
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ИНСУЛИНОВЫЙ СИГНАЛИНГ В НЕЙРОНАХ ТУБЕРАЛЬНОЙ ОБЛАСТИ
ГИПОТАЛАМУСА КРЫС ПРИ СТАРЕНИИ**

© 2024 г. П. А. Анфимова¹, В. В. Порсева¹, Л. Г. Панкрашева¹, Е. С. Ширина,
П. М. Маслюков^{1,*}

¹Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Россия

* E-mail: mpm@ysmu.ru

Поступила в редакцию 15.01.2024 г.

После доработки 25.01.2024 г.

Принята к публикации 29.01.2024 г.

Гипоталамус является регуляторным центром, контролирующим гомеостаз, репродукцию, циркадные ритмы и эндокринную систему. Он также участвует в регуляции старения. Распределение и количество белка инсулинового рецептора (INR), а также инсулин-рецепторного субстрата-1 (IRS1) определялись в нейронах аркуатного (ARN), дорсомедиального (DMN) и вентромедиального (VMN) ядер гипоталамуса крысы при помощи иммуногистохимического метода и вестерн-блоттинга у самцов молодых (2 месяца), взрослых (12 месяцев) и старых (24 месяца) крыс. Результаты показали, что экспрессия INR и IRS1 в нейронах ядер медиобазального гипоталамуса крысы меняется с возрастом разнонаправленно. С возрастом экспрессия INR снижается в ARN и увеличивается в DMN и VMN. Экспрессия IRS1 не меняется в ARN и VMN и снижается в DMN по мере старения. Таким образом, при старении наблюдаются разнонаправленные изменения экспрессии компонентов инсулинового сигналинга в нейронах туберальных ядер гипоталамуса, которые являются проявлением более общего процесса увеличения гетерогенности в стареющих органах и тканях, что приводит к регуляторным нарушениям и развитию возраст-зависимых заболеваний.

Ключевые слова: инсулиновый сигналинг, иммуногистохимия, гипоталамус, старение

DOI: 10.31857/S0869813924040041, **EDN:** COCMSP

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что инсулин является ключевым регулятором энергетического гомеостаза, воздействуя на периферические ткани и головной мозг. Нейрональный инсулиновый сигналинг не только играет ключевую роль в регуляции метаболизма, но также в регуляции поведения и когнитивных функций. Нарушение регуляции передачи сигналов инсулина также связано с рядом заболеваний головного мозга, включая психические и нейродегенеративные [1, 2].

Передача сигналов инсулина может осуществляться по двум различным сигнальным путям: а) фосфоинозитид-3-киназа (PI3K)/протеинкиназа В (АКТ)/мишень рапамицина у млекопитающих (mTOR) и б) каскад митоген-активируемых протеинкиназ, включая его эффекторный компонент – ERK1/2 (киназу, активируемую внеклеточными

сигналами). Путь PI3K/AKT в основном регулирует метаболизм, тогда как MAPK/ERK контролирует рост и пролиферацию клеток [1–3].

INR обладает внутренней тирозинкиназной активностью, а стимуляция инсулином индуцирует его аутофосфорилирование и цепочку реакций, опосредованных белками-субстратами инсулинового рецептора (IRS) 1 и 2. В свою очередь, IRS1 и IRS2 активируют PI3K, которая продуцирует фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PIP3) из мембранного фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата. PIP3 обеспечивает закрепление фосфоинозитол-зависимой протеинкиназы (PDK-1/2) в мембране, которая катализирует фосфорилирование и активацию AKT. При активации AKT выходит из мембраны и далее фосфорилирует многочисленные субстраты в цитоплазме и ядре, что играет ключевую роль в регуляции многочисленных процессов, включая регуляцию клеточного цикла, метаболизма, апоптоза и передачи сигнала [1–3].

В пути MAPK/ERK активированные INR и IRS связывают адаптерные молекулы Grb2 и Shc, которые содержат домены SH2. Фосфорилирование Shc и Grb2 посредством фактора обмена гуаниновых нуклеотидов son of Sevenless (SOS) дополнительно активирует небольшой G-белок Ras. После активации GTP-связанная форма (Ras-GTP) стимулирует нижележащие эффекторы Raf, которые стимулируют его нижележащую мишень MEK, впоследствии MEK фосфорилирует MAP-киназы ERK1 и 2. Активированная ERK1/2 может фосфорилировать субстраты в цитозоле и факторы транскрипции в ядре, регулируя экспрессию генов, участвует в клеточном делении, миграции, дифференцировке и апоптозе [4].

INR, IRS1 и IRS2 были выявлены в различных областях мозга, включая гипоталамус [5]. В мозге инсулин играет важную роль в формировании нейронных сетей во время развития, модулирует синаптическую пластичность и поддерживает выживаемость нейронов, ингибируя апоптоз [1, 5]. Снижение передачи сигналов инсулина продлевает продолжительность жизни у различных видов [6–9]. Предположительно, инсулин и инсулиноподобный фактор роста (IGF1) могут влиять на старение через сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR [6, 7, 10]. Было выявлено, что с возрастом активность mTOR возрастает. Умеренное подавление активности mTOR рапамицином у старых мышей приводило к активации процессов аутофагии, активации иммунной системы, в том числе противоопухолевого звена [11].

