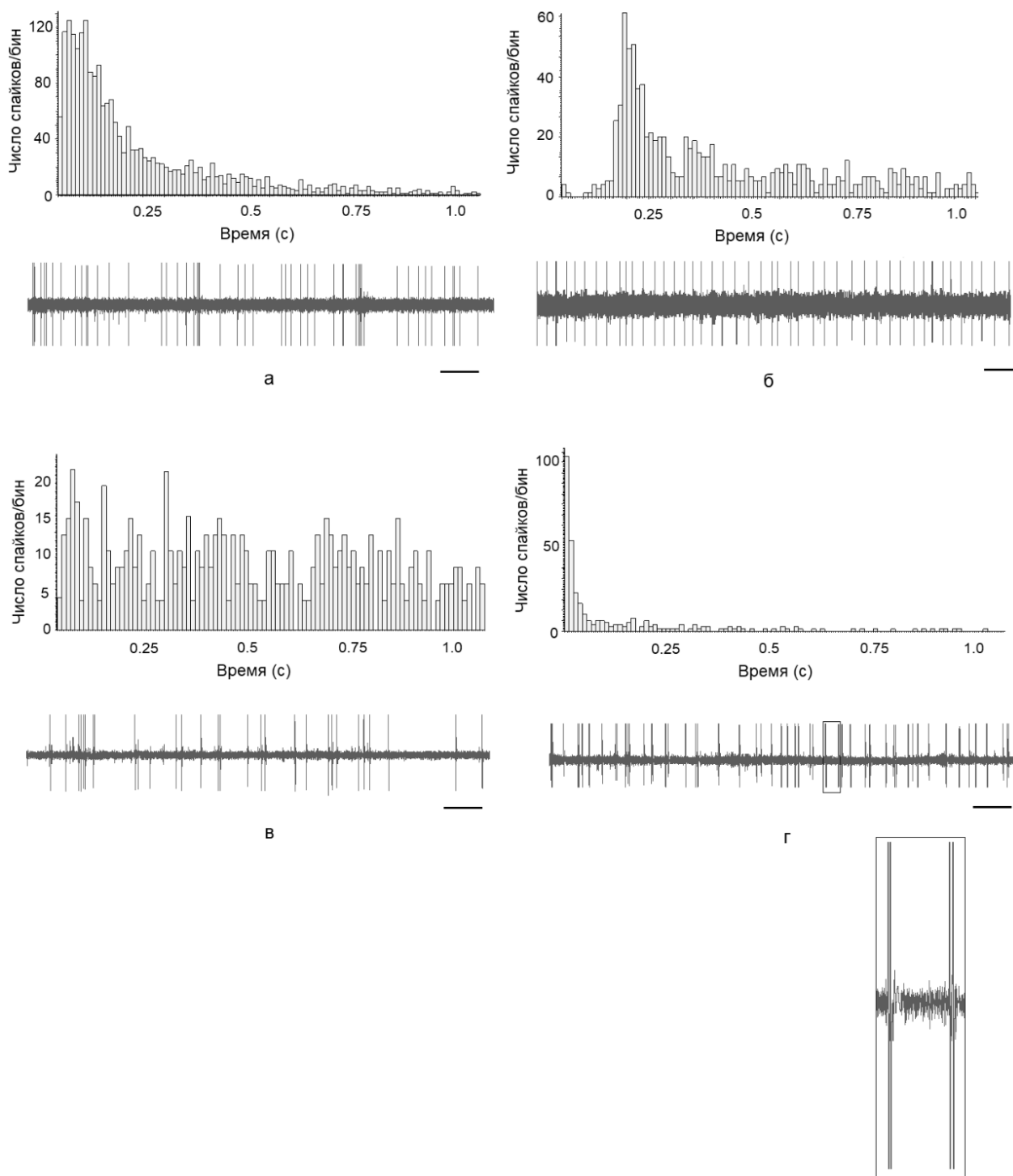


Рисунок 4 – Интервальные гистограммы межспайковых интервалов (вверху) и записи фоновой электрической активности (внизу) нейронов молодой самки крыс, построенный за 1,0 с, бин 10 мс.

Примечание – А – с нерегулярной аритмической активностью, Б – с постоянной ритмической активностью, В – с широким распределением межспайковых интервалов, Г – со всплесками двух или трех спайков. Масштаб: 0,5 с. В рамке показан увеличенный фрагмент записи нейрона с парными спайками.

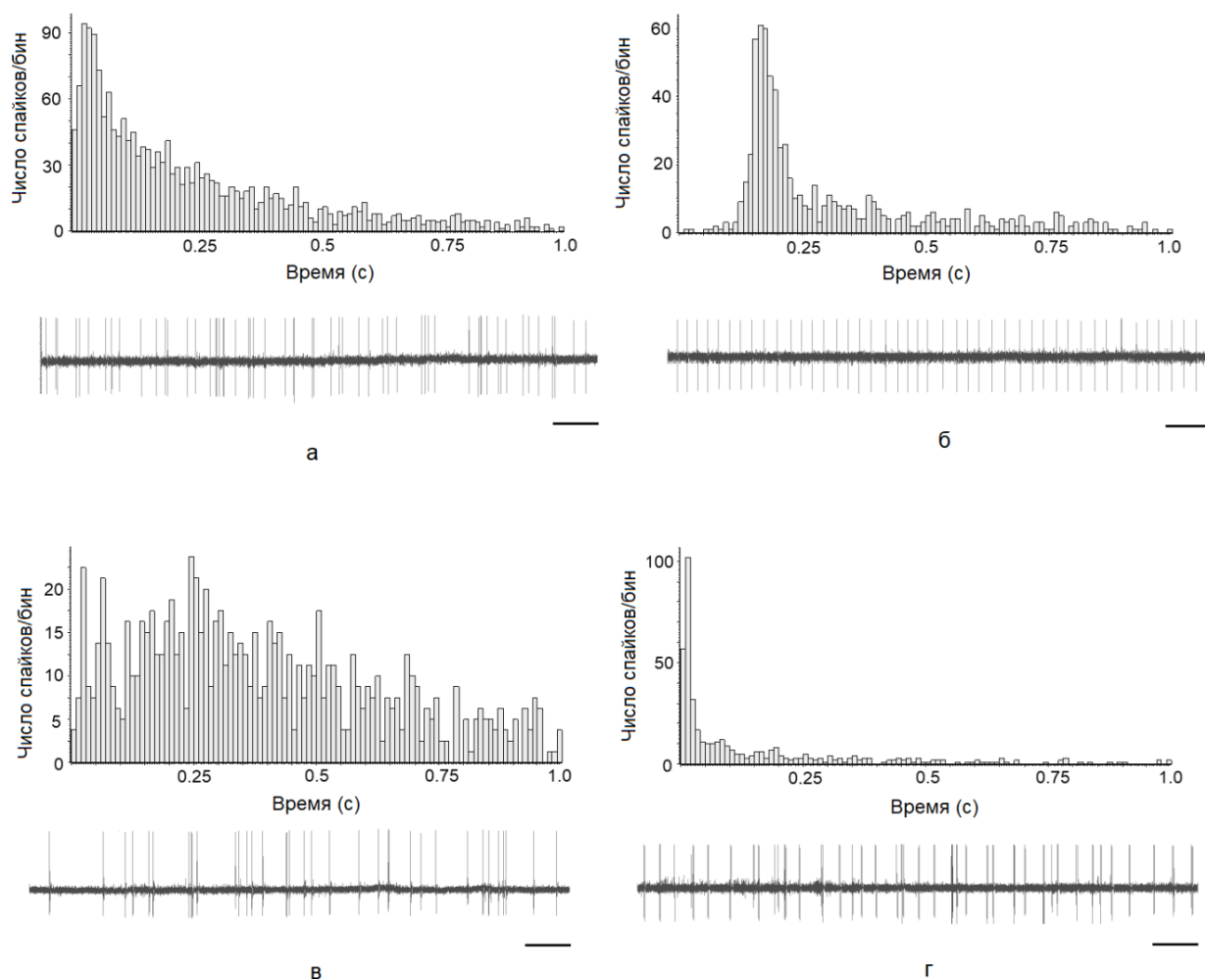


Рисунок 5 – Интервальные гистограммы межспайковых интервалов (вверху) и записи фоновой электрической активности (внизу) нейронов молодого самца крыс, построенный за 1,0 с, бин 10 мс.

Примечание – А – с нерегулярной аритмической активностью, Б – с постоянной ритмической активностью, В – с широким распределением межспайковых интервалов, Г – со всплесками двух или трех спайков. Масштаб: 0,5 с.

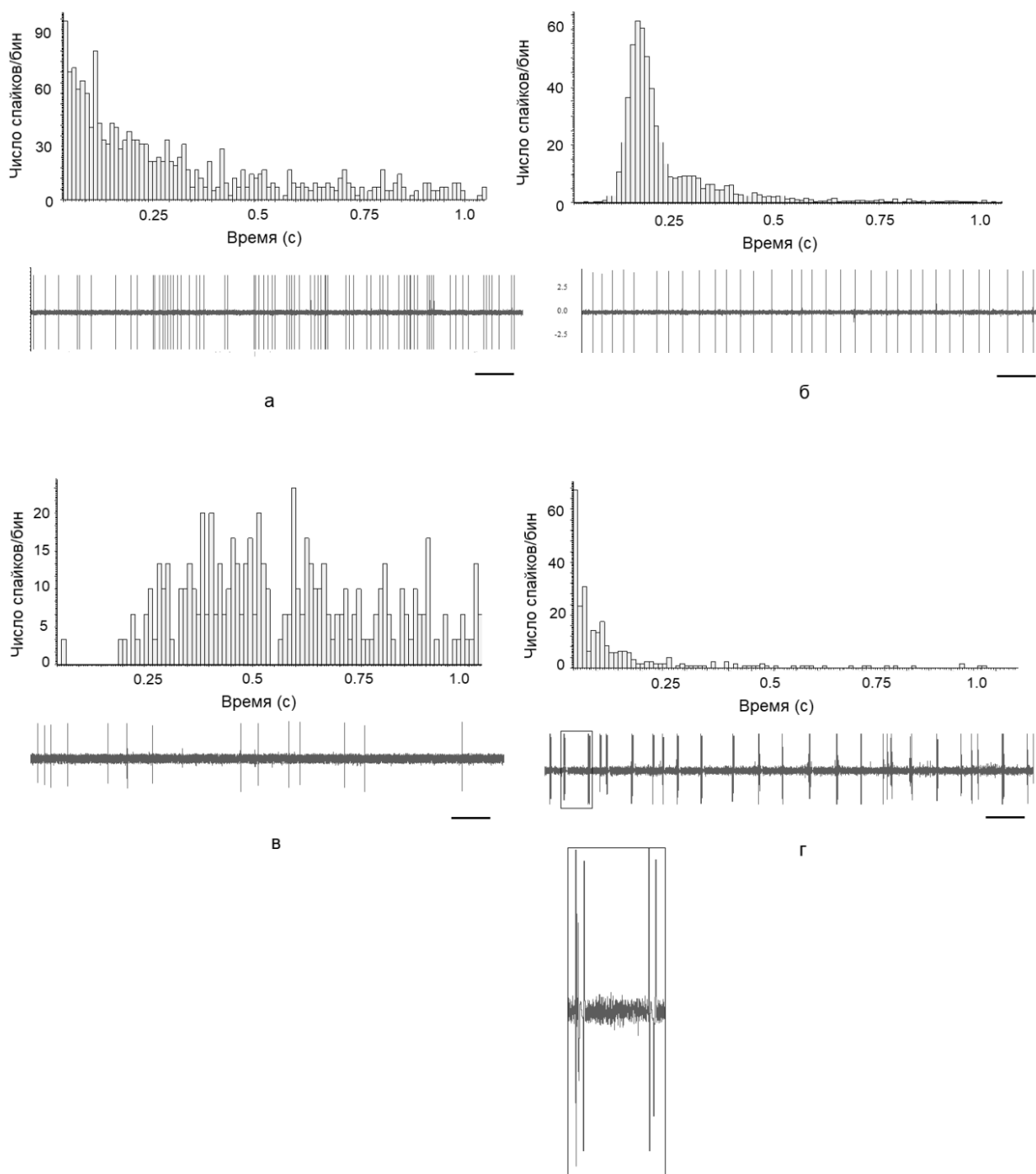


Рисунок 6 – Интервальные гистограммы межспайковых интервалов (вверху) и записи фоновой электрической активности (внизу) нейронов старой самки крыс, построенный за 1,0 с, бин 10 мс.

Примечание – А – с нерегулярной аритмической активностью, Б – с постоянной ритмической активностью, В – с широким распределением межспайковых интервалов, Г – со всплесками двух или трех спайков. Масштаб: 0,5 с. В рамке показан увеличенный фрагмент записи нейрона с парными спайками.

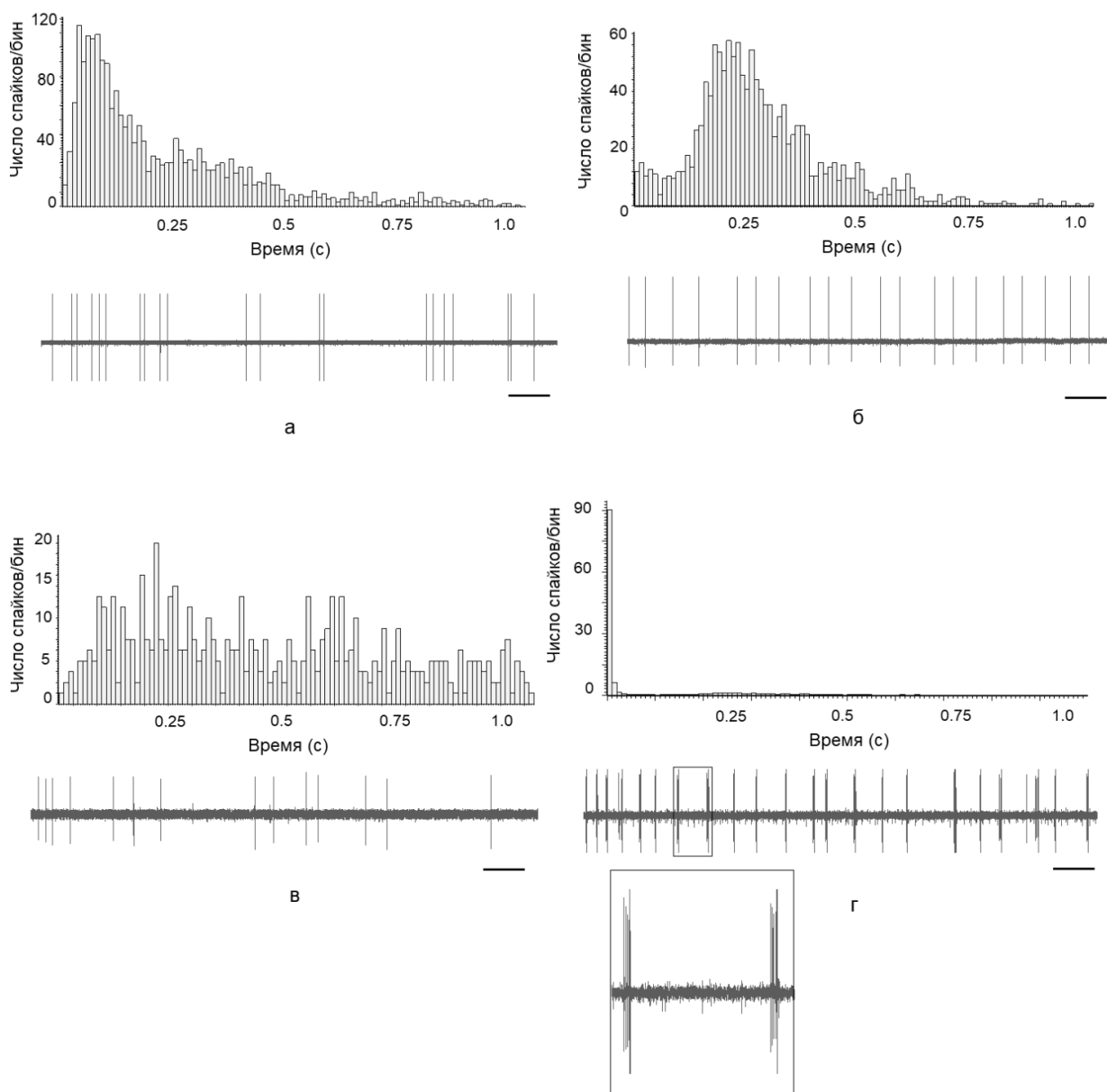


Рисунок 7 – Интервальные гистограммы межспайковых интервалов (вверху) и записи фоновой электрической активности (внизу) нейронов старого самца крыс, построенный за 1,0 с, бин 10 мс.

Примечание – А – с нерегулярной аритмической активностью, Б – с постоянной ритмической активностью, В – с широким распределением межспайковых интервалов, Г – со всплесками двух или трех спайков. Масштаб: 0,5 с. В рамке показан увеличенный фрагмент записи нейрона с парными спайками.

3.1.3. Частота импульсации отдельных типов нейронов

Нейроны с широким распределением межспайковых интервалов имели самую низкую среднюю частоту разрядов у молодых и старых крыс, как у самцов, так и у самок (Рисунок 8).

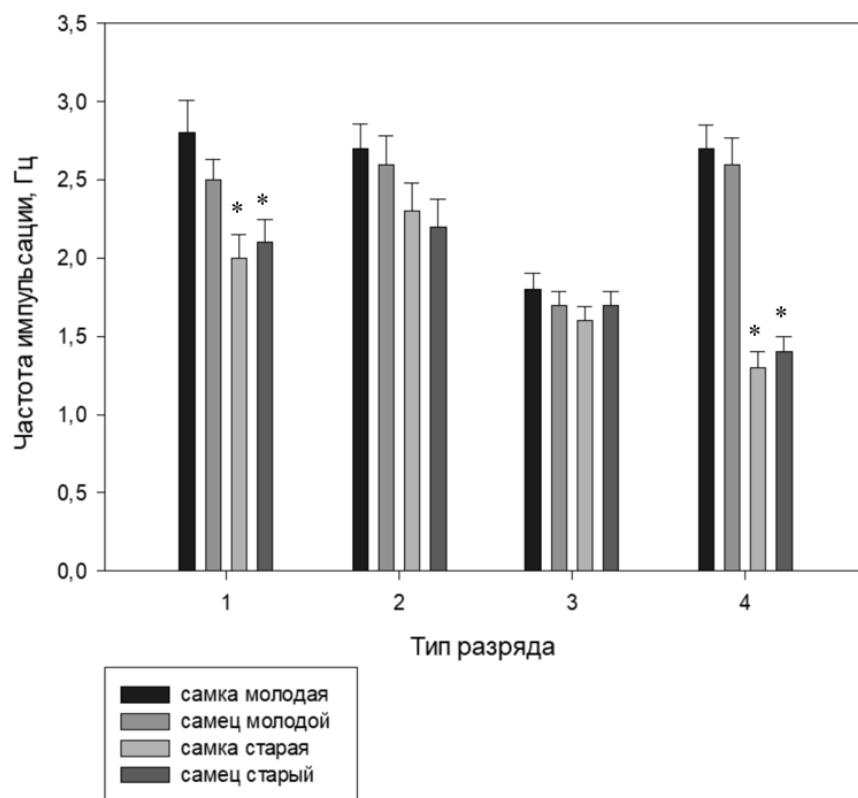


Рисунок 8 – Частота импульсации нейронов, разряжающихся в стохастическом порядке (1), с постоянной частотой (2), с широким распределением межспайковых интервалов (3) и с парными или тройными спайками (4) у молодых и старых самок и самцов крыс.

* $p < 0,05$ — при сравнении с молодыми

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 ($p > 0,05$). Не было зарегистрировано достоверных различий по частоте импульсации у самцов и у самок в отдельных возрастных группах ($p > 0,05$).

3.2. Изменение баланса возбуждение/торможение

3.2.1. Иммуногистохимическое исследование везикулярного переносчика глутамата и глутаматдекарбоксилазы

Результаты иммуногистохимического исследования выявили небольшой процент VGLUT2-ИР нейронов (Рисунки 9, 10), при этом значительная доля нейронов была GAD65/67 ИР в ДМЯ гипоталамуса молодых самцов и самок крыс (Таблица 3). 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 ($p > 0,05$).

