

- the possible protective role of ginseng. *Egyptian Journal of Histology*. 2015;38(2):157-167. <https://doi.org/10.1097/01.EHX.0000464738.41270.06>
12. Арушанян Э. Б. Влияние мелатонина на тромбоцитарный гемостаз и его циркадную организацию. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2013;76(5):32-36. [Arushanian É. B. Effect of melatonin on the thrombocyte hemostasis and its circadian organization. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya*. – *Eksp. Klin. Farmakol.* 2013;76(5):32-36. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2013-76-5-32-36>
13. Kumari S., Dash D. Melatonin elevates intracellular free calcium in human platelets by inositol 1,4,5-trisphosphate independent mechanism. *FEBS Lett.* 2011;585(14):2345-2351. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.067>
14. Arushanyan E. B., Shchetinin E. V. Endothelial dysfunction and melatonin. *Medical News of North Caucasus* 2015;10(2):196-206. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2015.10046>
15. Ройтман Е. В. Know-how лабораторной диагностики состояния системы свертывания крови. *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2015;2(1):27-35. [Roitman E. V. Know-how of laboratory diagnostics of the state of the blood coagulation system. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii*. – *Russian J. Pediatric Hematol. Oncol.* 2015;2(1):27-35. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17650/2311-1267-2015-1-27-35>
16. Момот А. П. Проблема тромбофилии в клинической практике. *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2015;1:36-48. [Momot A. P. The problem of thrombophilia in clinical practice. *Rossiyskiy zhurnal detskoy gematologii i onkologii*. – *Russian J. Pediatric Hematol. Oncol.* 2015;1:36-48. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17650/2311-1267-2015-1-36-48>
17. Byshevskii A. Sh., Galian S. L., Ralchenko I. V. Erythrocytes and leucocytes in realization of communication between lipid peroxidation and hemostasis. *Biomed. Khim.* 2006;52(4):370-377.

Поступила 05.08.2022

Сведения об авторах:

Брин Вадим Борисович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии; тел.: 89188261559; e-mail: vbbrin@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8382-3210>

Гаглоева Эльмира Муратовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры; тел.: 89188231442; e-mail: mira-med@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7220-1798>

Соколовский Николай Валерьевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии с судебной медициной; тел.: 89188202423; <https://orcid.org/0000-0002-3517-4524>

© Коллектив авторов, 2023
УДК 616.831.4+577.216.9+612.67
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2023.18068>
ISSN – 2073-8137

ЭФФЕКТЫ ВНУТРИГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ И МИМЕТИКОВ МИКРОРНК НА БИОМАРКЕРЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ СТАРЕНИИ У КРЫСЫ

П. М. Маслюков, В. В. Порсева, П. А. Анфимова,
Л. Г. Панкрасхева, А. А. Баранов, Н. Ю. Левшин, К. Ю. Моисеев

Ярославский государственный медицинский университет, Российская Федерация

INFLUENCES OF INTRAHYPOTHALAMIC ADMINISTRATION OF MICRORNA INHIBITORS AND MIMETICS ON BLOOD PLASMA BIOMARKERS WITH AGING OF THE RAT

Masliukov P. M., Porseva V. V., Anfimova P. A.,
Pankrasheva L. G., Baranov A. A., Levshin N. Yu., Moiseev K. Yu.

Yaroslavl State Medical University, Russian Federation

Определялись эффекты ингибиторов и миметиков микроРНК let-7a, miR-9a, miR-132, miR-218a при их инъекции в дорсомедиальное ядро гипоталамуса (ДМЯ) на показатели плазмы крови (С-реактивного белка (СРБ), миоглобина, гормона роста и тестостерона) у самцов крыс в возрасте 3 и 24 месяцев. У 24-месячных контрольных крыс уровень СРБ был достоверно увеличен, а уровень миоглобина был уменьшен относительно показателей 3-месячных крыс. Инъекция ингибиторов микроРНК вызывала уменьшение содержания СРБ и снижение содержания миоглобина, а введение миметиков микроРНК приводило к обратным эффектам. Не обнаружено достоверных различий по содержанию соматотропного гормона и тестостерона между контрольными и опытными группами, а также между 3- и 24-месячными крысами.