В ряде работ получены данные о том, что активация INR в физиологических концентрациях в головном мозге преимущественно стимулирует IRS1, а стимуляция рецепторов к IGF1 вызывает активацию IRS2 [12–14]. При этом центральная инсулинорезистентность сопровождалась снижением активации IRS1, в то время как при резистентности к IGF1 в головном мозге отмечалось ослабление стимуляции IRS2 [13]. Также было установлено, что нокдаун или сверхэкспрессия IRS1 не влияли на IGF сигналинг, в отличие от нокдауна IRS-2, при котором IGF1 сигналинг нарушался [14].

Гипоталамус является основным регулятором гомеостаза, биологических ритмов и адаптации к различным факторам внешней среды. Медиобазальные ядра гипоталамуса, в том числе аркуатное (ARN), дорсомедиальное (DMN) и вентромедиальное (VMN), принимают участие не только в регуляции обмена веществ и энергетического баланса, но и в контроле старения [10, 15–16]. В наших предыдущих работах мы выявили, что экспрессия компонентов инсулинового сигналинга, включая PI3K, AKT и mTOR, менялась в медиобазальных ядрах гипоталамуса у крыс в различные возрастные периоды [17, 18]. Однако данные об изменениях экспрессии INR и IRS1 в гипоталамусе в процессе старения отсутствуют.

Целью настоящего исследования было определение экспрессии INR и IRS1, расположения и процентного содержания INR- и IRS1-иммунореактивных (ИР) нейронов в туберальной группе ядер гипоталамуса (ARN, DMN и VMN) у крыс в процессе старения, включая молодых, взрослых и старых животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работа выполнена на самцах ($n = 30$) линии Вистар в возрасте 2 ($n = 10$), 12 ($n = 10$) и 24 месяца ($n = 10$) после рождения. Все животные содержались в акриловых клетках с древесной стружкой в акклиматизированном помещении (12/12-часовой цикл света/темноты; 22 ± 3 °C) при доступе к пище и воде *ad libitum*. После введения летальной дозы уретана (3 г/кг, внутривенно) животных перфузировали транскардиально раствором стандартного фосфатно-солевого буфера (PBS; 0.01 M Na_2HPO_4 , 0.0027 M KCl, 0.137 M NaCl, pH 7.4) (Биолот, Россия).

Иммуногистохимия. Далее крыс перфузировали 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma, США). После перфузии головной мозг извлекали и иссекали участок гипоталамуса в области срединного возвышения согласно координатам атласа мозга крыс [19]. Серии коронарных срезов гипоталамуса толщиной 14 мкм изготавливали с помощью криотома Shandon E (Thermo Scientific, Великобритания).

С целью выявления нейронов, содержащих INR и IRS1, применялось двойное мечение антителами. Срезы прединкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в PBS с добавлением 10% ослиной сыворотки (Jackson ImmunoResearch, США), 1% тритона X-100, 0.1% бычьего сывороточного альбумина, 0.05% тимерозола. Затем срезы инкубировали с первичными кроличьими антителами (AbClonal, Китай) против INR (A19067) и IRS1 (A0245), разведение 1:200 в течение 24 ч при комнатной температуре. После кратковременной промывки в PBS срезы инкубировали со вторичными антителами в течение 2 ч. Вторичные антитела были конъюгированы с флуорохромом индокарбоцианином (Cy3), дающим красную флуоресценцию (разведение 1:150, Jackson ImmunoResearch, США). Окраску клеток всей популяции нейронов проводили красителем, флуоресцирующим в зеленой области спектра, – NeuroTrace Green Fluorescent Nissl Stains (Molecular Probes, США), разведение 1:200. После этого срезы отмывали в PBS и заключали в среду для флуоресцентной микроскопии VectaShield (Vector Laboratories, США). Для исключения неспецифической реакции часть срезов инкубировали без первичных и/или вторичных антител.

Анализ препаратов проводили на флуоресцентном микроскопе «Olympus BX43» (Токио, Япония) с соответствующим набором светофильтров и охлаждаемой цифровой CCD камерой Tucsен FL-20 с программным обеспечением Mosaic V2.1 (Китай). Для выявления меченых нейронов использовали каждый третий из серийных срезов. Число иммунореактивных (ИР) нейронов определяли на изображениях срезов, полученных под объективом 20x/0.50. Площадь изображений составляла 0.14 мм². Долю ИР нейронов определяли как их отношение к общему количеству нейронов, выявленных NeuroTrace Fluorescent Nissl Stains, которое принимали за 100%. Анализу подлежали нейроны, срез которых прошел через ядро с видимым ядрышком и с флуоресценцией, превышающей фоновое свечение. Процент ИР нейронов определяли с помощью программ Image J (NIH, США).

Вестерн-блоттинг. На вибратоме изготавливались срезы гипоталамуса толщиной 300 мкм. Под стереомикроскопом на срезах вырезались ВМЯ, которые затем гомогенизировали с буфером для лизиса и денатурировали при 95 °C в течение 5 мин. Белки в пробах разделяли электрофорезом в 10%-ном полиакриламидном геле и переносили на мембраны PVDF (AppliChem, Германия). Мембраны блокировали раствором, содержащим 3% обезжиренного сухого молока (AppliChem, Германия) в TBS-T (0.1% Tween 20, 0.2 mM Трис, 137 mM NaCl), в течение 30 мин при комнатной температуре. После промывки TBS-T мембраны инкубировали с первичными кроличьими антителами против INR (A19067) и IRS1 (A0245) (AbClonal, Китай) и мышинными моноклональными против GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, GB15002, Servicebio, Китай), разведение 1:1000 при 4 °C на ночь. После промывки TBS-T мембраны инкубировали со вторичными антителами (козьи HRP-конъюгированные антикроличьи и антимишьяные

IgG (AbClonal, Китай)) в соотношении 1:3000. Иммуноблоты выявлялись путем хемилюминесценции (ECL Prime детектирующий реагент вестерн-блоттинга, BioRad) с использованием геля-документирующей системы Syngene G:BOX Chemi XR5E (Syngene, Великобритания). Количественный анализ хемилюминесцентных сигналов проводился при помощи программного обеспечения Gene Tools Gel Analysis (Syngene, Великобритания), и их оптическая плотность выражалась относительно GAPDH. Маркеры молекулярной массы белков были включены в каждый анализ вестерн-блот.

