

**Cite this article:** Sokolik V.V., Levicheva N.O., Geiko V.V., Berchenko O.G., Shulga S.M. Modulating effect of liposomal miR-101 on the processes of amyloidogenesis, smell, sleep and neuroinflammation in experimental Alzheimer's disease. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University, Series "Biology"*, 2021, 36, 16–27.

УДК: 577.2:616

## Модулюючий вплив ліпосомальної miR-101 на процеси амілоїдогенезу, нюху, сну і нейрозапалення при експериментальній хворобі Альцгеймера В.В. Соколік, Н.О. Левічева, В.В. Гейко, О.Г. Берченко, С.М. Шульга

Існуюча терапія хвороби Альцгеймера не дає шансів пацієнтам на одужання. Тому актуальним є вивчення новітніх факторів впливу, зокрема мікроРНК, на патогенетичні механізми амілоїдозу. Метою роботи було визначення ефекту miR-101 на ранні предиктори амілоїдозу при експериментальній хворобі Альцгеймера у тварин. Дослідження було виконано на 25 щурах-самцях віком 14 міс. Модель хвороби Альцгеймера створювали шляхом інтрагіпокампального введення тваринам агрегатів A $\beta$ <sub>40</sub>. Через 10 діб починали 10-добовий курс назального введення щурам miR-101 в ліпосомах. У супернатантах нервових тканин цільових структур головного мозку (гіпокамп, нюхові цибулини, нюхові бугри) визначали рівень ендогенного A $\beta$ <sub>42</sub> і цитокінів (TNF $\alpha$ , IL-6 і IL-10). Для оцінки функціонального стану нюхової системи була задіяна нейроетологічна методика пред'явлення запахів ізовалеріанової кислоти і арахісової пасти. В ході поліграфічної реєстрації циклу неспання-сон визначали представленість неспання і окремих фаз сну, а також частку завершених і завершених циклів сну у тварин. Показано, що введення агрегатів A $\beta$ <sub>40</sub> в гіпокамп моделює у щурів амілоїдогенний стан у гіпокампі і нюхових буграх, але не в нюхових цибулинах. Також був встановлений прозапальний стан у гіпокампі головного мозку тварин (збільшення концентрації прозапальних цитокінів TNF $\alpha$  і IL-6), тоді як у нюхових цибулинах і нюхових буграх їх рівень не змінювався. При дослідженні функціонального стану нюхового аналізатору у щурів з хворобою Альцгеймера були виявлені негативні зміни нюхової поведінки на запахи ізовалеріанової кислоти і арахісового масла. Щодо сомнограм, токсичність A $\beta$ <sub>40</sub> обумовлювала скорочення стадії глибокого повільного сну у поєднанні з дефіцитом фази парадоксального сну, а також переважання незавершених циклів сну. Назальна терапія miR-101 в ліпосомах нормалізувала рівень A $\beta$ <sub>42</sub> у гіпокампі і нюхових буграх та знизила у гіпокампі рівень прозапальних цитокінів. MiR-101 запобігала порушенню нюхової функції оцінювання запахів ізовалеріанової кислоти і арахісового масла та сприяла збільшенню представленості фаз глибокого повільного сну і парадоксального сну у структурі циклу, а також відновленню частки завершених циклів сну у тварин. Таким чином, ліпосомальна miR-101 має антиамілоїдогенний і протизапальний ефект у щурів з моделлю хвороби Альцгеймера, а також сприяє відновленню у них функціонального стану нюхового аналізатору та оптимізації структурної організації циклу неспання-сон.

**Ключові слова:** miR-101,  $\beta$ -амілоїдний пептид, цитокіни, хвороба Альцгеймера, нюх, сон, ліпосоми.

### Про авторів:

В.В. Соколік – ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України», вул. Академіка Павлова, 46, Харків, Україна, 61068, V.sokolik67@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-6829-2300>

Н.О. Левічева – ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України», вул. Академіка Павлова, 46, Харків, Україна, 61068, nati-ki-le@ukr.net, <http://orcid.org/0000-0003-2963-0762>

В.В. Гейко – ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України», вул. Академіка Павлова, 46, Харків, Україна, 61068, vvgeiko@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-5891-1104>

О.Г. Берченко – ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України», вул. Академіка Павлова, 46, Харків, Україна, 61068, berchenko.olga@ukr.net, <http://orcid.org/0000-0003-4201-4542>

С.М. Шульга – ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», вул. Академіка Павлова, 46, Харків, Україна, 61068, Shulga5@i.ua, <http://orcid.org/0000-0003-1080-8583>