Ключевые слова: гипоталамус, старение, микроРНК, биомаркеры плазмы крови

The effect of let-7a-5p, miR-9a-3p, miR-132-3p, miR-218a-5p microRNA inhibitors and mimetics, when administered into the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DNA), on markers of age-related changes in blood plasma in 3-month-old and 24-month-old male rats was studied. In 24-month-old control rats, the content of C-reactive protein (CRP) increased, and the level of myoglobin decreased compared to 3-month-old animals. With the introduction of miRNA inhibitors, the level of CRP significantly increased, and the content of myoglobin decreased, and the introduction of miRNA mimetics led to the reverse changes. We did not find significant differences in the content of somatotrophic hormone and testosterone between the control and experimental groups as well as between 3-month-old and 24-month-old animals.

Keywords: hypothalamus, aging, microRNA, blood plasma biomarkers

Для цитирования: Маслюков П. М., Порсева В. В., Анфимова П. А., Панкрасхева Л. Г., Баранов А. А., Левшин Н. Ю., Моисеев К. Ю. ЭФФЕКТЫ ВНУТРИГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ И МИМЕТИКОВ МИКРОРНК НА БИОМАРКЕРЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ СТАРЕНИИ У КРЫСЫ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2023;18(3):292-295. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2023.18068>

For citation: Masliukov P. M., Porseva V. V., Anfimova P. A., Pankrasheva L. G., Baranov A. A., Levshin N. Yu., Moiseev K. Yu. INFLUENCES OF INTRANHYPOTHALAMIC ADMINISTRATION OF MICRORNA INHIBITORS AND MIMETICS ON BLOOD PLASMA BIOMARKERS WITH AGING OF THE RAT. *Medical News of North Caucasus*. 2023;18(3):292-295. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2023.18068> (In Russ.)

ДМЯ – дорсомедиальное ядро гипоталамуса
СМЖ – спинномозговая жидкость

СРБ – С-реактивный белок

Гипоталамус является важнейшим центром поддержания гомеостаза и регуляции деятельности эндокринной системы, участвующим в регуляции морфогенеза, биологических ритмов, полового поведения и обмена веществ. Есть данные об участии гипоталамуса в механизмах старения [1–3].

Обнаружено, что в медиальной группе ядер гипоталамуса с возрастом изменяется экспрессия кальций-связывающих белков, NO синтазы, а также снижается частота импульсации нейронов [4–6]. При этом важная роль в регуляции старения отводится дорсомедиальному ядру гипоталамуса (ДМЯ), которое принимает участие в контроле метаболизма и, наряду с супрахиазмальным ядром, в регуляции ритмической деятельности [1, 7]. В осуществлении этих процессов доказано участие экзосомальных микроРНК [8]. Было доказано, что при старении в ДМЯ снижается уровень таких микроРНК, как let-7a, miR-9, miR-132, miR-218, преимущественно у самцов [9].

При старении изменяются биохимические показатели крови. Литературные данные свидетельствуют, что у крыс при старении в плазме снижается содержание миоглобина, тестостерона и соматотропного гормона, повышается уровень С-реактивного белка (СРБ) [10–12].

Целью исследования явилось определение влияния ингибиторов и миметиков микроРНК let-7a-5p, miR-9a-3p, miR-132-3p, miR-218a-5p при их введении в дорсомедиальное ядро гипоталамуса (ДМЯ) на маркеры возрастных изменений в плазме крови у молодых и старых самцов крыс.

Материал и методы. Работа выполнена на самцах (n=49) крыс Вистар в возрасте 3 месяцев (n=22, молодые) и 24 месяцев (n=27, старые) в соответствии с протоколом Этического комитета медицинского университета. Эвтаназию животных осуществляли под уретановым наркозом (3 г/кг, внутривенно).

Для каждого возраста были сформированы 2 опытные и 2 контрольные группы. В первой опытной группе крысам в дорсомедиальное ядро гипоталамуса (ДМЯ) с использованием стереотаксической методики с двух сторон инъецировали смесь ингибиторов микроРНК (анти-let-7a-5p, анти-miR-9a-3p, анти-miR-132-3p, анти-miR-218a-5p, Формула Гена, Россия), во второй – смесь агонистов микроРНК

let-7a-5p, miR-9a-3p, miR-132-3p, miR-218a-5p (mirVana™, ThermoFisher Scientific) в концентрации 200 пМоль. В первой контрольной группе производили введение стерильной искусственной спинномозговой жидкости (СМЖ), во второй – микроРНК с бессмысленной последовательностью в качестве отрицательного контроля, в том же объеме, что и опытным группам.