Статистическая обработка данных проведена с использованием пакетов прикладных программ Sigma Plot (StatSoft, США). Все величины представлены как среднее арифметическое $\pm$ ошибка среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий средних величин определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с коррекцией Бонферрони. Достоверными считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По данным иммуногистохимического метода, во всех исследованных ядрах гипоталамуса, включая ARN, DMN и VMN, INR-ИР и IRS1-ИР нейроны выявлялись в большом числе (рис. 1, 2). В каждом из ядер ИР нейроны были распределены сравнительно равномерно. По данным вестерн-блоттинга, у всех животных в вышеуказанных ядрах выявлялись полосы, соответствующие молекулярной массе белка 110 кДа (INR) и 180 кДа (IRS1) (рис. 3).

Возрастные изменения экспрессии INR. В ARN процент INR-ИР нейронов составил $82 \pm 2\%$ у 2-месячных крыс, $80 \pm 3\%$ у 12-месячных и достоверно снизился до $65 \pm 1\%$ у 24-месячных крыс ($p < 0.01$ по сравнению с 2- и 12-месячными крысами, рис. 1). В DMN и VMN доля INR-ИР нейронов достоверно увеличивалась в возрасте от 2 до 12 месяцев и не менялась в период от 12 до 24 месяцев: в DMN – с $56 \pm 5\%$ у 2-месячных крыс до $67 \pm 1\%$ у 12- и $66 \pm 2\%$ у 24-месячных крыс ($p < 0.05$ в сравнении 24-месячных с 2- и 12-месячными крысами); в VMN – от $59 \pm 2\%$ у 2-месячных крыс до $80 \pm 4\%$ у 12-месячных и $77 \pm 2\%$ у 24-месячных крыс ($p < 0.01$ при сравнении 2-месячных с 12- и 24-месячными крысами).

Экспрессия INR относительно GAPDH достоверно уменьшалась в ARN с 0.56 ± 0.04 у 12-месячных до 0.45 ± 0.03 у 24-месячных крыс ($p < 0.05$) и увеличивалась в возрасте от 2 до 12 месяцев в DMN с 0.65 ± 0.03 до 0.77 ± 0.04 ($p < 0.05$), в VMN – с 0.53 ± 0.03 до 0.66 ± 0.03 ($p < 0.05$) (рис. 3).

IRS1 в постнатальном онтогенезе. В ARN процент IRS1-ИР нейронов составлял $74 \pm 2\%$ у 2-месячных крыс, $73 \pm 3\%$ у 12-месячных и $76 \pm 2\%$ у 24-месячных крыс. В VMN этот же показатель составил $70 \pm 3\%$ у 2-месячных, $69 \pm 5\%$ у 12-месячных и $78 \pm 4\%$ у 24-месячных животных. В ARN и VMN различия между возрастными группами не были статистически значимыми ($p > 0.05$) (рис. 2). Однако в DMN доля IRS1-ИР нейронов составляла у 2-месячных $72 \pm 5\%$ и достоверно снижалась до $56 \pm 4\%$ у 12-месячных крыс ($p < 0.01$ по сравнению с 2-месячными) и далее снижалась до $43 \pm 3\%$ у 24-месячных животных ($p < 0.001$ по сравнению с 2-месячными и $p < 0.05$ по сравнению с 12-месячными крысами).

Экспрессия IRS1 относительно GAPDH достоверно не менялась с течением возраста в ARN и VMN, где варьировала от 0.67 ± 0.04 до 0.75 ± 0.05 , но уменьшалась в DMN с 0.68 ± 0.03 у 12-месячных до 0.52 ± 0.03 у 24-месячных животных ($p < 0.05$) (рис. 3), что подтверждает данные иммуногистохимического исследования.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В текущем исследовании мы впервые получили данные об экспрессии INR и IRS1 в нейронах туберальных ядер гипоталамуса во время старения. Мы обнаружили, что