Таблица 3 – 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 ± 0,2	3,8 ± 0,3	3,9 ± 0,2	4,1 ± 0,4
GAD65/67	65,7 ± 5,8	61,3 ± 4,9	63,6 ± 5,7	70,0 ± 6,8

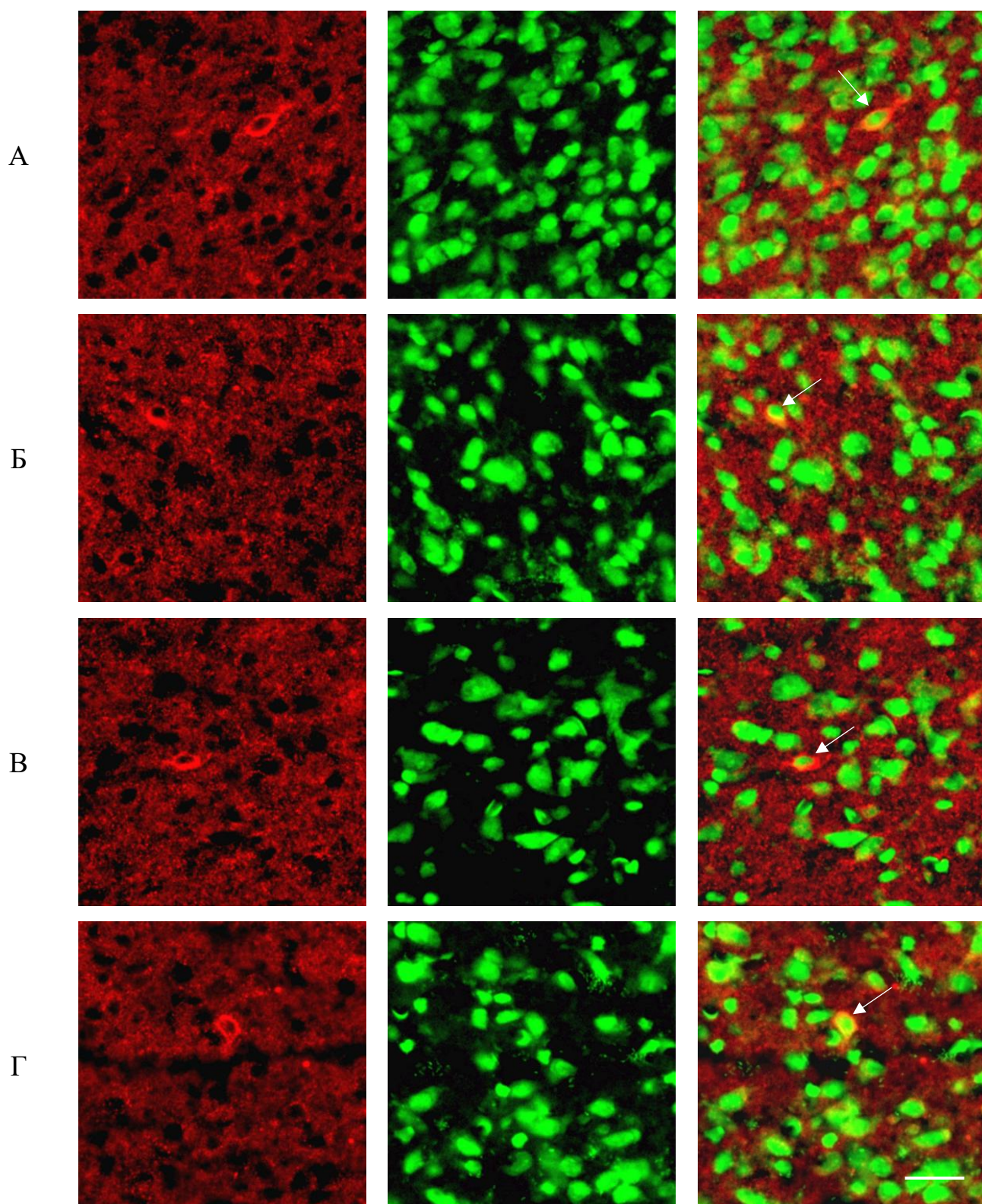


Рисунок 9 – Иммуногистохимическая реакция к VGLUT2. Двойное иммуномечение: VGLUT2 – CY3 (красный, левый ряд), вся популяция нейронов – NeuroTrace Green (зеленый, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 20 мкм. Примечание – А – у молодых самок, Б – у молодых самцов, В – у старых самок, Г – у старых самцов.

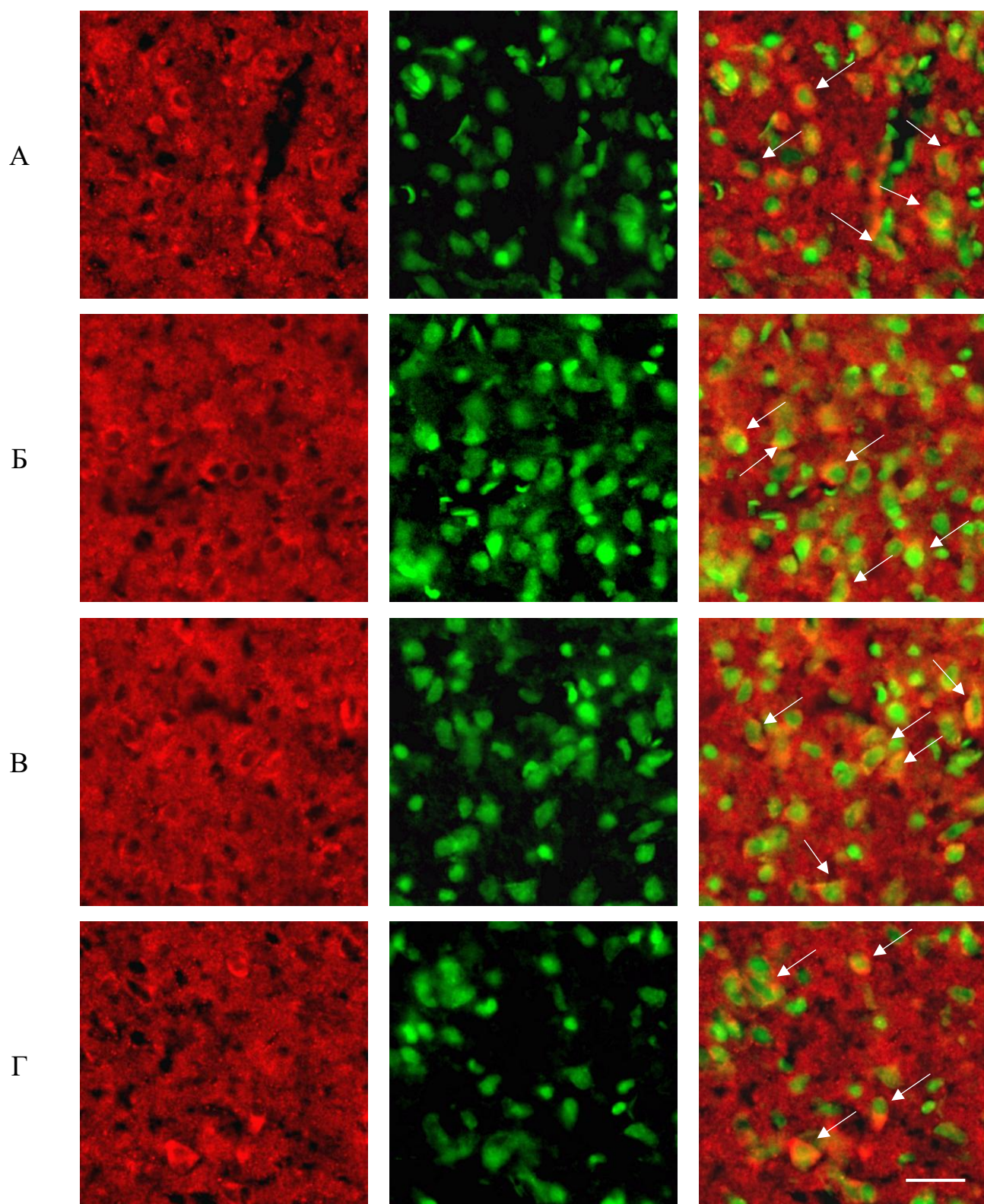


Рисунок 10 – Иммуногистохимическая реакция к GAD65/67. Двойное иммуномечение: GAD65/67 – CY3 (красный, левый ряд), вся популяция нейронов – NeuroTrace Green (зеленый, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 20 мкм. Примечание – А – у молодых самок, Б – у молодых самцов, В – у старых самок, Г – у старых самцов.

3.2.2. 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 11). Экспрессия GAD65/67 и VGLUT2 значительно увеличилась в дорсомедиальном ядре у старых крыс по сравнению с молодыми ($p < 0,05$).

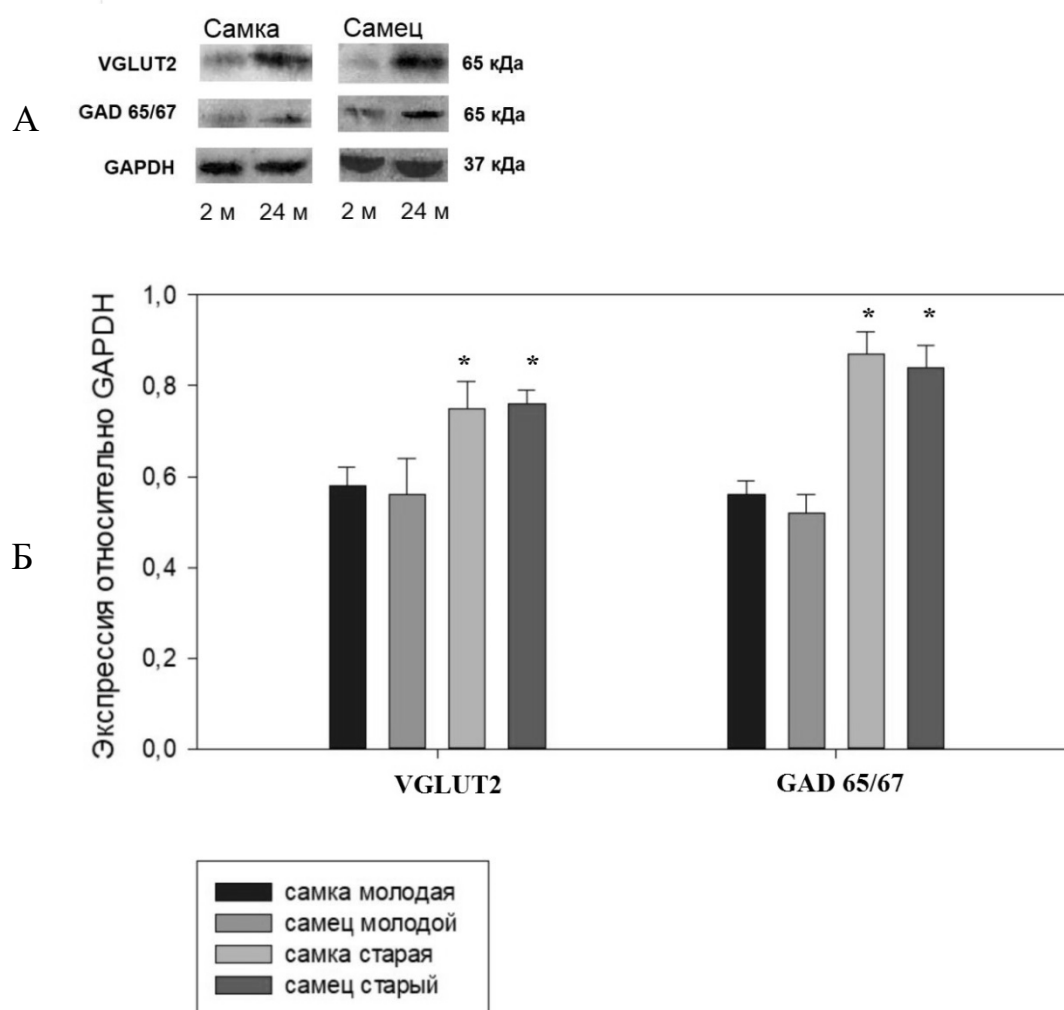


Рисунок 11 – Изменение экспрессии VGLUT2 и GAD65/67 в дорсомедиальном ядре у молодых и старых самцов и самок крыс. * $p < 0,01$ по сравнению с молодыми крысами.

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

3.3. Изменение кальциевого сигналинга

3.3.1. Иммуногистохимическое исследование кальбиндин иммунореактивных нейронов

Иммунореактивность к КБ наблюдалась в слабо и сильно окрашенных ИР нейронах (Рисунок 12). Окрашивание на КБ ограничивалось телами клеток и первичными дендритами. 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 (Таблица 4). В компактной части ДМЯ (ДМЯк) обнаружено лишь несколько КБ-ИР нейронов. В ДМЯв обеих 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 ($p < 0,05$).

Таблица 4 – 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					

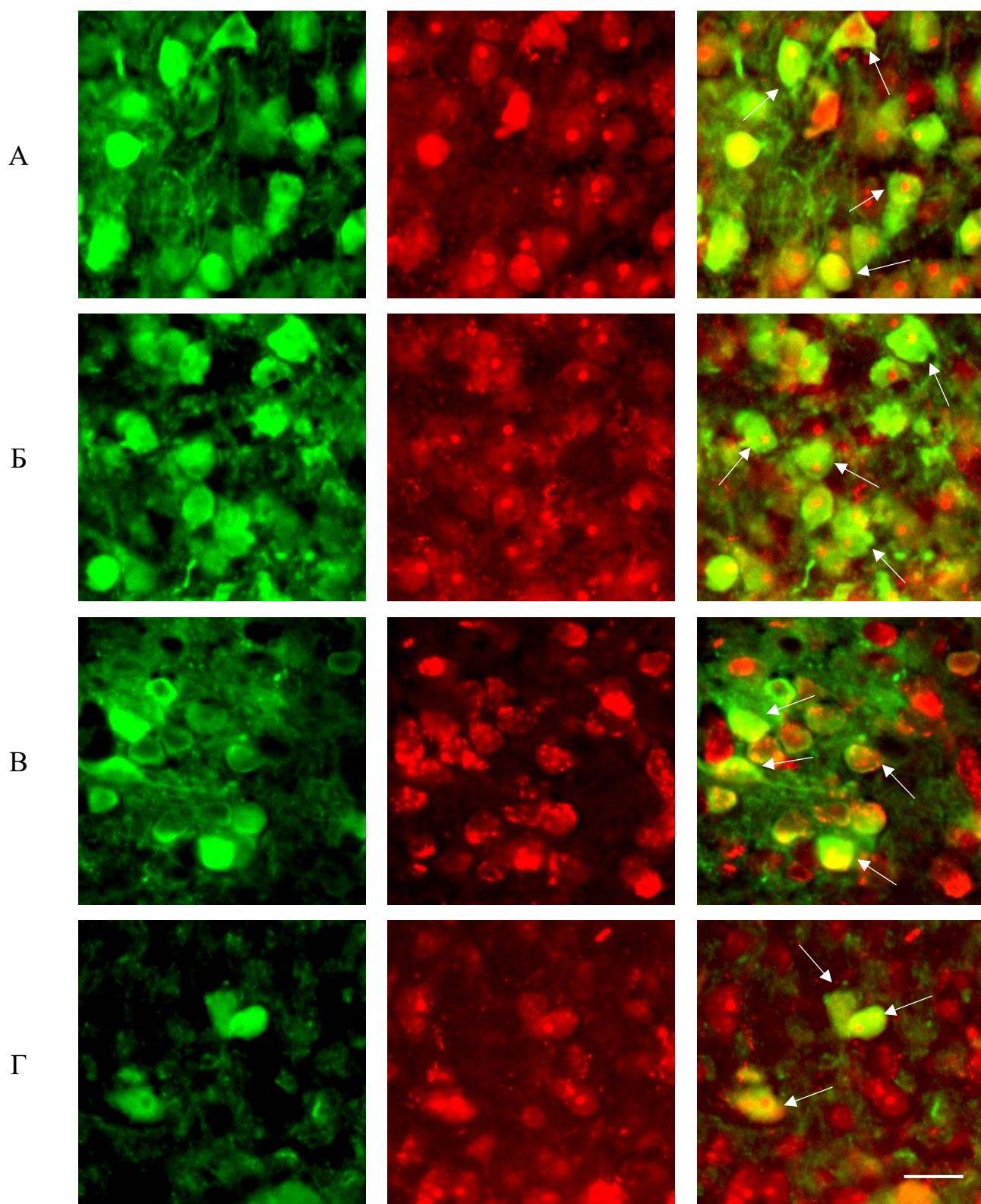


Рисунок 12 – Иммуногистохимическая реакция к КБ. Двойное иммуномечение:
 КБ – FITC (зеленый, левый ряд), вся популяция нейронов – NeuroTrace Red
 (красный, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с
 двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 10 мкм.
 Примечание – А – у молодых самок, Б – у молодых самцов, В – у старых самок, Г – у старых
 самцов.

3.3.2. Иммуногистохимическое исследование кальретииниммунореактивных нейронов

Иммунореактивность к КР обнаруживалась преимущественно в телах нейронов (Рисунок 13) 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 ($p < 0,05$) (Таблица 5). Не было отмечено достоверных половых различий по процентам КР-ИР нейронов в отдельных возрастных группах ($p > 0,05$).

Таблица 5 – 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					

3.3.3. Колокализация кальбиндина и кальретиинина

В ДМЯ были обнаружены три группы нейронов (Рисунок 14): 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 6). В ДМЯв молодых крыс процент нейронов КБ(+)/КР(-) был выше у самок по сравнению с самцами ($p < 0,05$).

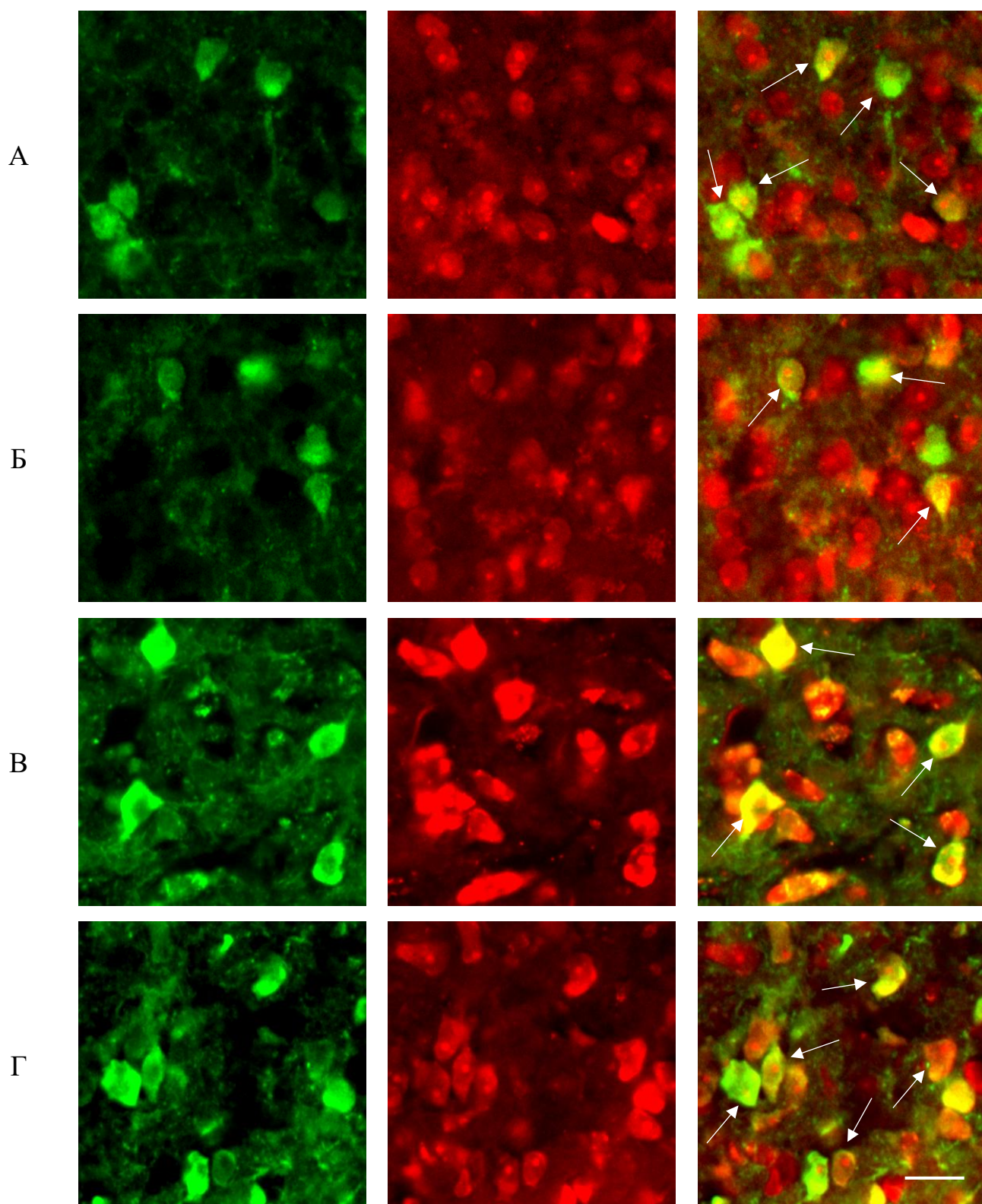


Рисунок 13 – Иммуногистохимическая реакция к КР. Двойное иммуномечение:
 КР – FITC (зеленый, левый ряд), вся популяция нейронов – NeuroTrace Red
 (красный, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с
 двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 10 мкм.
 Примечание – А – у молодых самок, Б – у молодых самцов, В – у старых самок, Г – у старых
 самцов.

Таблица 6 – 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					

3.3.4. Вестерн-блоттинг кальбиндина и кальретинина

При исследовании КБ и КР методом вестерн-блоттинга белки выявлялись в виде белковых 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 15). Мы не наблюдали различий в экспрессии КБ и КР в ДМЯ связанных с полом (p>0,05).