Сразу после стереотаксического введения препаратов в ДМЯ из вены хвоста забирали 0,5 мл крови. Окончательный забор крови проводили из камеры сердца спустя 60 суток, после эвтаназии. Кровь собирали в пробирку, обработанную гепарином, центрифугировали в течение 9 минут при 4000 оборотов в минуту. Определяли уровень СРБ, миоглобина, гормона роста, тестостерона в плазме крови при помощи иммуноферментного анализа в соответствии с протоколом производителя. Оптическую плотность в лунках планшета измеряли с помощью планшетного спектрофотометра Immunochem 2100 (High Technology, США) на длине волны 450 нм.

Математическая обработка данных проведена с использованием пакетов прикладных программ Sigma Plot (StatSoft, USA). Все величины представлены как средняя арифметическая ± ошибка среднего (M±m). Достоверность различий средних величин определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с коррекцией Бонферрони. Достоверными считали различия при p<0,05.

Результаты и обсуждение. Инъекция ингибиторов микроРНК в ДМЯ 24-месячным животным вызывала выраженную гибель крыс по сравнению с контролем, а также в сравнении с более молодыми животными. Из 22 молодых 3-месячных крыс (11 опытных и 11 контрольных) погибли 1 опытный и 1 контрольный. В группе из 27 старых 24-месячных крыс (16 опытных и 11 контрольных) умерли 6 опытных и только 1 контрольный. Среди 10 крыс с введением ингибиторов погибли 5, а из 6 с инъекцией агонистов микроРНК погиб только 1. В связи с этим возникла необходимость увеличить количество животных в опытной группе старых крыс, которым вводились ингибиторы микроРНК, для получения адекватного количества выживших животных (5) при последующей статистической обработке результатов.

У 3-месячных крыс масса тела находилась в диапазоне от 250±11 до 276±8 г, различия между опытными и контрольными группами не были достоверными ($p>0,05$, табл. 1). Данный параметр у 24-месячных старых крыс при применении ингибиторов микроРНК достоверно увеличивался по сравнению с контролем ($p<0,05$). Введение агонистов микроРНК не вызывало достоверных изменений массы тела в сравнении с контрольной группой ($p>0,05$).

Таблица 1

Вес крыс (г) в контрольных и опытных группах (при введении ингибиторов или агонистов микроРНК)

Возраст	Контрольная группа (СМЖ)	Контрольная группа (микроРНК)	Опытная группа (ингибиторы микроРНК)	Опытная группа (агонисты микроРНК)
3 месяца	250±11	252±10	265±10	272±8
24 месяца	397±16	400±17	457±23*	411±18

Примечание. Здесь и далее в контрольной группе 1 вводилась стерильная искусственная спинномозговая жидкость (контрольная группа СМЖ), во второй контрольной группе – микроРНК с бессмысленной последовательностью как отрицательный контроль (контрольная группа микроРНК).

*Достоверные отличия по сравнению с контрольными группами ($p<0,05$).

У 3-месячных крыс не было достоверных изменений между опытной и контрольной группами по содержанию СРБ ($p>0,05$, табл. 2). У 24-месячных крыс в контроле СРБ был достоверно выше по сравнению с молодыми животными, а при введении ингибиторов микроРНК достоверно увеличивался по сравнению с контрольной группой ($p<0,001$). При введении миметиков микроРНК у старых животных уровень СРБ снижался до 23±5,1 нг/мл, однако эти различия не были достоверны в сравнении с контрольной группой ($p>0,05$).

Таблица 2

Содержание С-реактивного белка (нг/мл) в контрольных группах и в опытных группах (при введении ингибиторов или агонистов микроРНК)

Возраст	Контрольная группа (СМЖ)	Контрольная группа (микроРНК)	Опытная группа (ингибиторы микроРНК)	Опытная группа (агонисты микроРНК)
3 месяца	12±2,5	11±1,9	11±1,5	13±2,7
24 месяца	27±4,8	31±4,1	93±11,6*	23±5,1

*Достоверные отличия по сравнению с контрольными группами ($p<0,001$).

Уровень миоглобина у 3-месячных крыс не отличался в опытной и контрольной группах ($p>0,05$, табл. 3). У 24-месячных крыс в контроле содержание миоглобина в плазме было меньше по сравнению с молодыми животными ($p<0,05$). Инъекция ингиби-

торов микроРНК приводила к снижению содержания миоглобина по сравнению с контролем ($p<0,001$). При введении агонистов микроРНК у 24-месячных животных уровень миоглобина достоверно возрастал в сравнении с контрольной группой и опытной с введением ингибиторов микроРНК в этом возрасте.