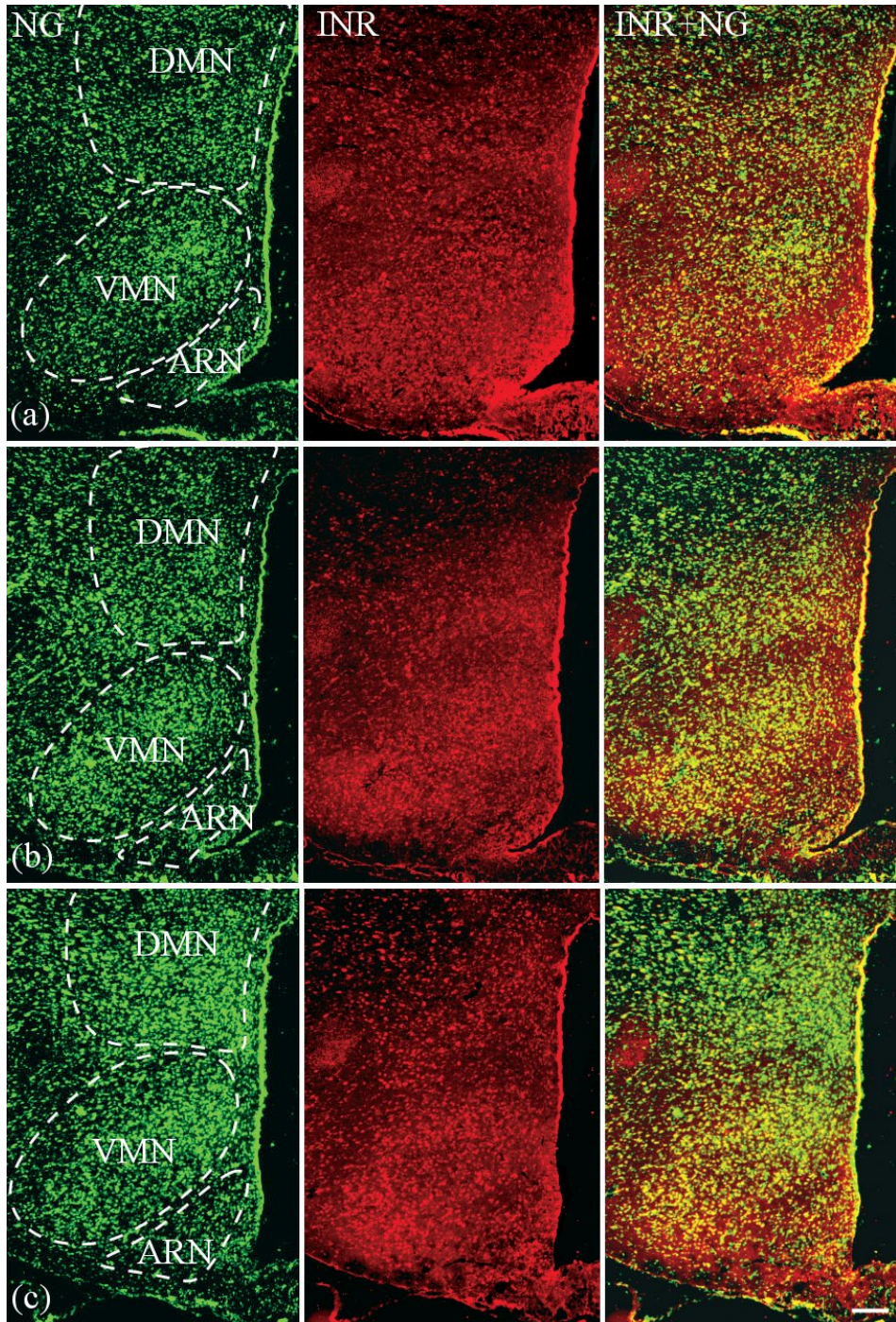


Рис. 1. Микрофотографии с двойным мечением: окраска NeuroTrace Green (NG, зеленый, левый ряд), INR (красный, средний ряд), комбинированное фото INR+NG (правый ряд) нейронов 2- (а), 12- (б) и 24-месячных (с) крыс. ARN – аркуатное, DMN – дорсомедиальное и VMN – вентромедиальное ядро. Флуоресценция СуЗ (красный), NeuroTrace Green (зеленый). Масштаб – 300 мкм.