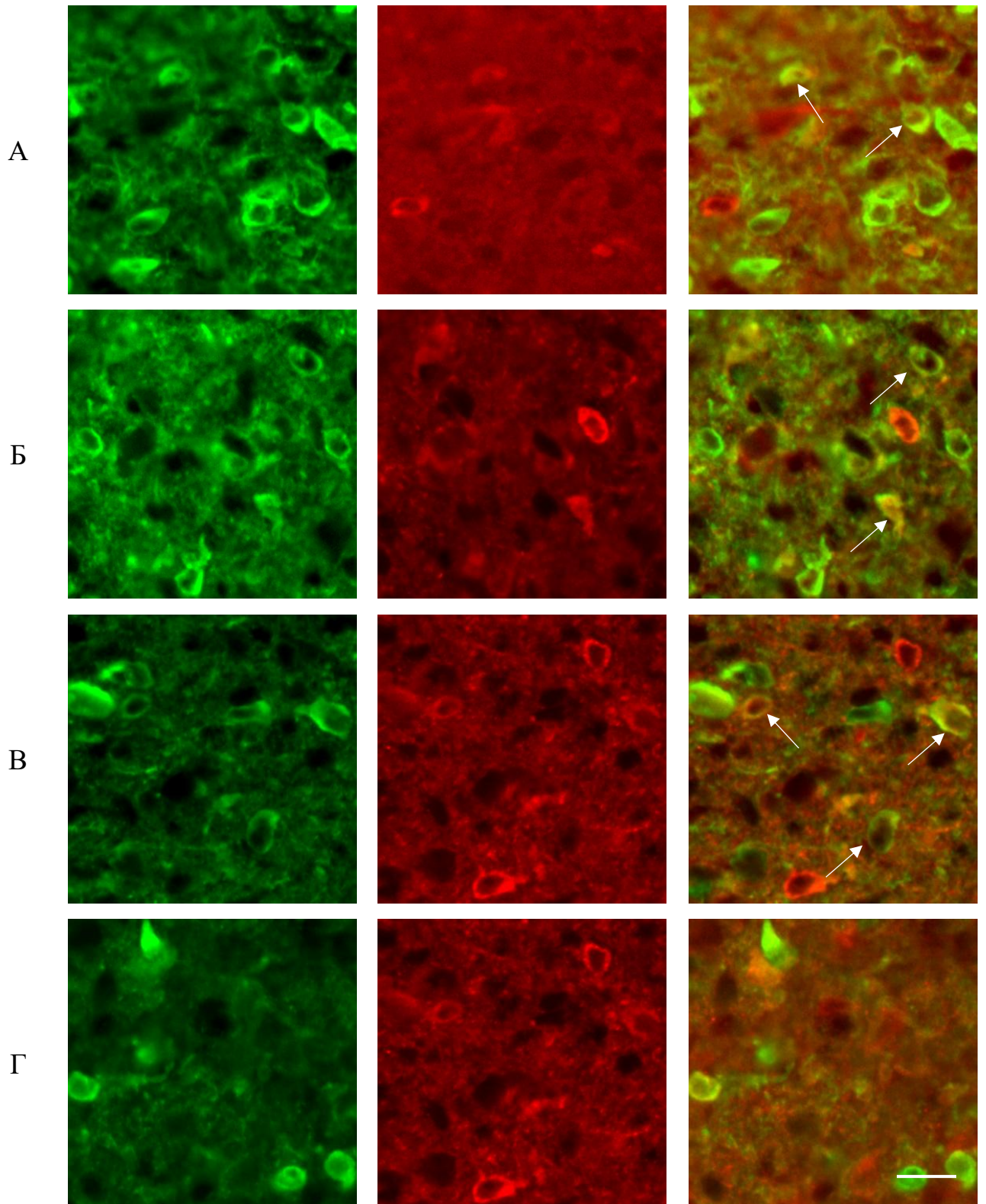


Рисунок 14 – Иммуногистохимическая реакция соллокализации КБ и КР. Двойное иммуномечение: КБ – FITC (зеленый, левый ряд), КР – SY3 (красный, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 10 мкм.

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

нейронов и степень иммунофлюоресценции к nNOS 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 nNOS-ИР нейронов между самцами и самками в каждой возрастной группе ($p > 0,05$).

3.4.2. Вестерн-блоттинг нейрональной синтазы NO

Исследование nNOS методом вестерн-блоттинга выявило полосы белка с молекулярной массой 160 кДа. Экспрессия nNOS значительно повышалась в ДМЯ при старении (Рисунок 17). Мы не обнаружили статистически значимых различий между экспрессией nNOS у самцов и самок крыс ($p > 0,05$).

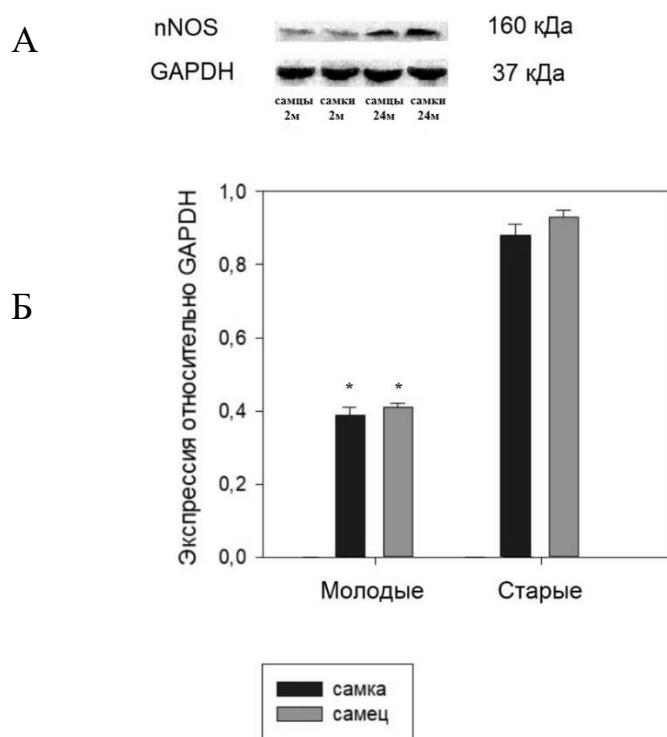


Рисунок 17 – Изменение экспрессии nNOS в дорсомедиальном ядре у молодых и старых самцов и самок крыс. * $p < 0,01$ по сравнению со старыми крысами
 Примечание – А – Иммуноблоттинговые полосы nNOS и GAPDH, Б – Изменение экспрессии nNOS относительно GAPDH.

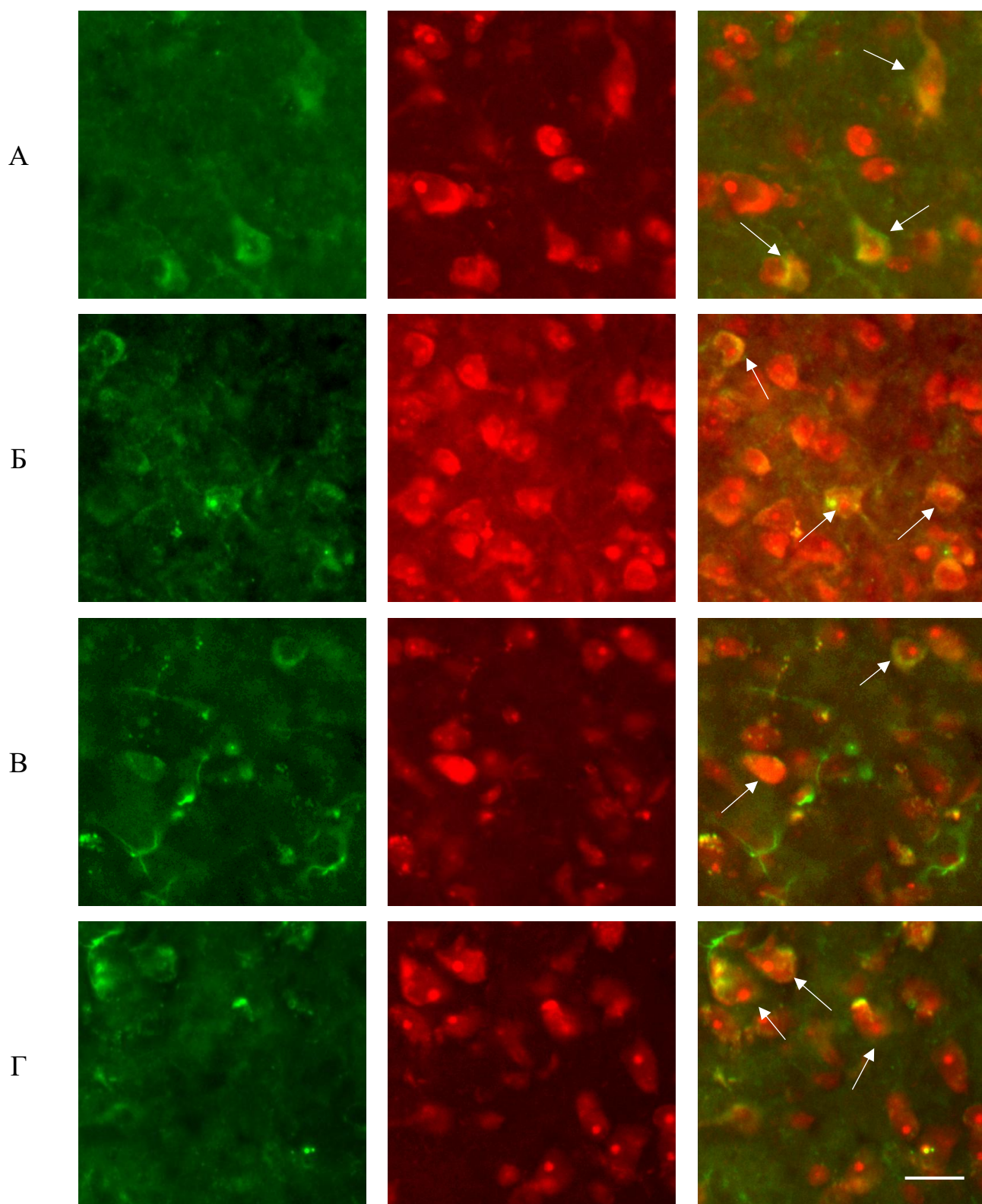


Рисунок 16 – Иммуногистохимическая реакция к nNOS. Двойное иммуномечение: nNOS – FITC (зеленый, левый ряд), вся популяция нейронов – NeuroTrace Red (красный, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 10 мкм.

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

3.4.3. Колокализация nNOS и КБ при старении

У молодых самцов и самок крыс, наибольший процент нейронов является nNOS(-)/КБ(+) (Рисунок 18). 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 7).

Таблица 7 – Процентное соотношение nNOS (+)/КБ (-), nNOS (+)/КБ (+), nNOS (-)/КБ (+) 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				

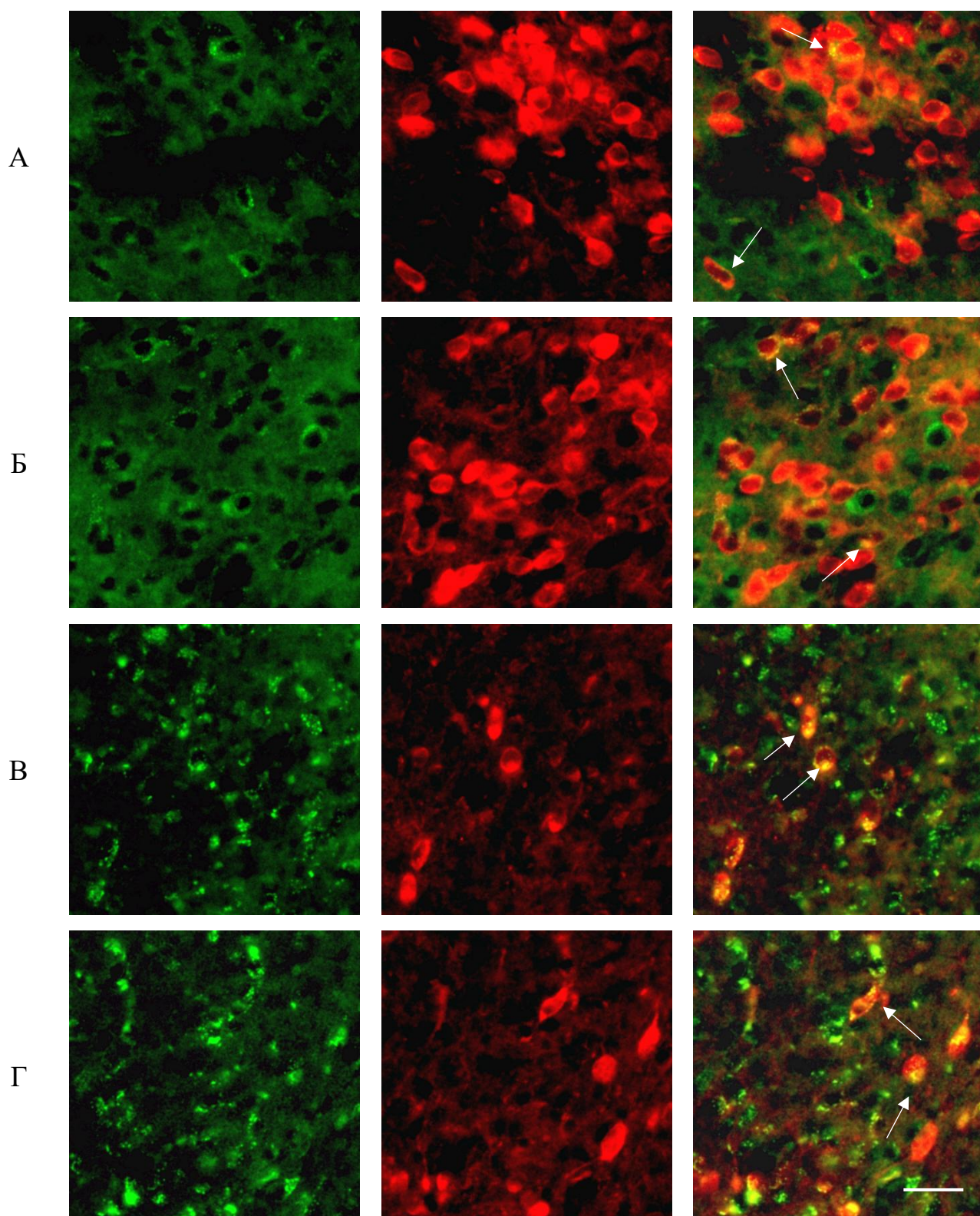


Рисунок 18 – Иммуногистохимическая реакция соллокализации pNOS и КБ. Двойное иммуномечение: pNOS – FITC (зеленый, левый ряд), КБ – CY3 (красный, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 20 мкм.

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

3.5. Изменение нейропептидного состава

3.5.1. 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 19). 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 ($p > 0,05$).

3.5.2. Колокализация нейропептида Y с нейрональной NO синтазой и кальбиндином

У молодых крыс, независимо от пола, лишь отдельные НPY-ИР нейроны содержат nNOS (<1%) (Рисунок 20). Однако процент НPY-ИР нейронов, колокализующих 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 (Рисунок 21).

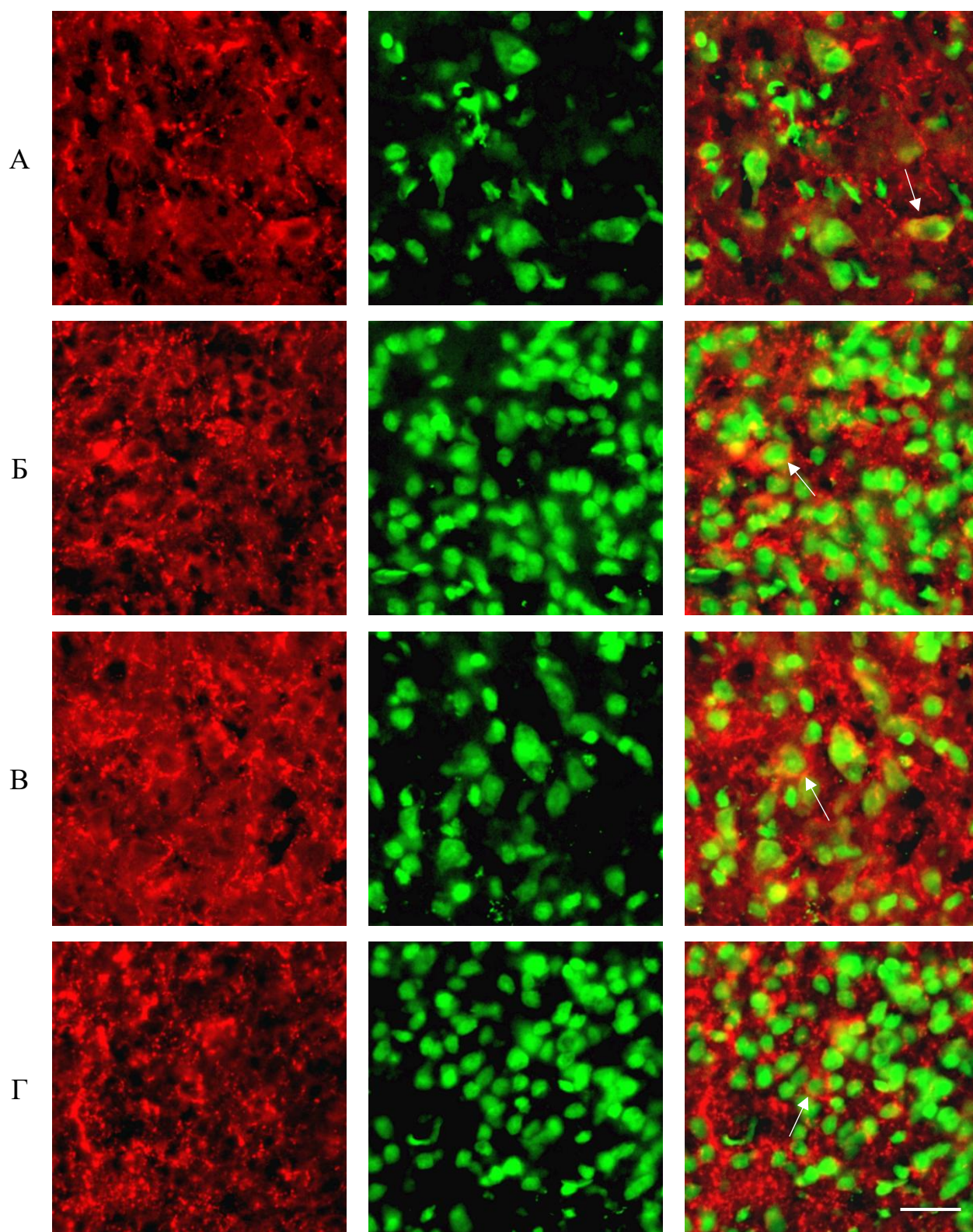


Рисунок 19 – Иммуногистохимическая реакция к НПУ. Двойное иммуномечение: НПУ – СУЗ (красный, левый ряд), вся популяция нейронов – NeuroTrace Green (зеленый, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 20 мкм.

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

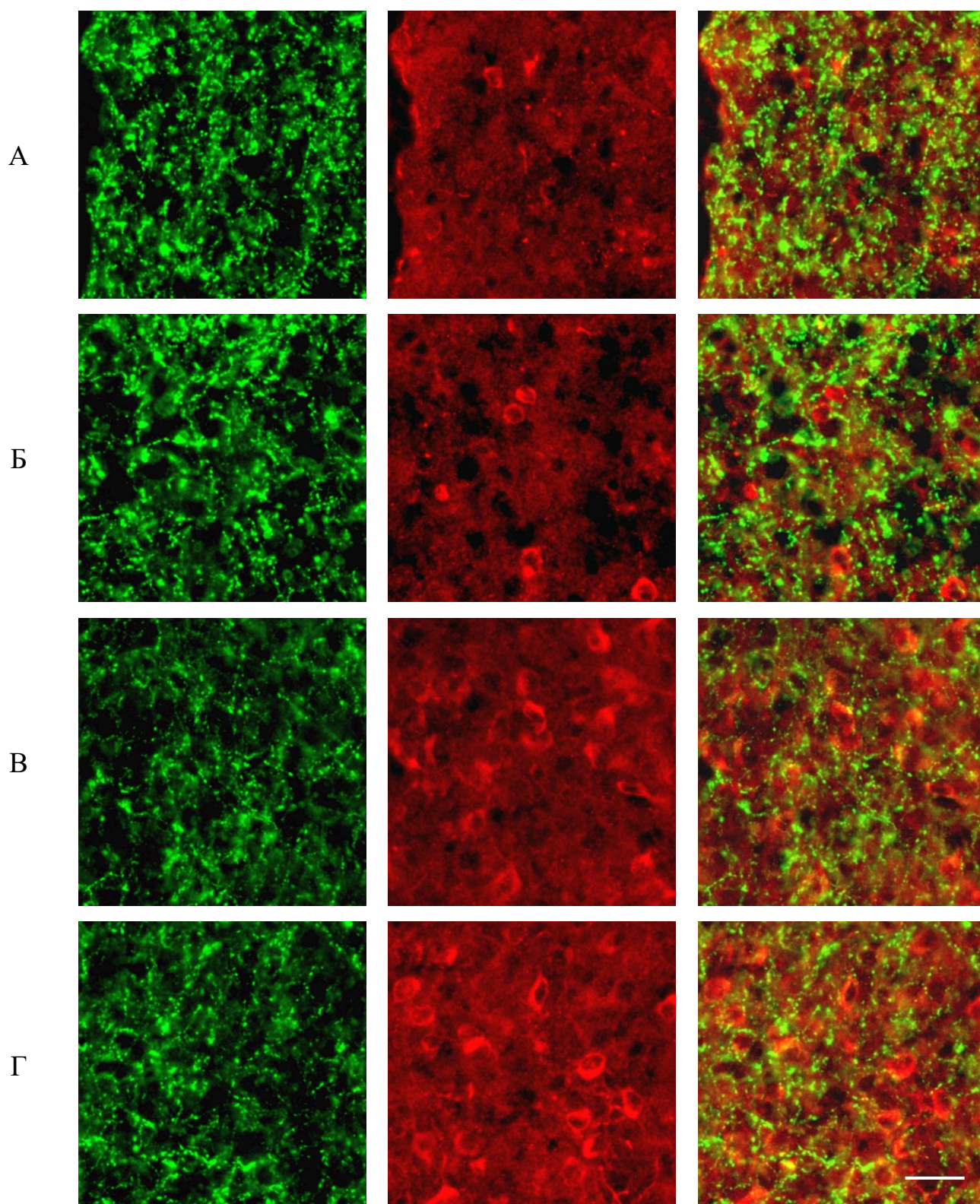


Рисунок 20 – Иммуногистохимическая реакция со локализации НPY и pNOS.
 Двойное иммуномечение: НPY – FITC (зеленый, левый ряд), pNOS – CY3 (красный, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Масштаб 20 мкм.
 Примечание – А – у молодых самок, Б – у молодых самцов, В – у старых самок, Г – у старых самцов.