Таблица 3

Содержание миоглобина (нг/мл) в контрольных группах и в опытных группах (при введении ингибиторов или агонистов микроРНК)

Возраст	Контрольная группа (СМЖ)	Контрольная группа (микроРНК)	Опытная группа (ингибиторы микроРНК)	Опытная группа (агонисты микроРНК)
3 месяца	200±21,3	226±18,5	216±21,5	199±18,1
24 месяца	141±22,6	151±25,1	48±9,3*	188±17,3

*Достоверные отличия по сравнению с контрольными группами ($p<0,001$).

Содержание гормона роста значительно варьировало – от 13,3 до 256,7 нг/мл, а тестостерона – от 0,9 до 3,4 нмоль/л в опытной и контрольной группах в обоих возрастах без достоверных различий между группами ($p>0,05$).

Полученные результаты подтверждают имеющиеся литературные данные о возрастных изменениях таких параметров плазмы крови, как СРБ и миоглобин в контроле [10, 11]. Увеличение с возрастом содержания СРБ свидетельствует об активации воспалительных процессов при старении [13]. В отличие от ряда работ [11, 12], мы не обнаружили достоверных изменений тестостерона и гормона роста при старении в контроле у крыс, что связано с достаточно большим разбросом этих показателей в пределах каждой группы.

МикроРНК let-7 участвует в регуляции пролиферации клеток, а также обмена веществ, воздействуя на компоненты инсулинового сигналинга [14]. Уровень экспрессии miR-9 нарушается при нейродегенеративных расстройствах, в частности подавляется при болезни Альцгеймера [15]. Старение связано с воспалением гипоталамуса через активацию пути NF-κB [1, 16]. При этом miR-218 участвует в ингибировании пути провоспалительного ядерного фактора κB, обладает противоопухолевым эффектом [17, 18], а miR-132 может способствовать противовоспалительным ответам [19].

Заключение. Таким образом, введение ингибиторов микроРНК let-7a-5p, miR-9a-3p, miR-132-3p, miR-218a-5p в ДМЯ на фоне их снижения с возрастом в этом ядре увеличивает риск смерти и ухудшает содержание маркеров возрастных изменений у самцов крыс. Введение агонистов микроРНК приводило к обратным результатам.

Источники финансирования. Работа поддержана РНФ (грант 19-15-00039).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

- Masliukov P. M., Nozdrachev A. D. Hypothalamic Regulatory Mechanisms of Aging. *J. Evol. Biochem. Phys.* 2021;57:473-491. <https://doi.org/10.1134/S0022093021030030>
- Xiao Y. Z., Yang M., Xiao Y., Guo Q., Huang Y. [et al.]. Reducing Hypothalamic Stem Cell Senescence Protects

against Aging-Associated Physiological Decline. *Cell. Metab.* 2020;31(3):534-548.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.002>

- Liu T., Xu Y., Yi C. X., Tong Q., Cai D. The hypothalamus for whole-body physiology: from metabolism to aging. *Protein Cell.* 2022;13(6):394-421. <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00834-x>