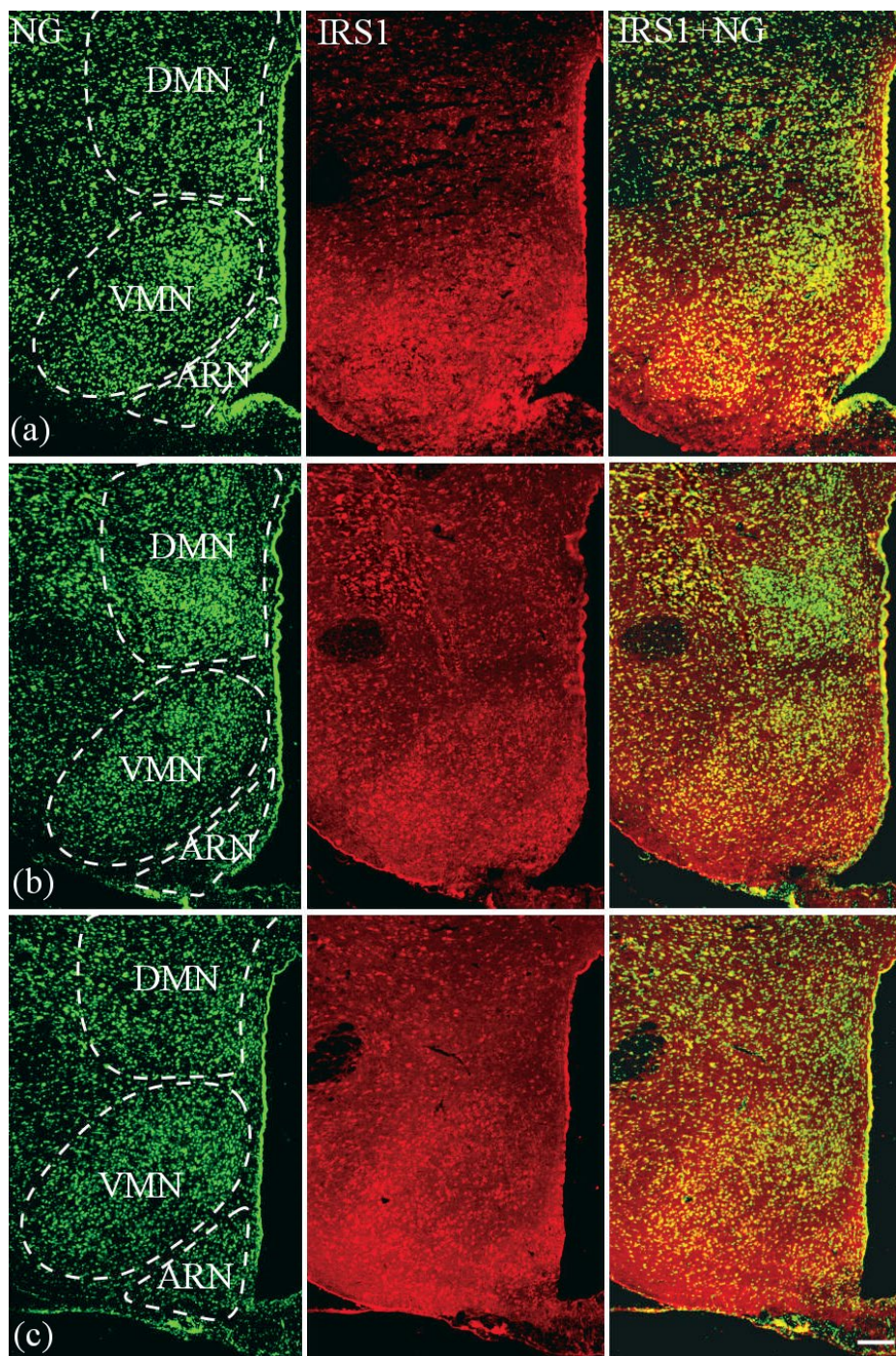
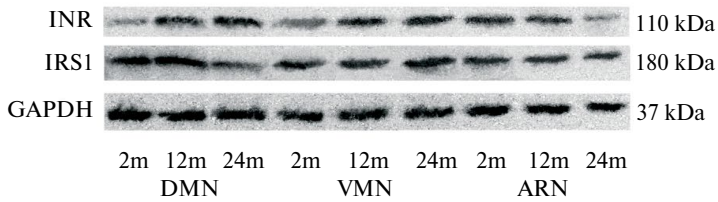
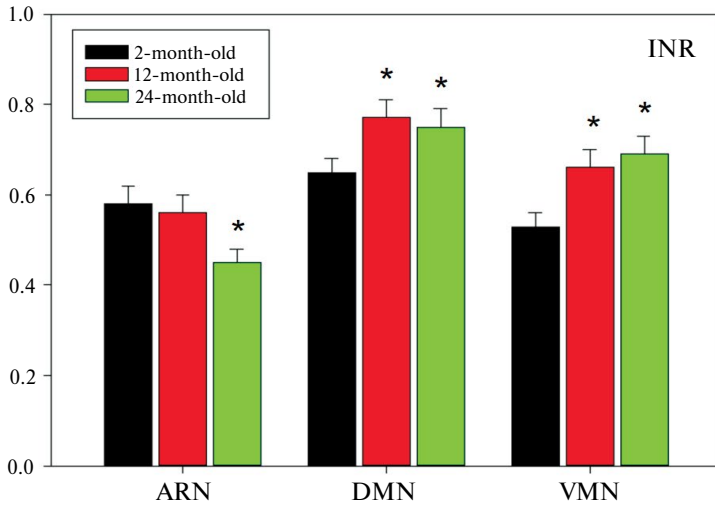


Рис. 2. Микрофотографии с двойным мечением: окраска NeuroTrace Green (NG, зеленый, левый ряд), IRS1 (красный, средний ряд), комбинированное фото IRS1+NG (правый ряд) нейронов 2- (а), 12- (б) и 24-месячных (с) крыс. ARN – аркуатное, DMN – дорсомедиальное и VMN – вентромедиальное ядро. Флуоресценция Су3 (красный), NeuroTrace Green (зеленый). Масштаб – 300 мкм.



(a)



(b)

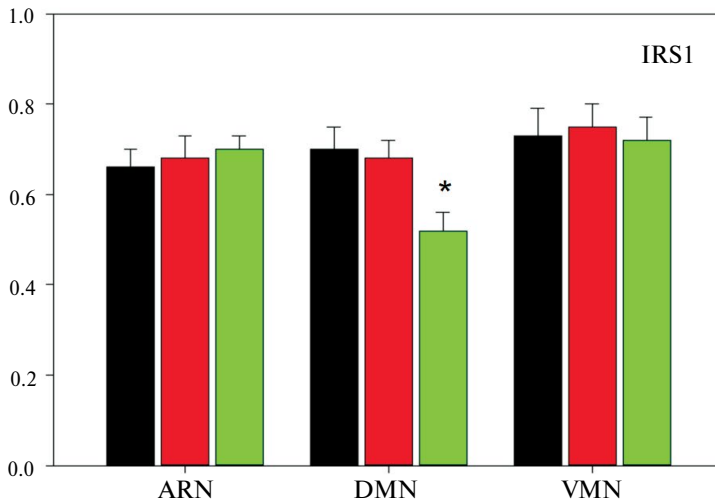


Рис. 3. Вестерн-блоты INR и IRS1 (а), количественный анализ уровня экспрессии белков INR (b), IRS1 (с) в дорсомедиальном (DMN), вентромедиальном (VMN) и аркуатном (ARN) ядрах гипоталамуса у 2- (2m), 12- (12m) и 24-месячных (24m) крыс. Данные представлены в процентах от уровня экспрессии GAPDH.