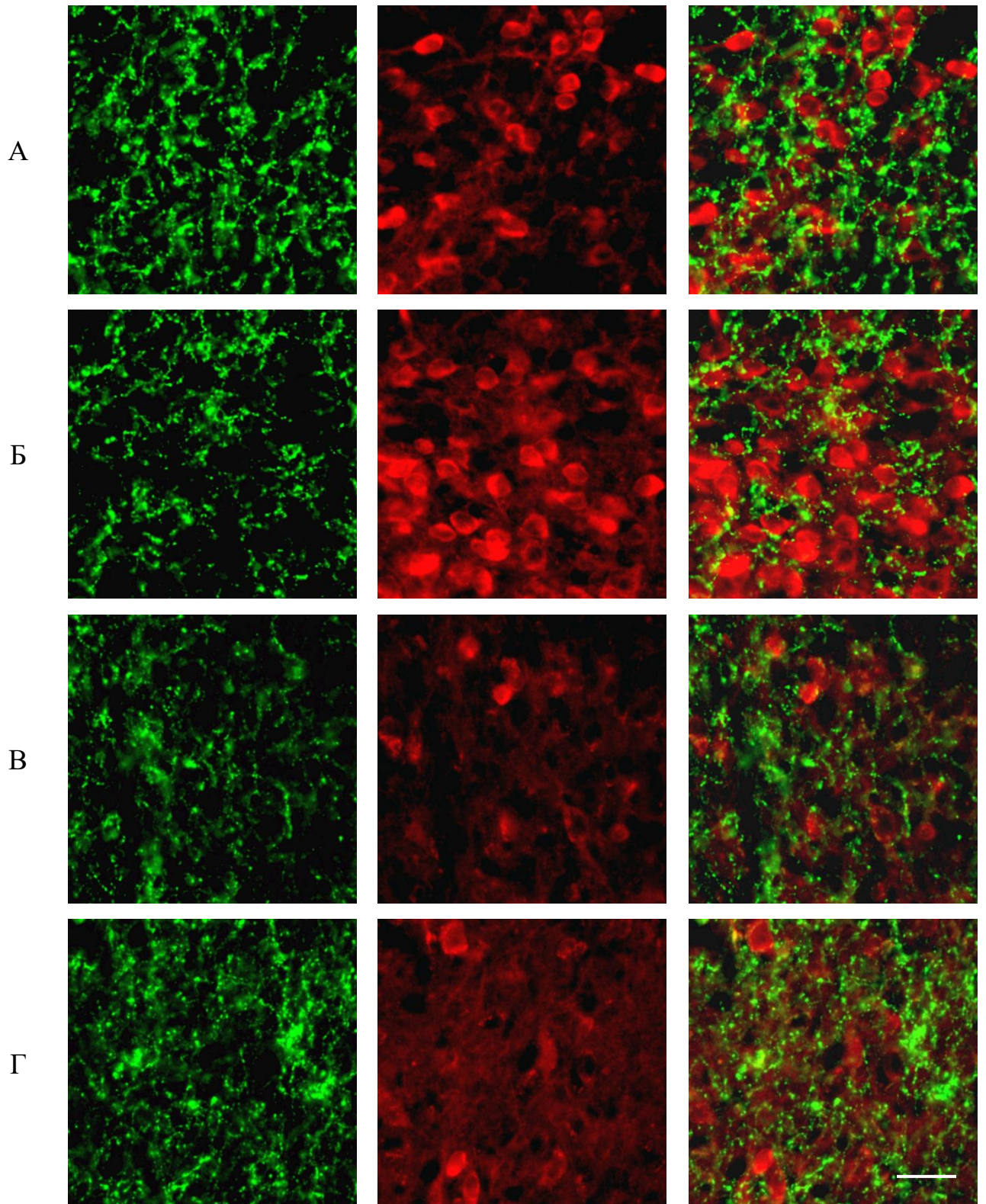


Рисунок 21 – Иммуногистохимическая реакция солокализации НПУ и КБ. Двойное иммуномечение: НПУ – FITC (зеленый, левый ряд), КБ – SY3 (красный, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Масштаб 20 мкм. Примечание – А – у молодых самок, Б – у молодых самцов, В – у старых самок, Г – у старых самцов.

3.5.3. Иммуногистохимическое исследование соматостатин иммунореактивных нейронов

СОМ-ИР нейроны были обнаружены в ДМЯ у животных всех возрастных групп у самцов и самок (Рисунок 22). 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.

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 ($p > 0,05$).

3.5.4. Колокализация соматостатина с нейрональной синтазой NO, нейропептидом Y и кальбиндином

В ДМЯ до трети СОМ-ИР нейронов были иммунореактивны к nNOS, НPY и КБ (Рисунки 23, 24, 25). Не было выявлено достоверных различий по процентам нейронов, колокализующих СОМ с nNOS и КБ между молодыми и старыми крысами, а также самцами и самками ($p > 0,05$) (Таблица 8).

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

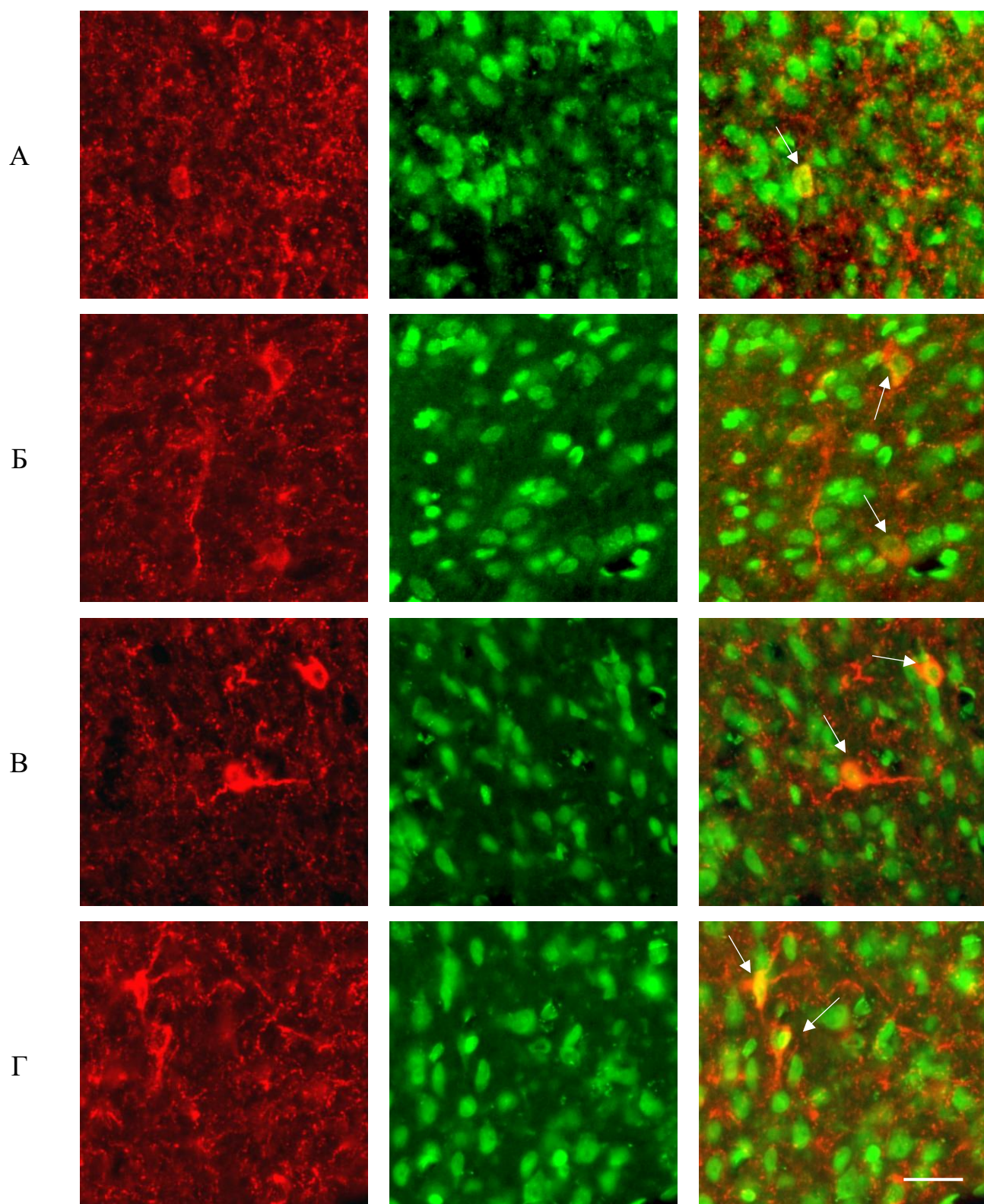


Рисунок 22 – Иммуногистохимическая реакция к соматостатину. Двойное иммуномечение: SOM – CY3 (красный, левый ряд), вся популяция нейронов – NeuroTrace Green (зеленый, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд). Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 20 мкм.
Примечание – А – у молодых самок, Б – у молодых самцов, В – у старых самок, Г – у старых самцов.

Таблица 8 – 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				

3.5.5. 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 26). Экспрессия СОМ и НПУ в дорсомедиальном ядре не менялась с возрастом у обоих полов.

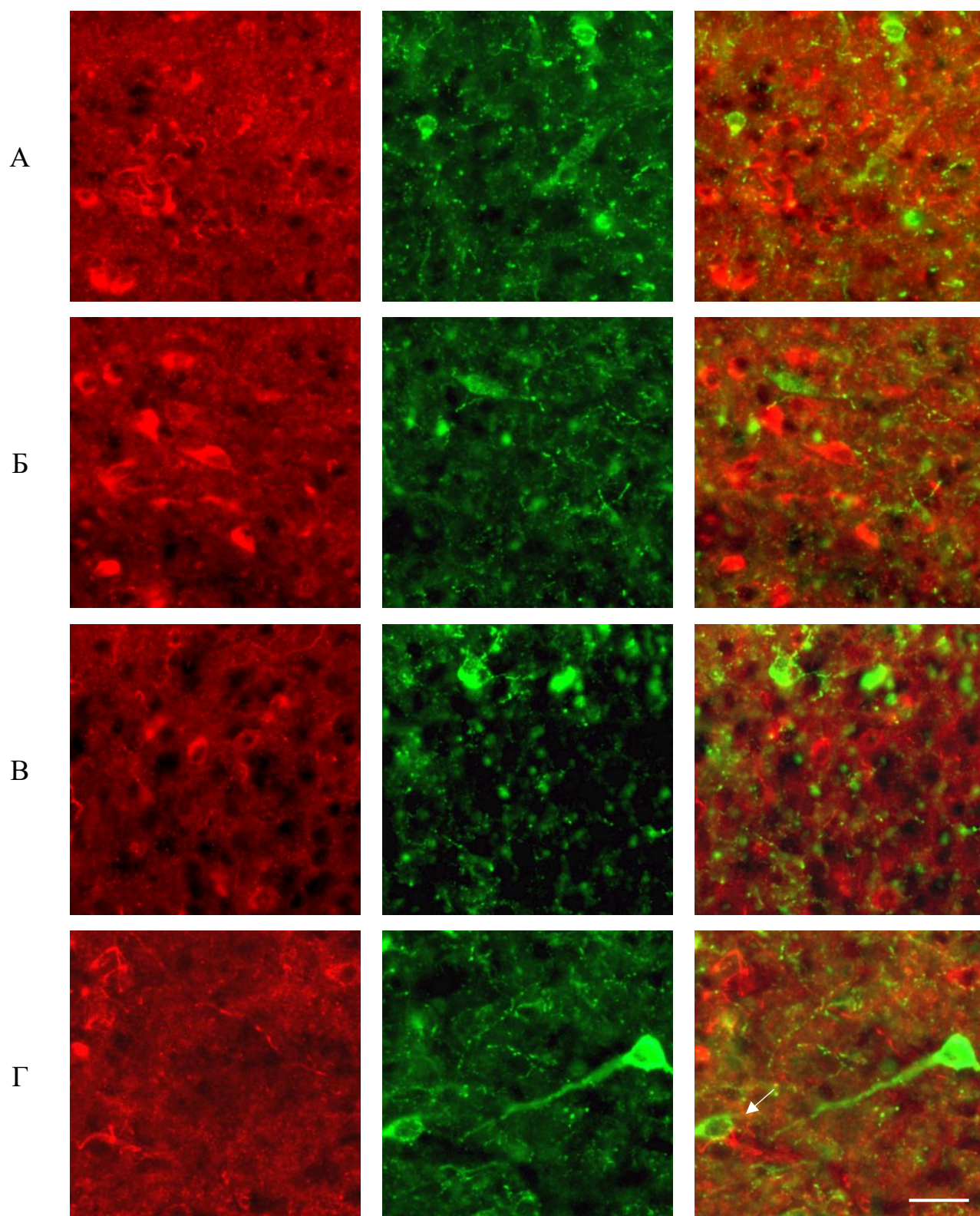


Рисунок 23 – Иммуногистохимическая реакция со локализации nNOS и соматостатина. Двойное иммуномечение: nNOS – CY3 (красный, левый ряд), SOM – FITC (зеленый, правый ряд), комбинированное изображение (правый ряд).

Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 20 мкм.

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

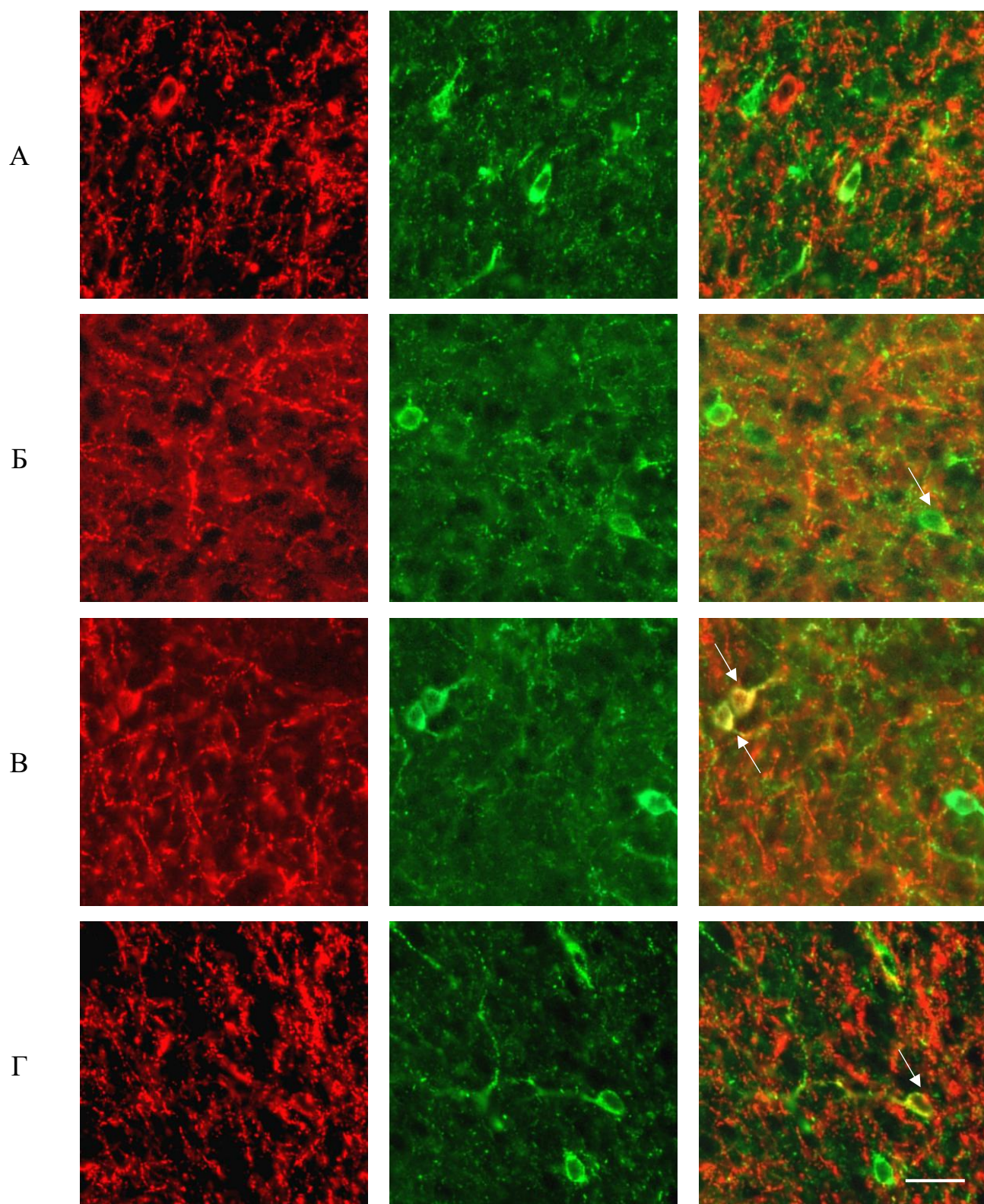


Рисунок 24 – Иммуногистохимическая реакция со локализацией НPY и соматостатина. Двойное иммуномечение: НPY – CY3 (красный, левый ряд), SOM – FITC (зеленый, средний ряд), комбинированное изображение (правый ряд).

Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 20 мкм.

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

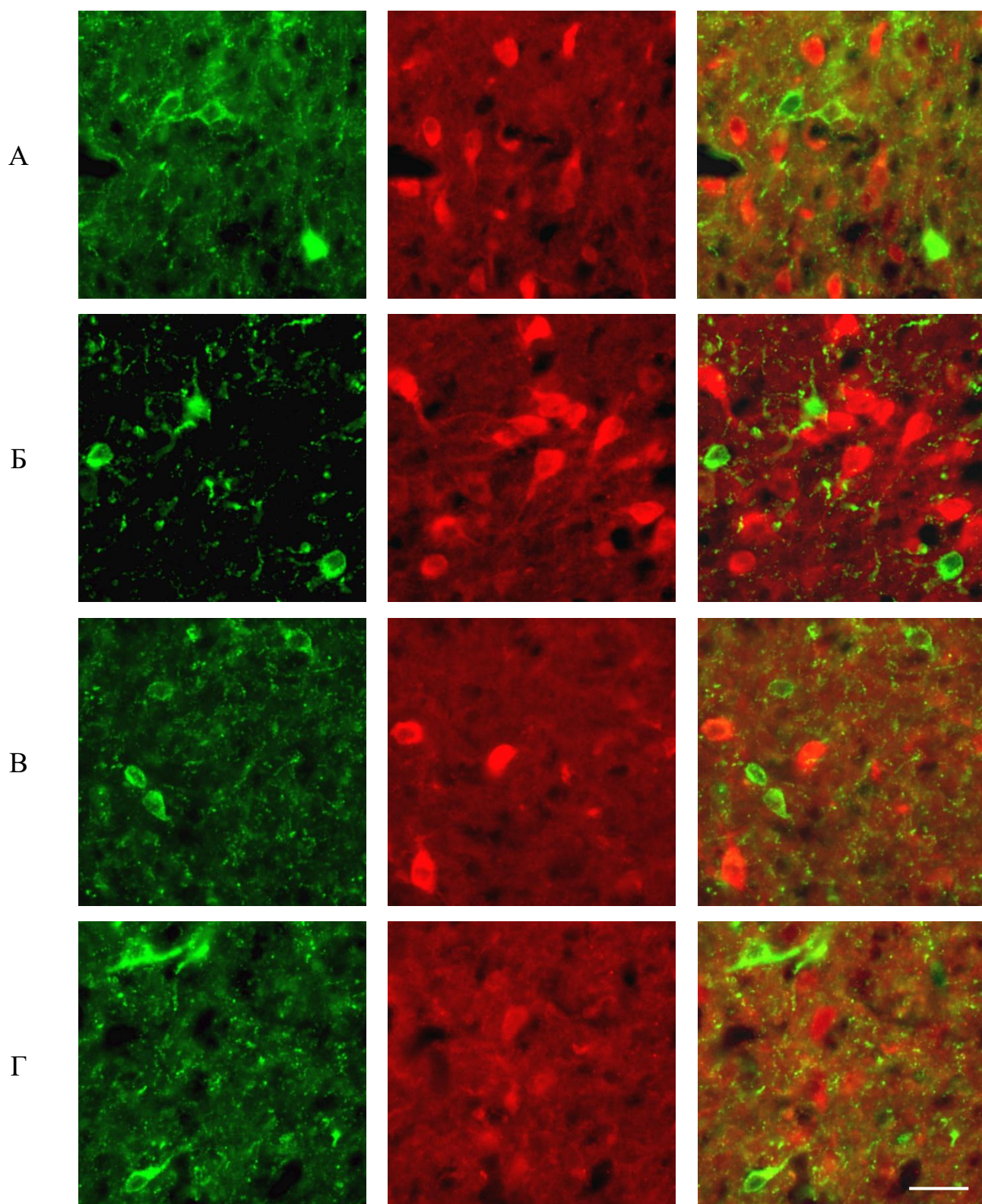
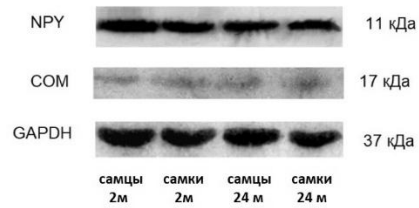


Рисунок 25 – Иммуногистохимическая реакция солокализации КБ и соматостатина. Двойное иммуномечение: КБ – СУЗ (красный, левый ряд), СОМ – FITC (зеленый, правый ряд), комбинированное изображение (правый ряд).

Нейроны с двойной меткой указаны стрелкой. Масштаб 20 мкм.