4. Moiseev K. Y., Vishnyakova P. A., Porseva V. V., Masliukov A. P., Spirichev A. A. [et al.]. Changes of nNOS expression in the tuberal hypothalamic nuclei during ageing. *Nitric Oxide*. 2020;100-101:1-6. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.04.002>
5. Vishnyakova P. A., Moiseev K. Y., Spirichev A. A., Emanuilov A. I., Nozdrachev A. D., Masliukov P. M. Expression of calbindin and calretinin in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei during aging. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 2021;304(5):1094-1104. <https://doi.org/10.1002/ar.24536>
6. Moiseev K. Y., Spirichev A. A., Vishnyakova P. A., Pankrasheva L. G., Masliukov P. M. Changes of discharge properties of neurons from dorsomedial hypothalamic nuclei during aging in rats. *Neurosci. Lett.* 2021;762:136168. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136168>
7. Kambe Y., Nguyen T. T., Yasaka T., Nguyen T. T., Sameshima Y. [et al.]. The Pivotal Role of Neuropeptide Crosstalk from Ventromedial-PACAP to Dorsomedial-Galanin in the Appetite Regulation in the Mouse Hypothalamus. *Mol. Neurobiol.* 2022. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03084-y>
8. Zhang Y., Kim M. S., Jia B., Yan J., Zuniga-Hertz J. P. [et al.]. Hypothalamic stem cells control ageing speed partly through exosomal miRNAs. *Nature*. 2017;548(7665):52-57. <https://doi.org/10.1038/nature23282>
9. Porseva V. V., Levshin N. Yu., Moiseev K. Yu., Pankrasheva L. G., Baranov A. A. [et al.]. Let-7a, mir-9, mir-132 and mir-218 microRNA Expression in the Dorsomedial and Ventromedial Hypothalamic Nuclei during Aging in Rats. *Adv. Gerontol.* 2021;11(4):346-350. <https://doi.org/10.1134/S207905702104010X>
10. Gordon C. J., Rowsey P. J., Bishop B. L., Ward W. O., Macphail R. C. Serum biomarkers of aging in the Brown Norway rat. *Exp. Gerontol.* 2011;46(11):953-957. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.07.006>
11. Tian Z. Ageing-Associated Transcriptomic Alterations in Peri-Implantitis Pathology: A Bioinformatic Study. *Dis. Markers*. 2022;2022:8456968. <https://doi.org/10.1155/2022/8456968>
12. Tresguerres J. Á. F., Fernández-Tresguerres I., Viña J., Rancan L., Paredes S. D. [et al.]. Effects of GH on the Aging Process in Several Organs: Mechanisms of Action. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(14):7848. <https://doi.org/10.3390/ijms23147848>
13. Neves J., Sousa-Victor P. Regulation of inflammation as an anti-aging intervention. *FEBS J.* 2020;287(1):43-52. <https://doi.org/10.1111/febs.15061>
14. Jiang S. A Regulator of Metabolic Reprogramming: MicroRNA Let-7. *Transl. Oncol.* 2019;12(7):1005-1013. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.04.013>
15. Subramanian M., Hyeon S. J., Das T., Suh Y. S., Kim Y. K. [et al.]. UBE4B, a microRNA-9 target gene, promotes autophagy-mediated Tau degradation. *Nat. Commun.* 2021;12(1):3291. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23597-9>
16. Cai D., Khor S. «Hypothalamic Microinflammation» Paradigm in Aging and Metabolic Diseases. *Cell. Metab.* 2019;30(1):19-35. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.021>
17. Sato K., Osaka E., Fujiwara K., Fujii R., Takayama T. [et al.]. miRNA-218 targets multiple oncogenes and is a therapeutic target for osteosarcoma. *Oncol. Rep.* 2022;47(5):92. <https://doi.org/10.3892/or.2022.8303>
18. Li M., Guo Q., Cai H., Wang H., Ma Z., Zhang X. miR-218 regulates diabetic nephropathy via targeting IKK-β and modulating NK-κB-mediated inflammation. *J. Cell. Physiol.* 2020;235(4):3362-3371. <https://doi.org/10.1002/jcp.29224>
19. Dong W., Gao W., Yan X., Sun Y., Xu T. microRNA-132 as a negative regulator in NF-κB signaling pathway via targeting IL-1β in miuuy croaker. *Dev. Comp. Immunol.* 2021;122:104113. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104113>

Поступила 19.12.2022

Сведения об авторах:

Маслюков Петр Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии с биофизикой; тел.: 89109728861; e-mail: mpm@ysmu.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6230-5024>

Порсева Валентина Вячеславовна, доктор медицинских наук, доцент кафедры патофизиологии; тел.: 89038247659; e-mail: vvporseva@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2814-7656>

Анфимова Полина Александровна, аспирант кафедры нормальной физиологии с биофизикой; тел.: 89605275371; e-mail: poly.vishenka@yandex.ru

Панкрасхева Лидия Георгиевна, студентка; тел.: 89051357281; e-mail: white.corvus8@gmail.com

Баранов Андрей Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой поликлинической терапии, клинической лабораторной диагностики и медицинской биохимии; тел.: 89159652991; e-mail: bara_aa@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7847-1679>

Левшин Николай Юрьевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры; тел.: 89106626275; e-mail: levshin_nikolaiy@mail.ru

Моисеев Константин Юрьевич, преподаватель кафедры нормальной физиологии с биофизикой; тел.: 89656300338; e-mail: mky_yma@mail.ru