* $p < 0.05$; различия достоверны по сравнению с 2-месячными крысами.

экспрессия INR и IRS1 и процентное содержание INR-ИР и IRS1-ИР нейронов варьирует в отдельных ядрах медиобазального гипоталамуса крысы и с течением возраста изменяется разнонаправленно. С возрастом экспрессия INR и доля INR-ИР нейронов снижается в ARN и увеличивается в DMN и VMN. Однако экспрессия IRS1 и процент IRS1-ИР нейронов не меняется в ARN и VMN и снижается в DMN по мере старения.

У млекопитающих, но не у беспозвоночных, активность пути инсулин/IGF1 регулируется гормоном роста, секретируемым гипофизом. Секреция гормона роста снижается с возрастом [20]. Литературные данные свидетельствуют о том, что ослабление инсулинового сигналинга у старых животных продлевает продолжительность жизни [6–9]. Тем не менее изменения в начальных компонентах инсулинового сигналинга, включая INR и IRS1, могут оказывать неоднозначное влияние на старение млекопитающих.

Глобальное ослабление инсулинового сигналинга за счет нокаута INR приводит к ранней смертности [21, 22]. Полное нарушение передачи сигналов инсулина вызывает метаболический синдром, снижение размеров тела и фертильности [23]. Также инсулин в головном мозге действует как нейропротектор, снижая повреждения, вызванные ишемией, токсичностью β -амилоида, окислительным стрессом и апоптозом [24]. Резистентность мозга к инсулину и низкие уровни инсулина в мозге часто приводят к метаболическим и когнитивным дисфункциям, включая такие возраст-зависимые заболевания, как ожирение, сахарный диабет 2-го типа и болезнь Альцгеймера [25, 26].

Гипоталамическая инсулинорезистентность, связанная с ожирением, возникает быстрее, чем в других инсулинчувствительных тканях [27]. Тем не менее избирательное удаление INR в орексигенных и анорексигенных нейронах ARN оказывает лишь умеренное влияние на энергетический баланс [28, 29]. Кроме того, мышцы, у которых отсутствовал INR в нейронах латерального гипоталамуса, содержащих меланин-концентрирующий гормон, имели худощавый фенотип и демонстрировали улучшенную двигательную активность и чувствительность к инсулину при диете с высоким содержанием жиров [30].

Возрастные заболевания, такие как ожирение, кожные патологии, остеопороз, саркопения и непереносимость глюкозы, реже встречались у мышей с полным нокаутом IRS1 [31]. По сравнению с делецией IRS1 в мышцах, печени и жире, нейрон-селективный нокаут IRS1 увеличивал потребление энергии, двигательную активность и чувствительность к инсулину, особенно у старых самцов мышей, но не увеличивал продолжительность жизни [32]. В то же время при интраназальном введении инсулина в ЦНС генная экспрессия и содержание белка INR в структурах мозга резко снижаются, что связано с необходимостью снизить избыточную активацию инсулином его сигнальных путей в мозге, а при сахарном диабете 1-го типа в условиях системного дефицита инсулина содержание инсулиновых рецепторов в ЦНС возрастает [33]. Также установлено, что при выключении одного из типов IRS возникает компенсаторная активация другого подтипа в коре головного мозга. Фосфорилирование IRS1 по остаткам серина может ингибировать активность IRS1. При этом при инсулинорезистентности чувствительность инсулиновых рецепторов головного мозга и уровни экспрессии IRS1/2 могут снижаться в сочетании с повышенным уровнем фосфорилирования IRS1 [34, 35].

Различия экспрессии INR и IRS1 в различных ядрах туберальной группы гипоталамуса могут быть связаны с их функциональными особенностями. В частности, в ARN отмечается повышенная проницаемость гематоэнцефалического барьера по сравнению с DMN и VMN. При этом глюкоза и жирные кислоты стимулируют путь, связанный с активацией NF- κ B и развитием нейровоспаления в первую очередь в области вышеуказанного ядра, что может объяснять снижение экспрессии INR в ARN по сравнению с DMN и VMN [16]. У мышей с экспериментальным сахарным диабетом экспрессия INR была также снижена в жировой ткани [36]. Процент нейронов, имму-

нопозитивных к мишени рапамицина млекопитающих (mTOR), являющегося одним из звеньев внутриклеточной передачи инсулинового сигнала, снижается в DMN и не изменяется в VMN при старении [18], что соответствует изменениям экспрессии IRS1, выявленным в настоящей работе.

При старении в ядрах гипоталамуса происходит усиление взаимно противоположных процессов торможения и возбуждения, связанных с активацией ГАМК и глутаматергической системы [37], наблюдается дисбаланс нейронального кальциевого сигналинга [38, 39], а также разнонаправленные изменения компонентов внутриклеточного сигналинга, в частности, PI3K/АКТ/mTOR [18]. Данные, полученные методом транскриптомики одиночных клеток, свидетельствуют о возрастании транскрипционной гетерогенности при старении [40].