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

А



Б

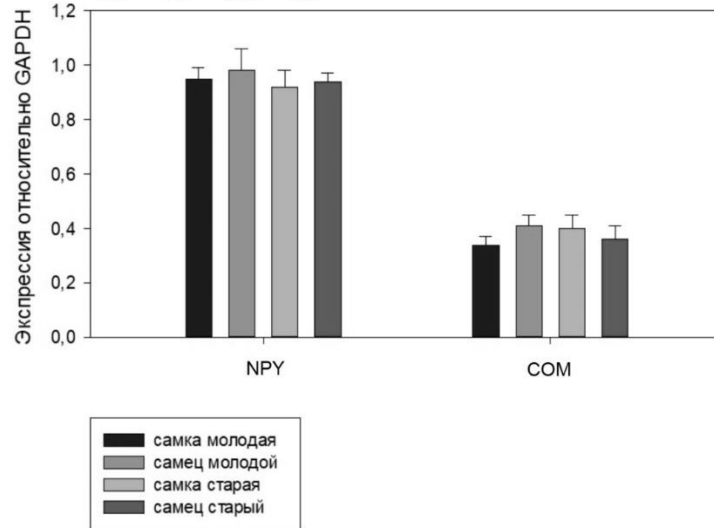


Рисунок 26 – Изменение экспрессии НPY и соматостатина в дорсомедиальном ядре у молодых и старых самцов и самок крыс.

Примечание – А – Иммуноблоттинговые полосы НPY, COM и GAPDH, Б – Изменение экспрессии НPY и COM относительно GAPDH.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе исследовалась импульсная активность нейронов ДМЯ у молодых и старых самцов и самок крыс. Во всех группах животных наблюдались нейроны с нерегулярной аритмической активностью, постоянной ритмической активностью, с широким распределением интервалов между всплесками и клетки со всплесками из двух или трех всплесков. Аналогичные группы нейронов были обнаружены в ВМЯ гипоталамуса [194]. Процент нейронов с различными паттернами разрядов не менялся в процессе старения. Однако было обнаружено снижение частоты разрядов нейронов ДМЯ с возрастом, и нейроны, разряжающиеся в стохастическом порядке и с парными или тройными импульсами, имели более высокую среднюю частоту импульсации у молодых крыс по сравнению со старыми животными.

В коре головного мозга и гиппокампе пожилых животных скорость возбуждения нейронов снижается из-за увеличения продолжительности периода следовой гиперполяризации [168, 192]. Изменения K^+ - тока, играющего важную роль в следовой гиперполяризации, могут меняться с возрастом [96]. Кроме того, снижение частоты возбуждения может быть связано с увеличением высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных запасов [162, 123]. Возрастные изменения в Ca^{2+} -буферизации могут привести к увеличению продолжительности Ca^{2+} -реакции и увеличению Ca^{2+} -зависимого K^+ -тока [168, 192, 162, 96]. Однако более высокая активность Ca^{2+} -зависимого K^+ -тока иногда может увеличивать частоту разрядов. В ПОА гипоталамуса частота спонтанных импульсов нейронов, секретирующих гонадотропин-рилизинг-гормон, снижается с возрастом. Это сопровождается повышенной вариабельностью активности [227].

Недавние данные указывают на важную роль микровоспаления гипоталамуса в процессе старения [242; 244]. Сверхактивация астроцитарного пути IKK β /NF- κ B во время воспаления в гипоталамусе приводит к укорочению тонких дистальных отростков астроцитов. Укорочение астроцитарных отростков снижает способность астроцитов поглощать ГАМК, высвобождаемый в

нейрональных синапсах, что приводит к повышению уровня ГАМК во внеклеточном пространстве, активации внесинаптических ГАМК-рецепторов на близлежащих нейронах [244]. Кроме того, сообщалось о возрастном снижении содержания глутамата в коре головного мозга и гиппокампе. Также было обнаружено снижение плотности глутаматергических N-метил-D-аспаратных (NMDA) и метаботропных рецепторов mGluRs с возрастом [204, 93]. Повышенные уровни ингибирующего медиатора ГАМК и активация ГАМКВ-рецепторов вместе с ослаблением эффективности глутаматергических сигналов, поступающих в нейроны ДМЯ, могут приводить к снижению частоты возбуждения нейронов ДМЯ при старении.

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]. Например, в нейронах префронтальной коры наблюдаются усиление торможения с возрастом [26], в то время как в сенсорных системах и гиппокампе внутрикорковое торможение снижается [193].

Данные о глутаматергической системе и ее активности в ЦНС с возрастом неоднозначны. Имеются лишь ограниченные данные о соотношении процессов возбуждения и торможения при старении в гипоталамусе. Согласно исследованиям наблюдается снижение иммунореактивности везикулярного транспортера VGLUT2 в срединном возвышении [236], а также уменьшение плотности ГАМКергических синапсов в СХЯ [172]. В СХЯ ГАМК может выступать как возбуждающий медиатор, что может указывать на дисбаланс процессов возбуждения/торможения при старении [172]. В наших предыдущих исследованиях выявлено снижение частоты возбуждения нейронов ВМЯ и ДМЯ гипоталамуса при старении, что говорит о преобладании тормозных процессов [157, 159]. Наблюдаемое усиление глутаматергической системы может являться компенсаторным процессом.

Иммуногистохимия и вестерн-блоттинг позволили идентифицировать нейроны иммунореактивные к КБ (КБ-ИР) и КР (КР-ИР), экспрессию КБ и КР в

нейронах ДМЯ гипоталамуса молодых и старых крыс. Наши данные показывают, что в ДМЯ молодых крыс подавляющее большинство КБ-ИР нейронов расположено в ДМЯв и меньшее их количество в ДМЯд. В компактной части ДМЯ – ДМЯк определялись всего несколько КБ-ИР нейронов. Нейроны иммунореактивные к КР наблюдаются в меньшем количестве в ДМЯ по сравнению с КБ-ИР нейронами у молодых крыс.

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 мышинном ВМЯ [77]. В нашем исследовании мы наблюдали больше нейронов КБ-ИР в ДМЯ у самок по сравнению с самцами. 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 $Y1$.

При исследовании солокализации КБ и КР мы обнаружили три разные группы КБ/КР-нейронов в ДМЯ гипоталамуса: только КБ-ИР нейроны; клетки, колокализирующие КБ и КР; и только КБ-ИР-нейроны. Доля нейронов, колокализирующих КБ и КР, не превышала одной трети от общего числа КБ-ИР и КР-ИР нейронов в ДМЯ у молодых и пожилых крыс. Однако степень колокализации КБ/КР различается в разных отделах центральной и периферической нервной системы. 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].

В нашем исследовании мы наблюдали связанные со старением изменения экспрессии КБ и КР в ДМЯ гипоталамуса крыс. Процент КБ-ИР нейронов уменьшался, а КР-ИР нейронов увеличивался в процессе старения. 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.

ДМЯ ядро гипоталамуса играет важную роль в контроле расхода энергии и метаболических путей. У млекопитающих в процессе старения часто происходят метаболические нарушения [73, 80] и возрастные изменения в нейронах гипоталамуса, регулирующих метаболизм [242, 118, 158].

Функциональная значимость различных изменений экспрессии КБ и КР в нейронах ДМЯ в процессе старения в настоящее время не ясна. Различные кинетические и буферные свойства кальцийсвязывающих белков могут быть связаны с характеристиками нейронов, которые их содержат. Однако некоторые исследования экспрессии генов КБ и КР показывают, что эти кальцийсвязывающие белки могут выполнять сходную функцию, и один из них может компенсировать потерю другого [35].

КБ и КР относятся к семейству белков, связывающих кальций с высокой активностью. Тем не менее, они обладают различными свойствами. Например, КБ имеет константу диссоциации, равную 393 нМ, а КР - 1,5 мкМ. Таким образом, КР можно рассматривать как модулятор кальция, а КБ – как классический кальциевый буфер [199, 82]. КР может быть вовлечен в модуляцию порога высвобождения везикулярного медиатора во время возбуждения нейронов [198].

Снижение экспрессии КБ при старении может указывать либо на то, что КБ защищает стареющие нейроны от апоптоза, либо на то, что КБ является компонентом клетки, который ускоряет процесс гибели таких нейронов. Экспериментальные исследования показали, что избыточная экспрессия КБ и КР является нейропротектором от повреждающего воздействия большого притока Ca^{2+} в течение длительных периодов высокой активности нейронов [178, 67, 112], но другие исследования не выявили никакого влияния на выживаемость нейронов [128, 42]. Экспрессия КБ была изменена в головном мозге пациентов с нейродегенеративными расстройствами [99, 190]. КБ-ИР-нейроны менее уязвимы к ишемическому повреждению, чем КР- и парвальбумин-ИР-нейроны в сетчатке кролика [129]. Однако КР-содержащие нейроны, расположенные в гиппокампе,

были более чувствительны к повышению уровня кальция по сравнению с активацией глутаматных рецепторов [156].

Глутамат и факторы роста повышают экспрессию КБ в нейронах. Активация AMPA или кайнат-глутаматного рецептора индуцирует экспрессию КБ в гиппокампе и мозжечке [133, 30]. Сообщалось, что КР локализуется совместно с глутаматным NMDA-рецептором [19]. Таким образом, связанное со старением снижение регуляции КБ и повышение экспрессии КР могут быть связаны со снижением поступления глутамата и некоторыми метаболическими изменениями, которые происходят во время старения [163].

В нашем исследовании с помощью иммуногистохимии и вестерн-блоттинга мы наблюдали связанное со старением увеличение nNOS в ДМЯ гипоталамуса крыс. Предыдущие исследования показали связанное со старением увеличение индуцибельной изоформы NOS в гипоталамусе крыс [223, 85]. Однако эти авторы не наблюдали изменений экспрессии nNOS в гипоталамусе крыс в процессе старения. Vernet et al. (1998) наблюдали небольшое статистически незначимое увеличение экспрессии nNOS во всем гипоталамусе пожилых крыс, но они не анализировали уровень белка в отдельных ядрах гипоталамуса.

Ядра гипоталамуса ДЯ, ВМЯ и ДМЯ играют важную роль в регуляции энергетического гомеостаза. Сообщалось [214], что недостаток пищи приводит к увеличению выработки NO в головном мозге, что может лежать в основе орексигенных эффектов. Однако существует противоположное наблюдение, согласно которому насыщение приводит к увеличению выработки NO в паравентрикулярных и дугообразных ядрах, латеральном и вентромедиальном гипоталамусе [98].

Возможно, снижение активности нейронов гипоталамуса, контролирующих метаболизм, может быть связано с увеличением выработки NO. Неиндуцированная активация K^+ -токов гиперполяризует мембранный потенциал нейрона, подавляя его возбудимость [132]. Сообщалось также, что NO ингибирует активность рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA), снижая действие глутамата и вызывая изменения в нервной передаче и синаптической пластичности [144].

Интересно, что большинство нейронов nNOS гипоталамуса обладают глутаматергическим фенотипом, но нейроны nNOS ДЯ, по-видимому, являются ГАМКергическими [57].

Связанная со старением потеря нейронов в головном мозге, включая гипоталамус, в некоторых работах объясняется увеличением скорости запрограммированной гибели клеток в результате окислительного и нитрозативного стресса в этих нейронах. С возрастом в головном мозге наблюдается высокий уровень активных форм кислорода и пероксинитрита, метаболита NO [41, 70]. Избыточный синтез NO ответственен за гибель клеток, или, альтернативно, повышенное высвобождение NO может быть защитным механизмом, пытающимся противодействовать апоптозу [205]. NO играет важную роль в нейродегенеративных заболеваниях, эпилепсии, воспалении и ишемии. Было замечено, что в этих условиях экспрессия и активность nNOS повышаются [109, 54]. Возможно, NO играет защитную роль при старении, а нейроны, экспрессирующие nNOS, как сообщается, более устойчивы к нейротоксическим воздействиям [70, 221, 46].

Нами были обнаружены СОМ-ИР нейроны в ДМЯ гипоталамуса крысы. Ранее присутствие СОМ было отмечено в ядрах ДЯ, ВМЯ, ДМЯ, ПВЯ взрослых крыс [175, 248, 127] и туберальном ядре взрослых мышей [142].

В ДМЯ мы отметили половые различия в отношении нейронов СОМ-ИР. В ДМЯ у самцов значительно более высокий процент нейронов СОМ-ИР, колокализирующих НПУ, по сравнению с самками во всех возрастных группах. Литературные данные также подтверждают наличие половых различий в НПУ-эргической системе ДМЯ. Диета с высоким содержанием жиров или систематический прием лептина снижали экспрессию рецепторов НПУ Y1 у самцов, но не у самок мышей [151]. Клинические наблюдения демонстрируют, что активность симпатической нервной системы при ожирении повышается у мужчин в большей степени, чем у женщин [209], что также может быть связано с НПУ-содержащими нейронами ДМЯ, которые проецируются на ПВЯ и участвуют

в регуляции пищевого поведения и, косвенно, в модуляции активности иммунной системы [37].

Согласно литературным данным, у мышей небольшая часть нейронов SOM-ИР колокализует агути-родственный пептид, но не проопиомеланокортин [53]. AgRP/НПУ являются орексигенными пептидами, в отличие от POMC, метаболиты которых оказывают анорексигенное действие [237]. SOM оказывает ингибирующее действие на нейроны, содержащие POMC, которые экспрессируют некоторые рецепторы [127]. Гипотетически, увеличение процента колокализации SOM с орексигенными пептидами (в частности, с НПУ) в нейронах способствует дисбалансу между потреблением пищи и энергетическими затратами в сторону увеличения потребления пищи и снижения энергетических затрат, что приводит к развитию ожирения и метаболического синдрома в пожилом возрасте.

Мы обнаружили, что при старении наблюдается снижение плотности НПУ-ИП-волокон в ДМЯ. Старение у крыс и человека связано с увеличением массы тела и висцеральным ожирением [80]. В нейронах гипоталамуса, контролирующих метаболизм, происходят возрастные изменения [118]. Активность анорексигенных нейронов POMC значительно снижается в ДЯ у пожилых мышей [234], а уровень белка НПУ в ДЯ снижается у пожилых крыс [122]. В то же время литературные данные также указывают на то, что NO и НПУ оказывают провоспалительное действие на нервную систему [60, 216].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведен комплексный анализ функциональных изменений в дорсомедиальном ядре гипоталамуса при старении. Выявлены основные паттерны фоновой электрической активности нейронов у животных разного пола. Результаты исследования показывают, 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.

При старении изменяется нейрохимический состав нейронов ДМЯ, сопровождающийся нарушением кальциевого сигналинга и увеличением экспрессии nNOS. При этом в нейронах уменьшается количество кальбиндина и увеличивается количество кальретинина. В отличие от ГАМК и глутамата, содержание нейропептидов соматостатина и нейропептида Y в ядре при старении не изменяется.

Анализ половых различий показал, что 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.

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 ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ – адренотропный гормон

ВИП – вазоинтестинальный полипептид

ВМЯ – вентромедиальное ядро

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГнРГ – гонадотропин-рилизинг-гормона

ГР – гормон роста

ДМЯ – дорсомедиальное ядро

ДМЯв – дорсомедиальное ядро гипоталамуса, вентральная часть

ДМЯд – дорсомедиальное ядро гипоталамуса, дорсальная часть

ДМЯк – дорсомедиальное ядро гипоталамуса, компактная часть

ДЯ – дугообразное (аркуатное) ядро

ИР – иммунореактивный

ИФР-1 – инсулиноподобный фактор роста

КБ – кальбиндин

КР – кальретинин

ЛГ – латеральный гипоталамус

МПП – мембранный потенциал покоя

МСГ – меланоцитстимулирующий гормон

НПУ – нейропептид Y

ПВЯ – паравентрикулярное ядро

ПОА – преоптическая область

СОМ – соматостатин

СОЯ – супраоптическое ядро

СХЯ – супрахиазматическое ядро

ТМЯ – туберомамиллярное ядро

ТПСП – тормозный постсинаптический потенциал

ХЦК – холецистокинин

AgRP – агути-родственный пептид

AHP – постгиперполяризация

CART – транскрипт, регулируемый кокаином и амфетамином

CY3– индокарбоцианин

FITC – флюоресцеин-изотиоцианат

GAD65/67 – глутаматдекарбоксилаза

KATP – АТФ-чувствительный калиевый канал

LTP – долговременная потенция

nNOS – нейрональная NO-синтаза

PBS – стандартный фосфатно-солевой буфер

POMC – проопиомеланокортин

SF1 – стероидогенный фактор

VGLUT2 – везикулярный переносчик глутамата

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдрашитова, А. Т. Нарушение регуляции апоптоза при старении / А. Т. Абдрашитова, И. А. Белолапенко, Т. Н. Панова – Текст : непосредственный // Астраханский медицинский журнал. – 2010. – №2. – С. 27-32.
2. Анисимов, В. Н. Можно ли получить однозначный ответ на вопрос: существует ли программа старения? / В. Н. Анисимов – Текст : непосредственный // Российский Химический Журнал (ЖРХО им. Д. И. Менделеева). – 2009. – Т. 53, № 3. – С. 10-20.
3. Анисимов, В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В. Н. Анисимов. – Санкт-Петербург : Наука, 2008. – 468 с. – Текст : непосредственный.
4. Анисимов, В. Н. Основные принципы построения многостадийной многоуровневой математической модели старения / В. Н. Анисимов, А. И. Михальский, В. Н. Новосельцев, А. А. Романюха, А. И. Яшин – Текст : непосредственный // Успехи геронтологии. – 2010. – № 23. – С. 163-167.
5. Ашмарин, И. П. Нейрохимия / И. П. Ашмарин., П. В. Стукалов – Москва : Издательство ИБМХ РАН, 1996. – 469 с. – Текст : непосредственный.
6. Баба-Заде, С. Н. Геронтология сегодня / С. Н. Баба-Заде, Т. М. Гусейнов – Текст : непосредственный // Биомедицина (Баку). – 2015. – №3. – С.3-9
7. Дильман, В. М. Большие биологические часы: (Введение в интегральную медицину) / В. М. Дильман – Москва : Знание, 1981. – 286 с. – Текст : непосредственный.
8. Ковальзон, В. М. Нейрохимические механизмы регуляции сна и бодрствования: роль блокаторов гистаминовых рецепторов в лечении инсомнии / В. М. Ковальзон, К. Н. Стрыгин – Текст : непосредственный // Эффективная фармакотерапия. – 2013. – №. 12. – С. 8-14.
9. Кузнецова, Л. А. Нейрональная NO-синтаза в патогенезе метаболического синдрома / Л. А. Кузнецова, Н. Е. Басова, А. О. Шпаков– Текст :

непосредственный // Сибирский научный медицинский журнал. – 2022. – Т.42, №4. – С. 33-48.

10. Маслюков, П. М. Возрастные особенности экспрессии кальций-связывающих белков в нейронах ганглиев автономной нервной системы / П. М. Маслюков, А. Д. Ноздрачев, А. И. Емануйлов – Текст : непосредственный // Успехи геронтологии. – 2016. – Т. 29, № 2. – С. 247-253.

11. Маслюков, П. М. Гипоталамические механизмы регуляции старения / П. М. Маслюков, А. Д. Ноздрачев – Текст : непосредственный // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2021. – Т.57, № 3. – С. 224-239.

12. Моисеев, К. Ю. Изменения экспрессии стероидогенного фактора 1 (SF-1) в нейронах вентромедиального ядра гипоталамуса крыс при старении / К. Ю. Моисеев, А. А. Спиричев, П. А. Вишнякова, А. Д. Ноздрачев, П. М. Маслюков – Текст : непосредственный // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2020. – Т. 106, № 6. – С. 720-727.

13. Ноздрачев, А. Д. Нейропептид Y и автономная нервная система / А. Д. Ноздрачев, П. М. Маслюков – Текст : непосредственный // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2011. – Т. 47., № 2. – С. 105-112.

14. Фролькис, В. В. Старение мозга / В. В. Фролькис – Ленинград : Наука, 1991. – 168 с. – Текст : непосредственный.

15. Шпаков, А. О. Меланокортиновая сигнальная система гипоталамуса и ее функциональное состояние в условиях сахарного диабета 2-го типа и метаболического синдрома / А. О. Шпаков, К. В. Деркач – Текст : непосредственный // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2016. – Т.102, № 1. – С. 18-40.

16. Acosta-Galvan G. Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior / G. Acosta-Galvan, C. -X. Yi, J. van der Vliet, J. H. Jhamandas, P. Panula, M. Angeles-Castellanos, M. del Carmen Basualdo, C. Escobar, R. M. Buijs – Text : visual // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – V.108, № 14. – P. 5813-5818.

17. Ahn, J. H. Immunoreactivities of calbindin-D28k, calretinin and parvalbumin in the somatosensory cortex of rodents during normal aging / J. H. Ahn, S. Hong, J. H. Park, I. H. Kim, J. H. Cho, T. K. Lee, J. C. Lee, B. H. Chen, B. N. Shin, E. J. Bae, Y. H. Jeon, Y. M. Kim, M. H. Won, S. Y. Choi – Text : visual // *Molecular Medicine Reports*. – 2017. – V. 16, № 5. – P. 7191-7198.
18. Andressen, C. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells / C. Andressen, I. Blumcke, M. R. Celio – Text : visual // *Cell and Tissue Research*. – 1993. – V. 271, № 2. – P. 181-208.
19. Araki, C. M. Calretinin co-localizes with the NMDA receptor subunit NR1 in cholinergic amacrine cells of the rat retina / C. M. Araki, D. E. Hamassaki-Britto – Text : visual // *Brain Research*. – 2000. – V. 869, № 1-2. – P. 220-224.
20. Ashpole, N. M. Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging brain / N. M. Ashpole, J. E. Sanders, E. L. Hodges, H. Yan, W. E. Sonntag – Text : visual // *Experimental Gerontology*. – 2015. – V. 68. – P. 76-81.
21. Aston-Jones, G. A neural circuit for circadian regulation of arousal / G. Aston-Jones, S. Chen, Y. Zhu, M. L. Oshinsky – Text : visual // *Nature Neuroscience*. – 2001. – V. 4, № 7. – P. 732-738.
22. Aujard, F. Attenuated effect of increased daylength on activity rhythm in the old mouse lemur, a non-human primate / F. Aujard, F. Cayetanot, J. Terrien, E. J. Van Someren – Text : visual // *Experimental Gerontology*. – 2007. – V. 42, № 11. – P.1079-1087.
23. Avelaira, C. A. Neuropeptide Y stimulates autophagy in hypothalamic neurons / C. A. Avelaira, M. Botelho, S. Carmo-Silva, J. F. Pascoal, M. Ferreira-Marques, C. Nobrega, L. Cortes, J. Valero, L. Sousa-Ferreira, A. R. Alvaro, M. Santana, S. Kugler, L. Pereira de Almeida, C. Cavadas – Text : visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – V. 112, № 13. – P. 1642-1651.
24. Bahadoran, Z. Nitric oxide: to be or not to be an endocrine hormone? / Z. Bahadoran, M. Carlström, P. Mirmiran, A. Ghasemi – Text : visual // *Acta Physiologica*. – 2020. – V. 229, № 1. – e13443.

25. Balasubramaniam, A. Neuropeptide Y family of hormones: receptor subtypes and antagonists / A. Balasubramaniam – Text : visual // Peptides. – 1997. – V. 18. – P. 445-457.
26. Bañuelos, C. Prefrontal cortical GABAergic dysfunction contributes to age-related working memory impairment / C. Bañuelos, B. S. Beas, J. A. McQuail, R. J. Gilbert, C. J. Frazier, B. Setlow, J. L. Bizon – Text : visual // Journal of Neuroscience. – 2014. – V. 34, № 10. – P. 3457-3466.
27. Bao, Q. Aging and age-related diseases—from endocrine therapy to target therapy / Q. Bao, J. Pan, H. Qi, L. Wang, H. Qian, F. Jiang, Z. Shao, F. Xu, Z. Tao, Q. Ma, P. Nelson, X. Hu – Text : visual // Molecular and Cellular Endocrinology. – 2014. – V. 394, № 1-2. – P. 115-118.
28. Baroncini, M. MRI atlas of the human hypothalamus / M. Baroncini, P. Jissendi, E. Balland, P. Besson, J. P. Pruvo, J. P. Francke, D. Dewailly, S. Blond, V. Prevot – Text : visual // Neuroimage. – 2012. – V. 59, №1. – P. 68-80.
29. Barrios, V. Leptin Modulates the Response of Brown Adipose Tissue to Negative Energy Balance: Implication of the GH/IGFI Axis / V. Barrios, L. M. Frago, S. Canelles, S. Guerra-Cantera, E. Arilla-Ferreiro, J. A. Chowen, J. Argente – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22, № 6. – P. 2827.
30. Batini, C. Upregulation of calbindin-D28k immunoreactivity by excitatory amino acids / C. Batini, M. Guegan, M. Palestini, M. Thomasset, R. Vigot – Text : visual // Archives Italiennes de Biologie. – 1997. – V.135. – P. 385-397.
31. Bechtold, D. A. Hypothalamic clocks and rhythms in feeding behavior / D. A. Bechtold, A. S. I. Loudon – Text : visual // Trends in Neurosciences. – 2013. – V. 36. – P. 74-82.
32. Belekhova, M. G. Selective specificity of calcium-binding proteins calbindin and calretinin expression in the magnocellular neurosecretory hypothalamic nuclei of tortoises and turtles / M. G. Belekhova, N. B. Kenigfest, E. V. Chernigovskaya, N. P. Veselkin – Text : visual // Doklady Biological Sciences. – 2017. – V. 473. – P. 80-83.
33. Berggård, T. Calbindin D28k exhibits properties characteristic of a Ca²⁺ sensor / T. Berggård, S. Miron, P. Onnerfjord, E. Thulin, K. S. Akerfeldt, J. J. Enghild, M.

- Akke, S. Linse – Text : visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277, № 19. – P. 16662-16672.
34. Bergman, E. Neuropeptides, nitric oxide synthase and GAP-43 in B4-binding and RT97 immunoreactive primary sensory neurons: normal distribution pattern and changes after peripheral nerve transection and aging / E. Bergman, K. Carlsson, A. Liljeborg, E. Manders, T. Hökfelt, B. Ulfhake – Text : visual // *Brain Research*. – 1999. – V. 832, № 1-2. – P. 63-83.
35. Bhoyar, R. C. Knockdown of calcium-binding calb2a and calb2b genes indicates the key regulator of the early development of the zebrafish, *Danio rerio* / R. C. Bhoyar, A. G. Jadhao, A. Sabharwal, G. Ranjan, S. Sivasubbu, C. Pinelli – Text : visual // *Brain Structure and Function*. – 2019. – V.224, № 2. – P. 627-642.
36. Bi, S. Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression / S. Bi, B. M. Robinson, T. H. Moran – Text : visual // *American journal of physiology Regulatory integrative and comparative physiology*. – 2003. – V. 285, №5. – P. 1030-1036.
37. Bi, S. Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control / S. Bi, Y. J. Kim, F. Zheng – Text : visual // *Neuropeptides*. – 2012. – V 46, № 6. – P. 309-314.
38. Blackmore, D. G. The multiple roles of GH in neural ageing and injury / D. G. Blackmore, M. J. Waters – Text : visual // *Frontiers in Neuroscience*. – V. 7, № 17. – P. 1082449.
39. Bogus-Nowakowska, K. Ontogeny of Neurons Containing Calcium-Binding Proteins in the Preoptic Area of the Guinea Pig: Sexually Dimorphic Development of Calbindin / K. Bogus-Nowakowska – Text : visual // *Developmental Neurobiology*. – 2019. – V. 79, № 2. – P. 175-201.
40. Bonavera, J. J. Evidence in support of nitric oxide (NO) involvement in the cyclic release of prolactin and LH surges / J. J. Bonavera, A. Sahu, P. S. Kalra, S. P. Kalra – Text : visual // *Brain Research*. – 1994. – V. 660. – P. 175-179.
41. Bossy-Wetzel, E. Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels / E. Bossy-Wetzel, M. V. Talantova, W. D. Lee, M. N. Schölzke, A. Harrop, E. Mathews, T.

- Götz, J. Han, M. H. Ellisman, G. A. Perkins, S. A. Lipton – Text : visual // *Neuron*. – 2004. – V. 4, № 3. – P. 351-365.
42. Bouilleret, V. Neurodegenerative and morphogenic changes in a mouse model of temporal lobe epilepsy do not depend on the expression of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, or calretinin / V. Bouilleret, B. Schwaller, S. Schurmans, M. R. Celio, J. M. Fritschy – Text : visual // *Neuroscience*. – 2000. – V. 97. – P. 47-58.
43. Braak, H. Anatomy of the human hypothalamus (chiasmatic and tuberal region) / H. Braak, E. Braak – Text : visual // *Progress in Brain Research*. – 1992. – V. 93. – P. 3-14.
44. Braak, H. The hypothalamus of the human adult: chiasmatic region / H. Braak, E. Braak – Text : visual // *Anatomy and Embryology*. – 1987. – V.175, № 3. – P. 15-30.
45. Brown, C.H. Somato-dendritic vasopressin and oxytocin secretion in endocrine and autonomic regulation / C.H. Brown, M. Ludwig, J. G. Tasker, J. E. Stern – Text : visual // *Journal of Neuroendocrinology*. – 2020. – V. 32, № 6. – e12856.
46. Brown, G.C. Nitric oxide and neuronal death / G. C. Brown – Text : visual // *Nitric Oxide*. – 2010. – V. 23, № 3. – P. 153-165.
47. Bruining, H. Measurement of excitation-inhibition ratio in autism spectrum disorder using critical brain dynamics / H. Bruining, R. Hardstone, E. L. Juarez-Martinez, J. Sprengers, A. E. Avramiea, S. Simpraga, S. J. Houtman, S. S. Poil, E. Dallares, S. Palva, B. Oranje, J. Matias Palva, H. D. Mansvelder, K. Linkenkaer-Hansen – Text : visual // *Scientific reports*. – 2020. – V. 10, № 1. – P. 9195.
48. Buijink, M. R. A multi-level assessment of the bidirectional relationship between aging and the circadian clock / M. R. Buijink, S. Michel – Text : visual // *Journal of neurochemistry*. – 2021. – V.157, №1. – P. 73-94.
49. Buijink, M. R. Aging Affects the Capacity of Photoperiodic Adaptation Downstream from the Central Molecular Clock / M. R. Buijink, A. H. O. Olde Engberink, C. B. Wit, A. Almog, J. H. Meijer, J. H. T. Rohling, S. Michel – Text : visual // *Journal of Biological Rhythms*. – 2020. – V. 35, № 2. – P. 167-179.

50. Burgoyne, R. D. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling / R. D. Burgoyne – Text : visual // Nature Reviews Neuroscience. – 2007. – V. 8. – P. 182-193.
51. Cai, D. "Hypothalamic Microinflammation" Paradigm in Aging and Metabolic Diseases / D. Cai, S. Khor – Text : visual // Cell Metabolism. – 2019. – V. 30. – P. 19-35.
52. Cai, D. Hypothalamic microinflammation / D. Cai, S. Khor – Text : visual // Handbook of Clinical Neurology. – 2021. – V. 181. – P. 311-322.
53. Campbell, J. N. A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types / J. N. Campbell, E. Z. Macosko, H. Fenselau, T. H. Pers, A. Lyubetskaya, D. Tenen, M. Goldman, A. M. Verstegen, J. M. Resch, S. A. McCarroll, E. D. Rosen, B. B. Lowell, L. T. Tsai – Text : visual // Nature Neuroscience. 2017. – V. 20, № 3. – P. 484-496.
54. Carletti, F. Cannabinoid and nitric oxide signaling interplay in the modulation of hippocampal hyperexcitability: study on electrophysiological and behavioral models of temporal lobe epilepsy in the rat / F. Carletti, G. Gambino, V. Rizzo, G. Ferraro, P. Sardo – Text : visual // Neuroscience. – 2015. – V. 303. – P. 149-159.
55. Cayetanot, F. Argininevasopressin and vasointestinal polypeptide rhythms in the suprachiasmatic nucleus of the mouse lemur reveal aging-related alterations of circadian pacemaker neurons in a non-human primate / F. Cayetanot, M. Bentivoglio, F. Aujard – Text : visual // European Journal of Neuroscience. – 2005. – V. 22, № 4. – P. 902-910.
56. Celio, M. R. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system / M. R. Celio – Text : visual // Neuroscience. – 1990. – V. 35. – P. 375-475.
57. Chachlaki, K. Nitric oxide signalling in the brain and its control of bodily functions / K. Chachlaki, V. Prevot – Text : visual // British journal of pharmacology. – 2019. – V. 177, № 24. – P. 5437-5458.
58. Chachlaki, K. Phenotyping of nNOS neurons in the postnatal and adult female mouse hypothalamus / K. Chachlaki, S. A. Malone, E. Qualls-Creekmore, E. Hrabovszky, H. Münzberg, P. Giacobini, F. Ango, V. Prevot – Text : visual // Journal of Comparative Neurology. – 2017. – V. 525, № 15. – P. 3177-3189.

59. Chachlaki, K. The gentle art of saying NO: how nitric oxide gets things done in the hypothalamus / K. Chachlaki, J. Garthwaite, V. Prevot – Text : visual // *Nature Reviews Endocrinology*. – 2017. – V. 13, № 9. – P. 521-535.
60. Chandrasekharan, B. Emerging neuropeptide targets in inflammation: NPY and VIP / B. Chandrasekharan, B. G. Nezami, S. Srinivasan – Text : visual // *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. – 2013. – V. 304, № 11. – P. 949-957.
61. Chellappa, K. Hypothalamic mTORC2 is essential for metabolic health and longevity / K. Chellappa, J. A. Brinkman, S. Mukherjee, M. Morrison, M. I. Alotaibi, K. A. Carbajal, A. L. Alhadeff, I. J. Perron, R. Yao, C. S. Purdy, D. M. DeFelice, M. H. Wakai, J. Tomasiewicz, A. Lin, E. Meyer, Y. Peng, S. I. Arriola Apelo, L. Puglielli, J. N. Betley, G. K. Paschos, J. A. Baur, D. W. Lamming – Text : visual // *Aging Cell*. – 2019. – V. 18, № 5. – e13014.
62. Chen, C.Y. Effects of aging on circadian patterns of gene expression in the human prefrontal cortex / C. Y. Chen, R. W. Logan, T. Ma, D. A. Lewis, G. C. Tseng, E. Sibille, C. A. McClung – Text : visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2016. – V. 113, № 1. – P. 206-211.
63. Chen, K.S. A hypothalamic switch for REM and non-REM sleep / K. S. Chen, M. Xu, Z. Zhang, W. -C. Chang, T. Gaj, D. V. Schaffer, Y. Dan – Text : visual // *Neuron*. – 2018. – V. 97. – P. 1168-1176.
64. Chou, T.C Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms / T. C. Chou, T. E. Scammell, J. J. Gooley, S. E. Gaus, C. B. Saper, J. Lu – Text : visual // *Journal of Neuroscience*. – 2003. V. 23, № 33. – P. 10691-10702.
65. Colwell, C. S. Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN / C. S. Colwell – Text : visual // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2011. – V. 12. – P. 553-569.
66. Corns, R. A. Decreased calbindin-D28k immunoreactivity in aged rat sympathetic pelvic ganglionic neurons / R. A. Corns, U. V. Boolaky, R. M. Santer – Text : visual // *Neuroscience Letters*. – 2000. – V. 292. – P. 91-94.

67. D'Orlando, C. Calretinin and calbindin D-28k, but not parvalbumin protect against glutamate-induced delayed excitotoxicity in transfected N18-RE 105 neuroblastoma-retina hybrid cells / C. D'Orlando, M. R. Celio, B. Schwaller – Text : visual // *Brain Research*. – 2002. – V. 945. – P. 181-190.
68. Dacks, P.A. Role of the hypothalamus in mediating protective effects of dietary restriction during aging / P. A. Dacks, C. L. Moreno, E. S. Kim, B. K. Marcellino, C. V. Mobbs – Text : visual // *Frontiers in Neuroendocrinology*. – 2013. – V. 34, № 2. – P. 95-106.
69. D'Anglemont de Tassigny, X. Coupling of neuronal nitric oxide synthase to NMDA receptors via postsynaptic density-95 depends on estrogen and contributes to the central control of adult female reproduction / X. D'Anglemont de Tassigny, C. Campagne, B. Dehouck, D. Leroy, G. R. Holstein, J. C. Beauvillain, V. Buée-Scherrer, V. Prevot – Text : visual // *Journal of Neuroscience*. – 2007. – V. 27. – P. 6103-6114.
70. Dawson, T.M. Nitric oxide signaling in neurodegeneration and cell death / T. M. Dawson, V. L. Dawson – Text : visual // *Advances in Pharmacology*. – 2018. – V. 82. – P. 57-83.
71. Dhillon, H. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis / H. Dhillon, J. M. Zigman, C. Ye, C. E. Lee, R. A. McGovern, V. Tang, C. D. Kenny, L. M. Christiansen, R. D. White, E. A. Edelstein, R. Coppari, N. Balthasar, M. A. Cowley, S. Jr. Chua, J. K. Elmquist, B. B. Lowell – Text : visual // *Neuron*. – 2006. – V. 49, № 2. – P. 191-203.
72. Dilman, V. M. Hypothalamic mechanisms of ageing and of specific age pathology – I. Sensitivity threshold of hypothalamo-pituitary complex to homeostatic stimuli in the reproductive system / V. M. Dilman, V. N. Anisimov – Text : visual // *Experimental Gerontology*. – 1979. – V. 14. – P. 161-174.
73. Dilman, V. M. Neuroendocrine-ontogenetic mechanism of aging: toward an integrated theory of aging / V. M. Dilman, S. Y. Revskoy, A. G. Golubev – Text : visual // *International Review of Neurobiology*. – 1986. – V. 28. – P. 89-156.

74. Dimicco, J. A. The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation / J. A. Dimicco, D. V. Zaretsky – Text : visual // *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. – 2007. – V.292, №1. – P. 47-63.
75. Dudas, B. Human Hypothalamus: Anatomy, Functions and Disorders / B. Dudas (Ed.) – New York: Nova Science Publishers, 2013. – 459 p. – Text : visual
76. Dufourny, L. Neuroanatomical connections between kisspeptin neurones and somatostatin neurones in female and male rat hypothalamus: a possible involvement of SSTR1 in kisspeptin release / L. Dufourny, O. Delmas, A. P. TeixeiraGomes, C. Decourt, J. H. Sliwowska – Text : visual // *Journal of Neuroendocrinology*. – 2018. – V. 15. – P. e12593.
77. Edelman, M. Neuronal nitric oxide synthase and calbindin delineate sex differences in the developing hypothalamus and preoptic area / M. Edelman, C. Wolfe, E. M. Scordalakes, E. F. Rissman, S. Tobet – Text : visual // *Developmental Neurobiology*. – 2007. – V. 67. – P. 1371-1381.
78. Eghlidi, D. H. Gene expression profiling of the SCN in young and old rhesus macaques / D. H. Eghlidi, S. L. Luna, D. I. Brown, V. T. Garyfallou, S. G. Kohama, H. F. Urbanski – Text : visual // *Journal of Molecular Endocrinology*. – 2018. – V. 61, № 2. – P. 57-67.
79. Elias, C. F. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus / C. F. Elias, C. E. Lee, J. F. Kelly, R. S. Ahima, M. Kuhar, C. B. Saper, J. K. Elmquist – Text : visual // *Journal of Comparative Neurology*. – 2001. – V. 432, №1. – P.1-19.
80. Escrivá, F. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity / F. Escrivá, M. L. Gavete, Y. Fermín, C. Pérez, N. Gallardo, C. Alvarez, A. Andrés, M. Ros, J. M. Carrascosa – Text : visual // *Journal of Endocrinology*. – 2007. – V. 194, № 1. – P. 131-141.
81. Faber, C. L. Distinct neuronal projections from the hypothalamic ventromedial nucleus mediate glycemic and behavioral effects / C. L. Faber, M. E. Matsen, K. R. Velasco, V. Damian, B. A. Phan, D. Adam, G. J. Morton – Text : visual // *Diabetes*. – 2018. – V. 67, № 12. – P. 2518-2529.

82. Fairless, R. Calcium-binding proteins as determinants of central nervous system neuronal vulnerability to disease / R. Fairless, S. K. Williams, R. Diem – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – V.20. – E2146.
83. Farajnia, S. Age-related changes in large-conductance calcium-activated potassium channels in mammalian circadian clock neurons / S. Farajnia, J. H. Meijer, S. Michel – Text : visual // Neurobiology of Aging. – 2015. – V. 36, № 6. – P. 2176-2183.
84. Farajnia, S. Evidence for neuronal desynchrony in the aged suprachiasmatic nucleus clock / S. Farajnia, S. Michel, T. Deboer, H. T. vanderLeest, T. Houben, J. H. Rohling, A. Ramkisoensing, R. Yasenkov, J. H. Meijer – Text : visual // The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. – 2012. – V. 32, № 17. – P. 5891-5899.
85. Ferrini, M. Aging-related increased expression of inducible nitric oxide synthase and cytotoxicity markers in rat hypothalamic regions associated with male reproductive function / M. Ferrini, C. Wang, R. S. Swerdloff, A. P. Sinha Hikim, J. Rajfer, N. F. Gonzalez-Cadavid – Text : visual // Neuroendocrinology. – 2001. – V. 74, № 1. – P. 1-11.
86. Fiallos-Estrada, C. E. Long-lasting increase of nitric oxide synthase immunoreactivity, NADPH-diaphorase reaction and c-JUN co-expression in rat dorsal root ganglion neurons following sciatic nerve transection / C. E. Fiallos-Estrada, W. Kummer, B. Mayer, R. Bravo, M. Zimmermann, T. Herdegen – Text : visual // Neuroscience Letters. – 1993. – V. 150. – P. 169-173.
87. Flood, D. G. Dendritic regression dissociated from neuronal death but associated with partial deafferentation in aging rat supraoptic nucleus / D. G. Flood, P. D. Coleman – Text : visual // Neurobiology of Aging. – 1993. – V. 14. – P. 575-587.
88. Foo, K. S. Expression and colocalization patterns of calbindin-D28k, calretinin and parvalbumin in the rat hypothalamic arcuate nucleus / K. S. Foo, A. Hellysaz, C. Broberger – Text : visual // Journal of Chemical Neuroanatomy. – 2014. – V. 61-62. – P. 20-32.

89. Fortin, M. Distribution of calretinin, calbindin-D28K and parvalbumin in the hypothalamus of the squirrel monkey / M. Fortin, A. Parent – Text : visual // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 1997. – V. 14. – P. 51-61.
90. Garfield, A. S. Dynamic GABAergic afferent modulation of AgRP neurons / A. S. Garfield, B. P. Shah, C. R. Burgess, M. M. Li, C. Li, J. S. Steger, J. C. Madara, J. N. Campbell, D. Kroeger, T. E. Scammell, B. A. Tannous, M. G. Jr. Myers, M. L. Andermann, M. J. Krashes, B. B. Lowell – Text : visual // *Nature Neuroscience*. – 2016. – V. 19, № 12. – P. 1628-1635.
91. Gooley, J. J. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms / J. J. Gooley, A. Schomer, C. B. Saper – Text : visual // *Nature Neuroscience*. – 2006. – V. 9, № 3. – P. 398–407.
92. Gray, H. *Anatomy of the human body* / H. Gray – Philadelphia: Lea & Febiger; 1918. – 1364 p. – Text : visual
93. Griego, E. Metabotropic glutamate receptors at the aged mossy fiber -CA3 synapse of the hippocampus / E. Griego, E. J. Galv'an – Text : visual // *Neuroscience*. – 2021. – V. 456. – P. 95-105.
94. Guilding, C. A riot of rhythms: neuronal and glial circadian oscillators in the mediobasal hypothalamus / C. Guilding, A. T. L. Hughes, T. M. Brown, S. Namvar, H. D. Piggins – Text : visual // *Molecular Brain*. – 2009. – V.2, № 1. – P. 28.
95. Hanchate, N.K. Kisspeptin-GPR54 signaling in mouse NOSynthesizing neurons participates in the hypothalamic control of ovulation / N. K. Hanchate, J. Parkash, N. Bellefontaine, D. Mazur, W. H. Colledge, X. d'Anglemon de Tassigny, V. Prevot – Text : visual // *Journal of Neuroscience*. – 2012. – V. 32. – P. 932-945.
96. Harvey, J. R. M. Ion channels controlling circadian rhythms in suprachiasmatic nucleus excitability / J. R. M. Harvey, A. E. Plante, A. L. Meredith – Text : visual // *Physiological Reviews*. – 2020. – V. 100. – P. 1415-1454.
97. Hastings, M. H. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus / M. H. Hastings, E. S. Maywood, M. Brancaccio – Text : visual // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2018. – V. 19, № 8. – P. 453-469.