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что при старении в туберальных ядрах гипоталамуса выявляются разнонаправленные изменения экспрессии начального звена инсулинового сигналинга, включая INR и IRS1, которые являются проявлением более общего процесса увеличения гетерогенности в стареющих органах и тканях, что приводит к регуляторным нарушениям и развитию возраст-зависимых заболеваний.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента – П. М. М., сбор данных – П. А. А., Е. С. Ш., обработка данных – В. В. П., Л. Г. П., написание и редактирование статьи – П. М. М., В. В. П.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств РНФ (грант 19-15-00039). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Ярославского государственного медицинского университета Минздрава РФ (протокол № 60 от 16.02.2023 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Шпаков АО* (2015) Функциональная активность инсулиновой сигнальной системы мозга в норме и при сахарном диабете 2-го типа. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 101: 1103–1127. [*Shpakov AO* (2015) Functional activity of the brain insulin signaling system in norm and in type 2 diabetes mellitus. *Russ J Physiol* 101: 1103–1127 (In Russ)].
2. *Chen W, Cai W, Hoover B, Kahn CR* (2022) Insulin action in the brain: cell types, circuits, and diseases. *Trends Neurosci* 45(5): 384–400. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2022.03.001>
3. *Haessler RA, McGraw TE, Accili D* (2018) Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(1): 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
4. *Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF* (2015) Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res* 35: 600–604. <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1030412>

5. *Pomytkin I, Costa-Nunes JP, Kasatkin V, Veniaminova E, Demchenko A, Lyundup A, Lesch KP, Ponomarev ED, Strekalova T* (2018) Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment. *CNS Neurosci Ther* 24: 763–774.
<https://doi.org/10.1111/cns.12866>
6. *Anisimov VN, Bartke A* (2013) The key role of growth hormone-insulin-IGF-1 signaling in aging and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 87: 201–223.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.01.005>
7. *Bartke A, Brown-Borg H* (2021) Mutations Affecting Mammalian Aging: GH and GHR vs IGF-1 and Insulin. *Front Genet* 12: 667355.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.667355>
8. *Tabibzadeh S* (2021) Signaling pathways and effectors of aging. *Front Biosci (Landmark Ed)* 26: 50–96.
<https://doi.org/10.2741/4889>
9. *Lee H, Lee SV* (2022) Recent Progress in Regulation of Aging by Insulin/IGF-1 Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells* 45: 763–770.
<https://doi.org/10.14348/molcells.2022.0097>
10. *Masliukov PM* (2023) Changes of Signaling Pathways in Hypothalamic Neurons with Aging. *Curr Issues Mol Biol* 45: 8289–8308.
<https://doi.org/10.3390/cimb45100523>
11. *Mannick JB, Lamming DW* (2023) Targeting the biology of aging with mTOR inhibitors. *Nat Aging* 3: 642–660.
<https://doi.org/10.1038/s43587-023-00416-y>
12. *Denley A, Carroll JM, Brierley GV, Cosgrove L, Wallace J, Forbes B, Roberts CT Jr* (2007) Differential activation of insulin receptor substrates 1 and 2 by insulin-like growth factor-activated insulin receptors. *Mol Cell Biol* 27: 3569–3577.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01447-06>
13. *Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE* (2012) Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest* 122: 1316–1338.
<https://doi.org/10.1172/JCI59903>
14. *Hakuno F, Takahashi SI* (2018) IGF1 receptor signaling pathways. *J Mol Endocrinol* 61: T69–T86.
<https://doi.org/10.1530/JME-17-0311>
15. *Masliukov PM, Nozdrachev AD* (2021) Hypothalamic Regulatory Mechanisms of Aging. *J Evol Biochem Phys* 57: 473–491.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021030030>
16. *Cai D, Khor S* (2021) Hypothalamic microinflammation. *Handb Clin Neurol* 181: 311–322.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820683-6.00023-3>
17. *Anfimova PA, Moiseev KY, Porseva VV, Pankrasheva LG, Masliukov PM* (2022) mTOR Expression in Neurons of the Rat Tuberal Hypothalamus in Aging. *J Evol Biochem Phys* 58: 1464–1470.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022050167>
18. *Pankrasheva LG, Anfimova PA, Moiseev KY, Shirina ES, Masliukov PM* (2023) PI3K/Akt/mTOR-immunoreactive neurons in the rat mediobasal hypothalamus during aging. *Neurosci Behav Physiol* 53: 1319–1329.
<https://doi.org/10.1007/s11055-023-01504-7>
19. *Paxinos G, Watson C* (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th Edition. Elsevier Acad Press.
20. *Ashpole NM, Sanders JE, Hodges EL, Yan H, Sonntag WE* (2015) Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging brain. *Exp Gerontol* 68: 76–81.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.10.002>
21. *Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A* (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75: 59–72.
22. *Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, José PA, Taylor SI, Westphal H* (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 12: 106–109.
<https://doi.org/10.1038/ng0196-106>
23. *Rincon M, Muzumdar R, Atzmon G, Barzilai N* (2004) The paradox of the insulin/IGF-1 signaling pathway in longevity. *Mech Ageing Dev* 125(6): 397–403.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.03.006>