98. Hazut, N. Nitric oxide and l-arginine regulate feeding in satiated rats / N. Hazut, K. Rapps, D. A. Kristt, A. J. Susswein, A. Weller – Text : visual // *Appetite*. – 2019. – V. 132. – P. 44-54.
99. Heizmann, C. W. Changes in Ca (2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders / C. W. Heizmann, K. Braun – Text : visual // *Trends Neuroscience*. – 1992. – V. 15. – P. 259-264.
100. Hellier, V. Female sexual behavior in mice is controlled by kisspeptin neurons / V. Hellier, O. Brock, M. Candlish, E. Desroziers, M. Aoki, C. Mayer, R. Piet, A. Herbison, W. H. Colledge, V. Prévot, U. Boehm, J. Bakker – Text : visual // *Nature Communications*. – 2018. – V. 9 – P. 400.
101. Henderson, L. A. The role of the dorsomedial and ventromedial hypothalamus in regulating behaviorally coupled and resting autonomic drive / L. A. Henderson, V. G. Macefield – Text : visual // *Handbook of Clinical Neurology*. – 2021– V. 180. – P. 187-200.
102. Hermans, L. Brain GABA levels are associated with inhibitory control deficits in older adults / L. Hermans, I. Leunissen, L. Pauwels, K. Cuypers, R. Peeters, N. A. J. Puts, R. A. E. Edden, S. P. Swinnen – Text : visual // *Journal of Neuroscience*. – 2018. – V. 38, № 36. – P. 7844-7851.
103. Hill, J. W. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction / J. W. Hill, J. K. Elmquist, C. F. Elias – Text : visual // *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. – 2008. – V. 294, № 5. – P. 827-832.
104. Hirschberg, P. R. Ventromedial hypothalamus glucose-inhibited neurones: A role in glucose and energy homeostasis? / P. R. Hirschberg, P. Sarkar, S. B. Teegala, V. H. Routh – Text : visual // *Journal of Neuroendocrinology*. – 2020. – V. 32, № 1. – P. e12773.
105. Hodges, G. J. Neuropeptide Y and neurovascular control in skeletal muscle and skin / G. J. Hodges, D. N. Jackson, L. Mattar, J. M. Johnson, J. K. Shoemaker – Text : visual // *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. – 2009. – V. 297. – P. 546-555.

106. Hof, P. R. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns / P. R. Hof, I. I. Glezer, F. Condé, R. A. Flagg, M. B. Rubin, E. A. Nimchinsky, D. M. Vogt Weisenhorn – Text : visual // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 1999. – V. 16. – P. 77-116.
107. Hrabovszky, E. New Perspectives for Anatomical and Molecular Studies of Kisspeptin Neurons in the Aging Human Brain / E. Hrabovszky, S. Takacs, B. Gocz, K. Skrapits – Text : visual // *Neuroendocrinology*. – 2019. – V. 109, № 3. – P. 230–241.
108. Hsu, H. K. Hypothalamic neuron number of the old female rats / H. K. Hsu, M. - T. Peng – Text : visual // *Gerontology*. – 1978. – V. 24. – P. 434-440.
109. Iadecola, C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage / C. Iadecola, F. Zhang, X. Xu – Text : visual // *American Journal of Physiology*. – 1995. – V. 268, № 1 Pt 2. – P. 286-292.
110. Ito, Y. GABA type B receptor signaling in proopiomelanocortin neurons protects against obesity, insulin resistance, and hypothalamic inflammation in male mice on a high-fat diet / Y. Ito, R. Banno, M. Shibata, K. Adachi, S. Hagimoto, D. Hagiwara, Y. Ozawa, M. Goto, H. Suga, Y. Sugimura, B. Bettler, Y. Oiso, H. Arima – Text : visual // *Journal of Neuroscience*. – 2013. – V. 33, № 43. – P. 17166-71713.
111. Jung, J. Alterations in nitric oxide synthase in the aged CNS / J. Jung, C. Na, Y. Huh – Text : visual // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2012. – P. 1-7.
112. Jung, S. Buffering of cytosolic calcium plays a neuroprotective role by preserving the autophagy-lysosome pathway during MPP⁺-induced neuronal death / S. Jung, Y. Chung, Y. Lee, Y. Lee, J. W. Cho, E. J. Shin, H. C. Kim, Y. J. Oh – Text : visual // *Cell Death Discovery*. – 2019. – V. 5. – P. 130.
113. Kammel, L. G. Selective sexual differentiation of neurone populations may contribute to sex-specific outputs of the ventromedial nucleus of the hypothalamus / L. G. Kammel, S. M. Correa – Text : visual // *Journal of Neuroendocrinology*. – 2020. – V. 32, № 1. – P. e12801.

114. Kaneda, T. Differential neuropeptide responses to starvation with ageing / T. Kaneda, S. Makino, M. Nishiyama, K. Asaba, K. Hashimoto – Text : visual // *Journal of neuroendocrinology*. – 2001. – V. 13, № 12. – P. 1066-1075.
115. Kaushik, S. Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis / S. Kaushik, E. Arias, H. Kwon, N. M. Lopez, D. Athonvarangkul, S. Sahu, G. J. Schwartz, J. E. Pessin, R. Singh – Text : visual // *EMBO Reports*. – 2012. – V. 13, № 3. – P. 258-265.
116. Kawakami, F. Loss of day-night differences in VIP mRNA levels in the suprachiasmatic nucleus of aged rats / F. Kawakami, H. Okamura, Y. Tamada, Y. Maebayashi, K. Fukui, Y. Ibata – Text : visual // *Neuroscience Letters*. – 1997. – V. 222, № 2. – P. 99-102.
117. Kim, K. H. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in the periphery promotes pain hypersensitivity after peripheral nerve injury / K. H. Kim, J. I. Kim, J. A. Han, M. A. Choe, J. H. Ahn – Text : visual // *Neuroscience*. – 2011. – V. 190. – P. 367-378.
118. Kim, K. Role of hypothalamus in aging and its underlying cellular mechanisms / K. Kim, H. K. Choe – Text : visual // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2019. – V. 177. – P. 74-79.
119. Kim, Y. J. Knockdown of neuropeptide Y in the dorsomedial hypothalamus reverses high-fat diet-induced obesity and impaired glucose tolerance in rats / Y. J. Kim, S. Bi – Text : visual // *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. – 2016. – V. 310, № 2. – P. 134-142.
120. Kirkwood, T. B. Why do we age? / T. B. Kirkwood, S. N. Austad – Text : visual // *Nature*. – 2000. – V. 408, № 6809. – P. 233-238.
121. Kondratova, A. A. The circadian clock and pathology of the ageing brain / A. A. Kondratova, R. V. Kondratov – Text : visual // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2012. – V. 13, № 5. – P. 325-335.
122. Kowalski, C. Age-related changes in cortico-releasing factor, somatostatin, neuropeptide Y, methionine enkephalin and beta-endorphin in specific rat brain areas /

- C. Kowalski, J. Micheau, R. Corder, R. Gaillard, B. Conte-Devolx – Text : visual // Brain Research. – 1992. – V. 582. – P. 38-46.
123. Kumar, A. Calcium signaling during brain aging and its influence on the hippocampal synaptic plasticity / A. Kumar – Text : visual // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2020. – V. 1131. – P. 985-1012.
124. Kumar, A. Enhanced long-term potentiation during aging is masked by processes involving intracellular calcium stores / A. Kumar, T. C. Foster – Text : visual // Journal of Neurophysiology. – 2004. – V. 91. – P. 24-37.
125. Kumar, A. NMDA receptor function during senescence: implication on cognitive performance / A. Kumar – Text : visual // Frontiers in Neuroscience. – 2015. – V. 9. – ID 473.
126. Kumar, U. Colocalization of somatostatin receptor subtypes (SSTR15) with somatostatin, NADPH-diaphorase (NADPHd), and tyrosine hydroxylase in the rat hypothalamus / U. Kumar – Text : visual // Journal of Comparative Neurology. – 2007. – V. 504, № 2. – P. 185-205.
127. Kumar, U. Role of Somatostatin in the Regulation of Central and Peripheral Factors of Satiety and Obesity / U. Kumar, S. Singh – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – V. 21, № 7. – P. 25-68.
128. Kuźnicki, J. Localization of Ca(2+)-dependent conformational changes of calretinin by limited tryptic proteolysis / J. Kuźnicki, T. L. Wang, B. M. Martin, L. Winsky, D. M. Jacobowitz – Text : visual // Biochemical Journal. – 1995. – V. 308. – P. 607-612.
129. Kwon, O. J. Alterations in the localization of calbindin D28K-, calretinin-, and parvalbumin-immunoreactive neurons of rabbit retinal ganglion cell layer from ischemia and reperfusion / O. J. Kwon, J. Y. Kim, S. Y. Kim, C. J. Jeon – Text : visual // Molecules and Cells. – 2005. – V. 19. – P. 382-390.
130. Lalwani, P. Dynamic recovery: GABA agonism restores neural variability in older, poorer performing adults / P. Lalwani, D. D. Garrett, T. A. Polk – Text : visual // Journal of Neuroscience. – 2021. – V. 41, № 45. – P. 9350-9360.

131. Lechan, R. M. Functional anatomy of the hypothalamus and pituitary / R. M. Lechan, R. Toni – Endotext South Dartmouth: MDText.com Inc, 2000. – Text : visual
132. Lee, J. J. Effect of nitric oxide on auditory cortical neurons of aged rats / J. J. Lee, Y. W. Cho, Y. Huh, C. I. Cha, S. G. Yeo – Text : visual // Neuroscience Letters. – 2008. – V. 447, № 1. – P. 37-41.
133. Lee, S. Early induction of mRNA for calbindin-D28k and BDNF but not NT-3 in rat hippocampus after kainic acid treatment / S. Lee, J. Williamson, E. W. Lothman, F. G. Szele, M. F. Chesselet, S. Von Hagen, R. M. Sapolsky, M. P. Mattson, S. Christakos – Text : visual // Molecular Brain Research. – 1997. – V. 47. – P. 183-194.
134. Lee, S. J. Leptin stimulates neuropeptide Y and cocaine amphetamine-regulated transcript coexpressing neuronal activity in the dorsomedial hypothalamus in diet-induced obese mice / S. J. Lee, S. Verma, S. E. Simonds, M. A. Kirigiti, P. Kievit, S. R. Lindsley, A. Loche, M. S. Smith, M. A. Cowley, K. L. Grove – Text : visual // Journal of Neuroscience. – 2013. – V. 33, № 38. – P. 15306-15317.
135. Legon, W. Altered Prefrontal Excitation/Inhibition Balance and Prefrontal Output: Markers of Aging in Human Memory Networks / W. Legon, S. Punzell, E. Dowlati, S. E. Adams, A. B. Stiles, R. J. Moran – Text : visual // Cerebral cortex. – 2016. – V. 26, № 11. – P. 4315-4326.
136. Lengu, K. Effects of high definition transcranial direct current stimulation on local GABA and glutamate levels among older adults with and without mild cognitive impairment: an exploratory study / K. Lengu, S. Ryan, S. J. Peltier, T. Tyszkowski, A. Kairys, B. Giordani, B. M. Hampstead – Text : visual // Journal of Alzheimer's Disease. – 2021. – V. 84, № 3. – P. 1091-1102.
137. Leshan, R. L. Leptin action through hypothalamic nitric oxide synthase-1-expressing neurons controls energy balance / R. L. Leshan, M. Greenwald-Yarnell, C. M. Patterson, I. E. Gonzalez, Jr. M. G. Myers – Text : visual // Nature Medicine. – 2012. – V. 18. – P. 820-823.
138. Li, S. B. Hyperexcitable arousal circuits drive sleep instability during aging / S. B. Li, V. M. Damonte, C. Chen, G. X. Wang, J. M. Kebschull, H. Yamaguchi, W. J.

- Bian, C. Purmann, R. Pattni, A. E. Urban, P. Mourrain, J. A. Kauer, G. Scherrer, L. de Lecea – Text : visual // *Science*. – 2022. – V. 375, № 6583. – eabh3021.
139. Lin, K. Hypothalamic circuit for thermoregulation / K. Lin, J. Yang, X. H. Xu, W. L. Shen – Text : visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2017. – V. 114, № 8. – P. 2042-7.
140. Liu, T. The hypothalamus for whole-body physiology: from metabolism to aging / T. Liu, Y. Xu, C. X. Yi, Q. Tong, D. Cai – Text : visual // *Protein and Cell*. – 2021. – V. 3, № 6. – P. 394-421.
141. Lowenstein, C. J. Nitric oxide, a novel biologic messenger / C. J. Lowenstein, S. H. Snyder – Text : visual // *Cell*. – 1992. – V. 70. – P. 705-707.
142. Luo, S. X. Regulation of feeding by somatostatin neurons in the tuberal nucleus / S. X. Luo, J. Huang, Q. Li, H. Mohammad, C. Y. Lee, K. Krishna, A. M. Kok, Y. L. Tan, J. Y. Lim, H. Li, L. Y. Yeow, J. Sun, M. He, J. Grandjean, S. Sajikumar, W. Han, Y. Fu – Text : visual // *Science*. – 2018. – V. 361, № 6397. – P.76-81.
143. Machado-Salas, J. Morphologic changes in the hypothalamus of the old mouse / J. Machado-Salas, M. E. Scheibel, A. B. Scheibel – Text : visual // *Experimental Neurology*. – 1977. – V. 57. – P. 102-111.
144. Manzoni, O. Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors / O. Manzoni, L. Prezeau, P. Marin, S. Desagher, J. Bockaert, L. Fagni – Text : visual // *Neuron*. – 1992. – V. 4. – P. 653-662.
145. Masliukov, P. M. Age-related expression of calcium-binding proteins in autonomic ganglionic neurons / P. M. Masliukov, A. D. Nozdrachev, A. I. Emanuilov – Text : visual // *Advances in Gerontology*. – 2016. – V. 29. – P. 247-253.
146. Masliukov, P. M. Changes of signaling pathways in hypothalamic neurons with aging / P. M. Masliukov – Text : visual // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2023. – V. 45, № 10. – P. 8289-8308.
147. Masliukov, P. M. Development of calbindin- and calretinin-immunopositive neurons in the enteric ganglia of rats / P. M. Masliukov, K. Y. Moiseev, A. F. Budnik, A. D. Nozdrachev, J. P. Timmermans – Text : visual // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2017. – V. 37. – P. 1257-1267.

148. Masliukov, P. M. Development of noncatecholaminergic sympathetic neurons in para- and prevertebral ganglia of cats / P. M. Masliukov, A. I. Emanuilov, K. Y. Moiseev, A. D. Nozdrachev, S. Dobrotvorskaya, J. P. Timmermans – Text : visual // *International Journal of Developmental Neuroscience*. – 2015. – V. 40. – P. 76-84.
149. Mattson, M. P. Calcium and neurodegeneration / M. P. Mattson – Text : visual // *Aging Cell*. – 2007. – V. 6, № 3. – P. 337-350.
150. McDermott, B. J. Cardiovascular effects of neuropeptide Y: receptor interactions and cellular mechanisms / B. J. McDermott, B. C. Millar, H. M. Piper – Text : visual // *Cardiovascular Research*. – 1993. – V. 27. – P. 893-905.
151. Mele, P. Sex-dependent regulation of hypothalamic neuropeptide Y-Y1 receptor gene expression in leptin treated obese (ob/ob) or lean mice / P. Mele, F. Zammaretti, A. Longo, G. Panzica, A. Oberto, C. Eva – Text : visual // *Brain Research*. – 2016. – V. 1649. – P. 102-109.
152. Michel, M. C. XVI International Union of Pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors / M. C. Michel, A. Beck-Sickinger, H. Cox, H. N. Doods, H. Herzog, D. Larhammar, R. Quirion, T. Schwartz, T. Westfall – Text : visual // *Pharmacological Reviews*. – 1998. – V. 50. – P. 143-150.
153. Mieda, M. The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker / M. Mieda, S. C. Williams, J. A. Richardson, K. Tanaka, M. Yanagisawa – Text : visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2006. – V. 103, № 32. – P. 12150-12155.
154. Miettinen, R. Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus-II. Co-existence with other calcium binding proteins and GABA / R. Miettinen, A. I. Gulyás, K. G. Baimbridge, D. M. Jacobowitz, T. F. Freund – Text : visual // *Neuroscience*. – 1992. – V. 48. – P. 29-43.
155. Mobbs, C. V. Metabolic mystery: aging, obesity, diabetes, and the ventromedial hypothalamus / C. V. Mobbs, C. L. Moreno, M. Poplawski – Text : visual // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2013. – V. 24, № 10. – P. 488-494.

156. Möckel, V. Vulnerability to excitotoxic stimuli of cultured rat hippocampal neurons containing the calcium-binding proteins calretinin and calbindin D28K / V. Möckel, G. Fischer – Text : visual // *Brain Research*. – 1994. – V. 648. – P. 109-120.
157. Moiseev, K. Y. Changes of discharge properties of neurons from dorsomedial hypothalamic nuclei during aging in rats / K. Y. Moiseev, A. A. Spirichev, P. A. Vishnyakova, L. G. Pankrasheva, P. M. Masliukov – Text : visual // *Neuroscience Letters*. – 2021. – V.762. – P. 136168.
158. Moiseev, K. Y. Changes of nNOS expression in the tuberal hypothalamic nuclei during ageing / K. Y. Moiseev, P. A. Vishnyakova, V. V. Porseva, A. P. Masliukov, A. A. Spirichev, A. I. Emanuilov, P. M. Masliukov – Text : visual // *Nitric Oxide*. – 2020. – V. 100–101. – P. 1-6.
159. Moiseev, K. Y. Spike Activity in the Ventromedial Nucleus of Rat Hypothalamus during Aging / K. Y. Moiseev, A. A. Spirichev, L. G. Pankrasheva, A. S. Martyusheva, A. Y. Abramova, P. M. Maslyukov – Text : visual // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2021. – V.171, № 2. – P. 251-253.
160. Montelli, S. Neurochemical characterization of the hypothalamus of the early fetal and newborn alpaca *Vicugna pacos* / S. Montelli, J. M. Graïc, J. A. Ruiz, C. Stelletta, A. Peruffo – Text : visual // *Anatomical Record (Hoboken)*. – 2019. – V. 303, № 11. – P. 2865-2877.
161. Moore, S. J. Age-related deficits in neuronal physiology and cognitive function are recapitulated in young mice overexpressing the L-type calcium channel, CaV1.3 / S. J. Moore, V. A. Cazares, S. J. Temme, G. G. Murphy – Text : visual // *Aging Cell*. – 2023. – V. 22, № 3. – e13781.
162. Moore, S. J. The role of L-type calcium channels in neuronal excitability and aging / S. J. Moore, G. G. Murphy – Text : visual // *Neurobiology of Learning and Memory*. – 2020. – V. 173.
163. Moreno, H. The absence of the calcium-buffering protein calbindin is associated with faster age-related decline in hippocampal metabolism / H. Moreno, N. S. Burghardt, D. Vela-Duarte, J. Masciotti, F. Hua, A. A. Fenton, B. Schwaller, S. A. Small – Text : visual // *Hippocampus*. – 2012. – V. 22. – P. 1107-1120.