24. Agrawal R, Reno CM, Sharma S, Christensen C, Huang Y, Fisher SJ (2021) Insulin action in the brain regulates both central and peripheral functions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 321: E156–E163. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00642.2020>
25. Ezkurdia A, Ramirez MJ, Solas M (2023) Metabolic Syndrome as a Risk Factor for Alzheimer's Disease: A Focus on Insulin Resistance. *Int J Mol Sci* 24: 4354. <https://doi.org/10.3390/ijms24054354>
26. Shpakov AO, Derkach KV, Berstein LM (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci OA* 1: FSO25. <https://doi.org/10.4155/fso.15.23>
27. Ono H (2019) Molecular Mechanisms of Hypothalamic Insulin Resistance. *Int J Mol Sci* 20: 1317. <https://doi.org/10.3390/ijms20061317>
28. Könnner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X, Xu C, Enriori P, Hampel B, Barsh GS, Kahn CR, Cowley MA, Ashcroft FM, Brüning JC (2007) Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab* 5: 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.05.004>
29. Shin AC, Filatova N, Lindtner C, Chi T, Degann S, Oberlin D, Buettner C (2017) Insulin Receptor Signaling in POMC, but Not AgRP, Neurons Controls Adipose Tissue Insulin Action. *Diabetes* 66: 1560–1571. <https://doi.org/10.2337/db16-1238>
30. Hausen AC, Ruud J, Jiang H, Hess S, Varbanov H, Kloppenburg P, Brüning JC (2016) Insulin-Dependent Activation of MCH Neurons Impairs Locomotor Activity and Insulin Sensitivity in Obesity. *Cell Rep* 17: 2512–2521. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.030>
31. Selman C, Lingard S, Choudhury AI, Batterham RL, Claret M, Clements M, Ramadani F, Okkenhaug K, Schuster E, Blanc E, Piper MD, Al-Qassab H, Speakman JR, Carmignac D, Robinson IC, Thornton JM, Gems D, Partridge L, Withers DJ (2008) Evidence for lifespan extension and delayed age-related biomarkers in insulin receptor substrate 1 null mice. *FASEB J* 22: 807–818. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9261com>
32. Baghdadi M, Nesipital T, Mesaros A, Buschbaum S, Withers DJ, Grönke S, Partridge L (2023) Reduced insulin signaling in neurons induces sex-specific health benefits. *Sci Adv* 9: eade8137. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade8137>
33. Derkach KV, Ivantsov AO, Chistyakova OV, Sukhov IB, Buzanakov DM, Kulikova AA, Shpakov AO (2017) Intranasal Insulin Restores Metabolic Parameters and Insulin Sensitivity in Rats with Metabolic Syndrome. *Bull Exp Biol Med* 163: 184–189. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3762-6>
34. Ochiai T, Sano T, Nagayama T, Kubota N, Kadowaki T, Wakabayashi T, Iwatsubo T (2021) Differential involvement of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in brain insulin signaling is associated with the effects on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 159: 105510. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105510>
35. Kleinridders A (2016) Deciphering Brain Insulin Receptor and Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Signalling. *J Neuroendocrinol* 28: 10.1111. <https://doi.org/10.1111/jne.12433>
36. Moruzzi N, Lazzeri-Barcelo F, Valladolid-Acebes I, Moede T, Paschen M, Leibiger B, Berggren PO, Leibiger IB (2021) Tissue-specific expression of insulin receptor isoforms in obesity/type 2 diabetes mouse models. *J Cell Mol Med* 25: 4800–4813. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16452>
37. Anfimova PA, Pankrasheva LG, Emanuilov AI, Moiseev KY, Maslyukov PM (2024) Expression of GAD65/67 and VGLUT2 in Mediobasal Nuclei of Rat Hypothalamus during Aging. *Bull Exp Biol Med* 176: 232–234. <https://doi.org/10.1007/s10517-024-06001-6>
38. Vishnyakova PA, Moiseev KY, Spirichev AA, Emanuilov AI, Nozdachev AD, Masliukov PM (2021) Expression of calbindin and calretinin in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei during aging. *Anat Rec (Hoboken)*. 304: 1094–1104. <https://doi.org/10.1002/ar.24536>
39. Kumar A (2020) Calcium Signaling During Brain Aging and Its Influence on the Hippocampal Synaptic Plasticity. *Adv Exp Med Biol* 1131: 985–1012. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_39
40. Uyar B, Palmer D, Kowald A, Murua Escobar H, Barrantes I, Möller S, Akalin A, Fuellen G (2020) Single-cell analyses of aging, inflammation and senescence. *Ageing Res Rev* 64: 101156. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101156>

Insulin Signaling in Neurons of the Tuberal Area of the Hypothalamus of Rats During Aging

**P. A. Anfimova^a, V. V. Porseva^a, L. G. Pankrasheva^a, E. S. Shirina^a,
and P. M. Masliukov^{a,*}**

^aYaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

**e-mail: mpm@ysmu.ru*

The hypothalamus is a regulatory center that controls homeostasis, reproduction, circadian rhythms and the endocrine system. It is also involved in the regulation of aging. The expression of insulin receptors (INR) as well as insulin receptor substrate 1 (IRS-1) was studied in neurons of the arcuate (ARN), dorsomedial (DMN) and ventromedial (VMN) nuclei of the rat hypothalamus using immunohistochemistry and Western blotting in young males (2 months), adult (12 months) and old (24 months) rats. The results showed that the expression of INR and IRS1 in neurons of the nuclei of the mediobasal hypothalamus of rats changes in different directions with age. With age, INR expression decreases in the ARN and increases in the DMN and VMN. IRS1 expression is unchanged in the ARN and VMN and decreases in the DMN with aging.

Keywords: Insulin signaling, immunohistochemistry, hypothalamus, aging