164. Moretto, M. Nitric oxide regulates luteinizing hormone-releasing hormone secretion / M. Moretto, F. J. Lopez, A. Negro-Vilar – Text : visual // *Endocrinology*. – 1993. – V. 133. – P. 2399-2402.
165. Moyer, J. R. Jr. Aging-related changes in calcium-binding proteins in rat perirhinal cortex / J. R. Jr. Moyer, S. C. Furtak, J. P. McGann, T. H. Brown – Text : visual // *Neurobiology of Aging*. – 2011. – V. 32. – P. 1693-1706.
166. Nakhate, K. T. A role of neuropeptide CART in hyperphagia and weight gain induced by olanzapine treatment in rats / K. T. Nakhate, N. K. Subhedar, D. M. Kokare – Text : visual // *Brain Research*. – 2018. – V. 1695. – P. 45-52.
167. Northeast, R. C. Eat, sleep, repeat: the role of the circadian system in balancing sleep-wake control with metabolic need / R. C. Northeast, V. V. Vyazovskiy, D. A. Bechtold – Text : visual // *Current Opinion in Physiology*. – 2020. – V. 15. – P. 183-191.
168. Oh, M. M. Learning and aging affect neuronal excitability and learning / M. M. Oh, J. F. Disterhoft – Text : visual // *Neurobiology of Learning and Memory*. – 2020. – V. 167. – P. 107-133.
169. Oomura, Y. Central control of sexual behavior / Y. Oomura, S. Aou, Y. Koyama, I. Fujita, H. Yoshimatsu – Text : visual // *Brain Research Bulletin*. – 1988. – V. 20. – P. 863-870.
170. Orozco-Solis, R. The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure / R. Orozco-Solis, L. Aguilar-Arnal, M. Murakami, R. Peruquetti, G. Ramadori, R. Coppari, P. Sassone-Corsi – Text : visual // *Cell Metabolism*. – 2016. – V. 23, № 3. – P. 467-478.
171. Otgon-Uul, Z. Optogenetic activation of leptin- and glucose-regulated GABAergic neurons in dorsomedial hypothalamus promotes food intake via inhibitory synaptic transmission to paraventricular nucleus of hypothalamus / Z. Otgon-Uul, S. Suyama, H. Onodera, T. Yada – Text : visual // *Molecular Metabolism*. – 2016. – V. 5, № 8. – P. 709-715.
172. Palomba, M. Decline of the presynaptic network, including GABAergic terminals, in the aging suprachiasmatic nucleus of the mouse / M. Palomba, M. Nygård,

- F. Florenzano, G. Bertini, K. Kristensson, M. Bentivoglio – Text : visual // *Journal of Biological Rhythms*. – 2008. – V. 23, № 3. – P. 220-231.
173. Pardo, P. S. SIRT1 regulation in ageing and obesity / P. S. Pardo, A. M. Boriek – Text : visual // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2020. – V. 188.
174. Park, H. K. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism / H. K. Park, R. S. Ahima – Text : visual // *Metabolism*. – 2014. – V. 64. – P. 24-34.
175. Patel, Y. C. Somatostatin and its receptor family / Y. C. Patel – Text : visual // *Frontiers in Neuroendocrinology*. – 1999. – V. 20. – P. 157-198.
176. Paxinos, G. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates / G. Paxinos, C. Watson – Elsevier: Academic Press, 2013. – 472 p. – Text : visual.
177. Péterfi, Z. Endocannabinoid and nitric oxide systems of the hypothalamic paraventricular nucleus mediate effects of NPY on energy expenditure / Z. Péterfi, I. Farkas, R. G. P. Denis, E. Farkas M., Uchigashima, T. Füzesi, M. Watanabe, R. M. Lechan, Z. Liposits, S. Luquet, C. Fekete – Text : visual // *Molecular Metabolism*. – 2018. – V. 18. – P. 120-133.
178. Phillips, R. G. Calbindin D28K gene transfer via herpes simplex virus amplicon vector decreases hippocampal damage in vivo following neurotoxic insults / R. G. Phillips, T. J. Meier, L. C. Giuli, J. R. McLaughlin, D. Y. Ho, R. M. Sapolsky – Text : visual // *Journal of Neurochemistry*. – 1999. – V. 73. – P. 1200-1205.
179. Poole, E. I. Nitric Oxide Acts in the Rat Dorsomedial Hypothalamus to Increase High Fat Food Intake and Glutamate Transmission / E. I. Poole, V. A. Rust, K. M. Crosby – Text : visual // *Neuroscience*. – 2020. – V. 440. – P. 277-289.
180. Pop, M. G. Anatomy and function of the hypothalamus. Hypothalamus in health and diseases / M. G. Pop, C. Crivii, I. Opincariu – IntechOpen, 2018. – Text : visual
181. Pralong, F. P. The neuropeptide Y Y1 receptor regulates leptin-mediated control of energy homeostasis and reproductive functions / F. P. Pralong, C. Gonzales, M. J. Voirol, R. D. Palmiter, H. R. Brunner, R. C. Gaillard, J. Seydoux, T. Pedrazzini – Text : visual // *FASEB Journal*. – 2002. – V. 16. – P. 712-714.

182. Prast, H. Nitric oxide as modulator of neuronal function / H. Prast, A. Philippu – Text : visual // *Progress in Neurobiology*. – 2001. – V. 64. – P. 51-68.
183. Protas, L. Neuropeptide Y is an essential in vivo developmental regulator of cardiac ICa,L / L. Protas, A. Barbuti, J. Qu, V. O. Rybin, R. D. Palmiter, S. F. Steinberg, R. B. Robinson – Text : visual // *Circulation Research*. – 2003b. – V. 93. – P. 972-979.
184. Protas, L. Neuropeptide Y: neurotransmitter or trophic factor in the heart? / L. Protas, J. Qu, R. B. Robinson – Text : visual // *News in Physiological Sciences*. – 2003a. – V. 18. – P. 181-185.
185. Proudant, N. Juxtapositions between the somatostatinergic and growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in the human hypothalamus / N. Proudant, M. Peroski, G. Grignol, I. Merchenthaler, B. Dudas – Text : visual // *Neuroscience*. – 2015. – V. 297. – P. 205-210.
186. Qin, C. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases / C. Qin, J. Li, K. Tang – Text : visual // *Endocrinology*. – 2018. – V. 159, № 9. – P. 3458-3472.
187. Reifsnyder, P. C. Rapamycin treatment benefits glucose metabolism in mouse models of type 2 diabetes / P. C. Reifsnyder, K. Flurkey, A. Te, D. E. Harrison – Text : visual // *Aging*. – 2016. – V. 8, №11. – P. 3120-3130.
188. Renner, E. Glucagon-like peptide-1 of brainstem origin activates dorsomedial hypothalamic neurons in satiated rats / E. Renner, N. Puskás, A. Dobolyi, M. Palkovits – Text : visual // *Peptides*. – 2012. – V. 35, № 1. – P. 14-22.
189. Rezai-Zadeh, K. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake / K. Rezai-Zadeh, S. Yu, Y. Jiang, A. Laque, C. Schwartzburg, C. D. Morrison, A. V. Derbenev, A. Zsombok, H. Münzberg – Text : visual // *Molecular Metabolism*. – 2014. – V. 3, № 7. – P. 681-693.
190. Riascos, D. Age-related loss of calcium buffering and selective neuronal vulnerability in Alzheimer's disease / D. Riascos, D. de Leon, A. Baker-Nigh, A.

- Nicholas, R. Yukhananov, J. Bu, C. K. Wu, C. Geula – Text : visual // *Acta Neuropathologica*. – 2011. – V. 122. – P. 565-576.
191. Rissman, R. A. Implications for treatment: GABAA receptors in aging, Down syndrome and Alzheimer's disease / R. A. Rissman, W. C. Mobley – Text : visual // *Journal of Neurochemistry*. – 2011. – V. 117, № 4. – P. 613-622.
192. Rizzo, V. Dissecting mechanisms of brain aging by studying the intrinsic excitability of neurons / V. Rizzo, J. Richman, S. V. Puthanveetil – Text : visual // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2015. – V. 6. – P. 337.
193. Rozycka, A. The space where aging acts: focus on the GABAergic synapse / A. Rozycka, M. Liguz-Leczna – Text : visual // *Aging Cell*. – 2017. – V. 16, № 4. – P. 634-643.
194. Sabatier, N. Spontaneous discharge characteristic of neurons in the ventromedial nucleus of the rat hypothalamus in vivo / N. Sabatier, G. Leng – Text : visual // *European Journal of Neuroscience*. – 2008. – V. 28. – P. 693-706.
195. Saper, C. B. The hypothalamic integrator for circadian rhythms / C. B. Saper, J. Lu, T. C. Chou, J. Gooley – Text : visual // *Trends in Neurosciences*. – 2005. – V. 28. – P. 152-157.
196. Sartin, J. L. Neuron numbers in hypothalamic nuclei of young, middle-aged and aged male rats / J. L. Sartin, A. A. Lamperti – Text : visual // *Experientia*. – 1985. – V. 41. – P. 109-111.
197. Satoh, A. The brain, sirtuins, and ageing / A. Satoh, S. I. Imai, L. Guarente – Text : visual // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2017. – V. 18, № 6. – P. 362-374.
198. Schmidt, H. Nanodomain coupling at an excitatory cortical synapse / H. Schmidt, S. Brachtendorf, O. Arendt, S. Hallermann, S. Ishiyama, G. Bornschein, D. Gall, S. N. Schiffmann, M. Heckmann, J. Eilers – Text : visual // *Current Biology*. – 2013. – V. 23. – P. 244-249.
199. Schmidt, H. Three functional facets of calbindin D-28k / H. Schmidt – Text : visual // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2012. – V. 5. – P. 25.

200. Schwaller B. The use of transgenic mouse models to reveal the functions of Ca²⁺ buffer proteins in excitable cells / B. Schwaller – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2012. – V. 1820. – P. 1294-1303.
201. Schwaller, B. Calretinin: from a “simple” Ca(2+) buffer to a multifunctional protein implicated in many biological processes / B. Schwaller – Text : visual // *Frontiers Neuroanatomy*. – 2014. – V. 8. – P. 3.
202. Schwaller, B. The continuing disappearance of “pure” Ca²⁺ buffers / B. Schwaller – Text : visual // *Cell Mol Life Sci*. – 2009. – V. 66. – P. 275-300.
203. Schwaller, B. The regulation of a cell’s Ca(2+) signaling toolkit: the Ca (2+) homeostasome – Text : visual // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2012. – V. 740. – P. 1-25.
204. Segovia, G. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective / G. Segovia, A. Porras, A. Del Arco, F. Mora – Text : visual // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2001. – V. 122. – P. 1-29.
205. Sen, N. Nitric oxide-induced nuclear GAPDH activates p300/CBP and mediates apoptosis / N. Sen, M. R. Hara, M. D. Kornberg, M. B. Cascio, B. I. Bae, N. Shahani, B. Thomas, T. M. Dawson, V. L. Dawson, S. H. Snyder, A. Sawa – Text : visual // *Nature Cell Biology*. – 2008. – V. 10, № 7. – P. 866-873.
206. Seoane-Collazo, P. Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis / P. Seoane-Collazo, J. Fernø, F. Gonzalez, C. Diéguez, R. Leis, R. Nogueiras, M. López – Text : visual // *Endocrine*. – 2015. – V. 50, № 2. – P. 276-291.
207. Shamsi, B. H. Versatile Functions of Somatostatin and Somatostatin Receptors in the Gastrointestinal System / B. H. Shamsi, M. Chatoo, X. K. Xu, X. Xu, X. Q. Chen – Text : visual // *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. – 2021. – V. 12. – P. 652363.
208. Shao, L. R. Pediatric Epilepsy Mechanisms: Expanding the Paradigm of Excitation/Inhibition Imbalance / L. R. Shao, C. W. Habela, C. E. Stafstrom. – Text : visual // *Children*. – 2019. – V.6, № 2 – P. 23.
209. Shi, Z. Sex differences in the sympathoexcitatory response to insulin in obese rats: role of neuropeptide Y / Z. Shi, P. A. Cassaglia, N. E. Pelletier, V. L. Brooks – Text : visual // *The Journal of Physiology*. – 2019. – V. 597, № 6. – P. 1757-1775.

210. Sickel, M. J. Calbindin-D28k immunoreactivity is a marker for a subdivision of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of the rat: developmental profile and gonadal steroid modulation / M. J. Sickel, M. M. McCarthy – Text : visual // *Journal of Neuroendocrinology*. – 2000. – V. 12. – P. 397-402.
211. Snyder, S. H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters / S. H. Snyder – Text : visual // *Science*. – 1992. – V. 257. – P. 494-496.
212. Sohn, J. W. Leptin and insulin engage specific PI3K subunits in hypothalamic SF1 neurons / J. W. Sohn, Y. Oh, K. W. Kim, S. Lee, K. W. Williams, J. K. Elmquist – Text : visual // *Molecular Metabolism*. – 2016. – V. 5, № 8. – P. 669-679.
213. Song, J. Arcuate Nucleus of the Hypothalamus: Anatomy, Physiology, and Diseases / J. Song, S. Y. Choi – Text : visual // *Experimental neurobiology*. – 2023. – V. 32, № 6. – P. 371-386.
214. Squadrito, F. Effects of S-ethylisothiourea, a potent inhibitor of nitric oxide synthase, alone or in combination with a nitric oxide donor in splanchnic artery occlusion shock / F. Squadrito, D. Altavilla, G. Squadrito, G. M. Campo, M. Ioculano, P. Canale, F. Rossi, A. Saitta, A. P. Caputi – Text : visual // *British Journal of Pharmacology*. – 1996. – V. 119. – P. 23-28.
215. Stepanyan, Z. Somatostatin, a negativeregulator of central leptin action in the rat hypothalamus / Z. Stepanyan, A. Kocharyan, M. Behrens, C. Koebnick, M. Pyrski, W. Meyerhof – Text : visual // *Journal of Neurochemistry*. – 2007. – V. 100, № 2. – P. 468-78.
216. Tewari, D. Role of Nitric Oxide in Neurodegeneration: Function, Regulation, and Inhibition / D. Tewari, A. N. Sah, S. Bawari, S. F. Nabavi, A. R. Dehpour, S. Shirooie, N. Braidy, B. L. Fiebich, R. A. Vacca, S. M. Nabavi – Text : visual // *Current Neuropharmacology*. – 2021. – V. 19, № 2. – P. 114-126.
217. Thompson, R. H. Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat / R. H. Thompson, L. W. Swanson – Text : visual // *Brain Research Reviews*. – 1998. – V.27, № 2. – P. 89-118.

218. Toescu, E. C. Parameters of calcium homeostasis in normal neuronal ageing / E. C. Toescu, A. Verkhratsky –Text : visual // *Journal of Anatomy*. – 2000. – V. 197. – P. 563.
219. Tokizane, K. DMH neurons regulate aging and lifespan in mice through hypothalamic-adipose inter-tissue communication / K. Tokizane, C. S. Brace, S. I. Imai – Text : visual // *Cell Metabolism*. – 2024. – V.36, № 2. – P. 377-392.
220. Urushihata, T. Role of the central nervous system in cell non-autonomous signaling mechanisms of aging and longevity in mammals / T. Urushihata, A. Satoh – Text : visual // *Journal of Physiological Sciences*. – 2024. – V.74, № 1. – P. 40.
221. Vannucchi, M. G. Relationships between neurons expressing neuronal nitric oxide synthase, degree of microglia activation and animal survival. A study in the rat cortex after transient ischemia / M. G. Vannucchi, E. Bizzoco, L. Corsani, M. Gianfriddo, F. Pedata, M. S. Fausone-Pellegrini – Text : visual // *Brain Research*. – 2007. – V. 1132, № 1. – P. 218-227.
222. Verkhratsky, A. Calcium and neuronal aging / A. Verkhratsky, E. C. Toescu – Text : visual // *Trends in Neurosciences*. – 1998. – V. 21. – P. 2-7.
223. Vernet, D. Spontaneous expression of inducible nitric oxide synthase in the hypothalamus and other brain regions of ageing rats / D. Vernet, J. J. Bonavera, R. S. Swerdloff, N. F. Gonzalez-Cadavid, C. Wang – Text : visual // *Endocrinology*. – 1998. – V. 139. – P. 3254-3261.
224. Villa, A. Cytosolic Ca²⁺ binding proteins during rat brain aging: loss of calbindin and calretinin in the hippocampus, with no change in the cerebellum / A. Villa, P. Podini, M. C. Panzeri, G. Racchetti, J. Meldolesi – Text : visual // *European Journal of Neuroscience*. – 1994. – V. 6. – P. 1491-1499.
225. Vizzard, M. A. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase (NOS) in visceral neurons after nerve injury / M. A. Vizzard, S. L. Erdman, W. C. de Groat – Text : visual // *Journal of Neuroscience*. – 1995. – V. 15, № 5 Pt 2. – P. 4033-4045.
226. Vong, L. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons / L. Vong, C. Ye, Z. Yang, B. Choi, S. Chua, B. Lowell – Text : visual // *Neuron*. – 2011. – V. 71. – P. 142-154.

227. Wang, Y. Age affects spontaneous activity and depolarizing afterpotentials in isolated gonadotropin-releasing hormone neurons / Y. Wang, M. Garro, H. A. Dantzler, J. A. Taylor, D. D. Kline, M. C. Kuehl-Kovarik – Text : visual // *Endocrinology*. – 2008. – V. 149, № 10. – P. 4938-4947.
228. Wilson, J. L. A talk between fat tissue, gut, pancreas and brain to control body weight / J. L. Wilson, P. J. Enriori – Text : visual // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2015. – V. 418 Pt 2. – P. 108-119.
229. Xu, X. Altered expression of neuropeptide Y, Y1 and Y2 receptors, but not Y5 receptor, within hippocampus and temporal lobe cortex of tremor rats / X. Xu, F. Guo, Q. He, X. Cai, D. Min, Q. Wang, S. Wang, L. Tian, J. Cai, Y. Zhao – Text : visual // *Neuropeptides*. – 2014. – V. 48, № 2. – P. 97-105.
230. Yamada, K. Reduction in the number of NADPH-diaphorase-positive cells in the cerebral cortex and striatum in aged rats / K. Yamada, Y. Noda, Y. Komori, H. Sugihara, T. Hasegawa, T. Nabeshima – Text : visual // *Neuroscience Research*. – 1996. – V. 24. – P. 393-402.
231. Yamaguchi, A. Normal peripheral circadian phase in the old-old with abnormal circadian behavior / A. Yamaguchi, M. Tatsumoto, R. Matsumura, T. Endo, K. Hirata, I. Tokuda, M. Akashi – Text : visual // *Genes Cells*. – 2018. – V. 23, № 10. – P. 849-859.
232. Yamaguchi, S. Sexual experience reduces neuronal activity in the central part of the medial preoptic nucleus in male rats during sexual behavior / S. Yamaguchi, Y. Abe, S. Maejima, S. Tsukahara – Text : visual // *Neuroscience Letters*. – 2018. – V. 685. – P. 155-159.
233. Yamamoto, R. Optogenetic study of anterior BNST and basomedial amygdala projections to the ventromedial hypothalamus / R. Yamamoto, N. Ahmed, T. Ito, N. Z. Gungor, D. Pare – Text : visual // *eNeuro*. – 2018. – V. 5, № 3.
234. Yang, S. B. Rapamycin ameliorates age-dependent obesity associated with increased mTOR signaling in hypothalamic POMC neurons / S. B. Yang, A. C. Tien, G. Boddupalli, A. W. Xu, Y. N. Jan, L. Y. Jan – Text : visual // *Neuron*. – 2012. – V. 75. – P. 425-436.

235. Ye, R. GHRH expression plasmid improves osteoporosis and skin damage in aged mice / R. Ye, H. L. Wang, D. W. Zeng, T. Chen, J. J. Sun, Q. Y. Xi, Y. L. Zhang – Text : visual // Growth Hormone & IGF Research: Official Journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society. – 2021. – V. 60-61. – P. 101429.
236. Yin, W. Expression of vesicular glutamate transporter 2 (vGluT2) on large dense-core vesicles within GnRH neuroterminals of aging female rats / W. Yin, Z. Sun, J. M. Mendenhall, D. M. Walker, P. D. Riha, K. S. Bezner, A. C. Gore – Text : visual // PLoS One. – 2015. – V. 10, № 6.
237. Yoo, E. S. Neuroendocrine control of appetite and metabolism / E. S. Yoo, J. Yu, J. W. Sohn – Text : visual // Experimental & Molecular Medicine. – 2021. – V. 53, № 4. – P. 505-516.
238. Yu, B. Neural Programmatic Role of Leptin, TNF α , Melanocortin, and Glutamate in Blood Pressure Regulation vs Obesity-Related Hypertension in Male C57BL/6 Mice / B. Yu, D. Cai – Text : visual // Endocrinology. – 2017. – V. 158, № 6. – P. 1766–1775.
239. Zainabadi, K. A brief history of modern aging research / K. Zainabadi – Text : visual // Experimental Gerontology. – 2018. – V. 104. – P. 35-42.
240. Zallo, F. Loss of calretinin and parvalbumin positive interneurons in the hippocampal CA1 of aged Alzheimer's disease mice / F. Zallo, E. Gardenal, A. Verkhatsky, J. J. Rodríguez – Text : visual // Neuroscience Letters. – 2018. – V. 681. – P. 19-25.
241. Zammaretti, F. Fasting, leptin treatment, and glucose administration differentially regulate Y1 receptor gene expression in the hypothalamus of transgenic mice / F. Zammaretti, G. Panzica, C. Eva – Text : visual // Endocrinology. – 2001. – V. 142. – P. 3774-3782.
242. Zhang, G. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH / G. Zhang, J. Li, S. Purkayastha, Y. Tang, H. Zhang, Y. Yin, B. Li, Liu G., D. Cai – Text : visual // Nature. – 2013. – V. 497. – P. 211-216.

243. Zhang, X. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity / X. Zhang, G. Zhang, H. Zhang, M. Karin, H. Bai, D. Cai – Text : visual // Cell. – 2008. – V. 135, № 1. – P. 61-73.
244. Zhang, Y. Astrocytic Process Plasticity and IKK β /NF- κ B in Central Control of Blood Glucose, Blood Pressure, and Body Weight / Y. Zhang, J. M. Reichel, C. Han, J. P. Zuniga-Hertz, D. Cai – Text : visual // Cell Metabolism. – 2017. – V. 25, № 5. – P. 1091-1102.
245. Zhang, Y. Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs / Y. Zhang, M. S. Kim, B. Jia, J. Yan, J.P. Zuniga-Hertz, C. Han, D. Cai – Text : visual // Nature. – 2017. – V. 548, № 7665. – P. 52-57.
246. Zhdanova, I. V. Aging of intrinsic circadian rhythms and sleep in a diurnal nonhuman primate, *Macaca mulatta* / I. V. Zhdanova, K. Masuda, C. Quasarano-Kourkoulis, D. L. Rosene, R. J. Killiany, S. Wang – Text : visual // Journal of Biological Rhythms. – 2011. – V. 26, № 2. – P. 149-159.
247. Zhou, L. Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications / L. Zhou, D. -Y. Zhu – Text : visual // Nitric Oxide. – 2009. – V. 20. – P. 223-230.
248. Zou, S. L. Colocalization of Cannabinoid Receptor 1 with Somatostatin and Neuronal Nitric Oxide Synthase in Rat Brain Hypothalamus / S. L. Zou, R. K. Somvanshi, S. Paik, U. Kumar – Text : visual // Journal of Molecular Neuroscience. – 2015. – V. 55. – P. 480-491.