### Вступ

Процеси регулювання на основі молекул мікроРНК визначають новий підхід до контролю впливу транскриптому на розвиток окремих патологій. МікроРНК (miRNA) – це невеликі некодуючі РНК, які складають 40 % всього транскриптому та забезпечують механізм посттранскрипційного регулювання експресії третини всіх генів (He, Hannon, 2004; Hatfield, Ruohola-Baker, 2008). У ссавців понад 90 % miRNA кодуються нуклеотидними послідовностями, які містяться в інтронах генів (Hammond, 2015). Після вирізання інтрону (400 пар нуклеотидів) з первинного транскрипту він утворює первинну мікроРНК (pri-miRNA). На наступному етапі pri-miRNA у ході Drosha-процесингу перетворюється на «шпильку» – послідовність pre-miRNA довжиною в 70 нуклеотидів. За допомогою експортину-5 pre-miRNA потрапляє до цитоплазми, де під час Dicer-процесингу розщеплюється на менші фрагменти, які трансформуються в зрілі miRNA (Kutter, Svoboda, 2008).

Посттранскрипційне інгібування експресії генів починається зі зв'язування miRNA з протеїновим комплексом RISC (RNA-induced silencing complex). Провідний ланцюг дуплексу miRNA вбудовується в цей комплекс протеїнів, які сприяють зв'язку miRNA з 3'-кінцем мРНК-мішені. MiRNA призводять до руйнування таргетної мРНК або пригнічення її трансляції. Спосіб припинення трансляції залежить від ступеня комплементарності областей miRNA і мРНК, які взаємодіють. Виокремлюють miRNA з проліферативною, фібробластичною, проангіогенною і антиангіогенною активністю, з прозапальним і проапоптотичним потенціалом, та miRNA, які модулюють процеси старіння, диференціювання, міжклітинної кооперації (Huang et al., 2011). Та якщо роль внутрішньоклітинних мікроРНК більш-менш зрозуміла, то фізіологічне значення циркулюючих форм цих молекул наразі залишається маловивченим. Перехід miRNA у кровообіг відбувається завдяки двом механізмам: «горизонтальному транспорту» – вивільнення miRNA з клітин за допомогою РНК-ліпопротеїнового комплексу або в складі мікровезикул та «пасивного транспорту» – у складі екзотом (Manna et al., 2020). Основна біологічна роль циркулюючих miRNA полягає в міжклітинній кооперації.

Приблизно 70 % відомих miRNA експресуються в мозку, і все більше доказів демонструють можливу участь miRNA у хворобі Альцгеймера (ХА) (Wu et al., 2016; Iranifar et al., 2019; Brito et al., 2020). Характерними симптомами ХА є прогресуюча втрата пам'яті та когнітивних функцій через відкладення депозитів β-амілоїдного пептиду (Аβ) у вигляді сенільних бляшок, внутрішньоклітинну агрегацію гіперфосфорильованого τ-протеїну, втрату синапсів, нейрозапалення та нейродегенерацію (Silva et al., 2019). Показано, що деякі специфічні miRNA, наприклад, miR-9, miR-29, miR-101, miR-107, miR-124, miR-298 та miR-328, сприяють зменшенню виробництва Аβ у разі активованої експресії відповідних генів у пацієнтів або у тварин з ХА, регулюючи у такий спосіб експресію BACE1 та/або протеїну попередника β-амілоїдного пептиду (АβPP) (Hebert et al., 2009; Long, Lahiri, 2011). Дані клінічних досліджень продемонстрували, що рівень miR-29/101 у периферичній крові хворих на амілоїдоз помітно знижений (Patel et al., 2008; Ma et al., 2016). Загалом відбувається узагальнення і систематизація різноспрямованих впливів miRNA на патогенез ХА (Silvestro et al., 2019; Kou et al., 2020) та дослідження їх впливів на ранні предиктори цієї патології.

Окремим питанням постає доставка екзогенної miRNA до нейронів головного мозку як регуляторної терапії ХА. Наночосії на основі ліпідів є найбільш широко використовуваними методами невірусної доставки (Zhang et al., 2013). Катіонні ліпіди з гідрофільними головками та гідрофобними хвостами формують комплекс з аніонною нуклеїновою кислотою, в результаті чого утворюється ліпоплекс (Pedroso de Lima et al., 2001). Ці катіонні ліпоплекси мають високу спорідненість із клітинною мембраною, вони не імуногенні та прості у виробництві (Dasgupta, Chatterjee, 2021). Більшість методів терапії *in vivo* на основі miRNA залежать від системних ін'єкцій, які є дорогими, мають низьку ефективність та можуть призвести до несприятливих побічних ефектів. Тому у нашому дослідженні було задіяне інтраназальне введення ліпосомальної форми miRNA, зокрема miR-101, для попередження її руйнації нуклеазами та успішного подолання гематоенцефалічного бар'єру.

Мета дослідження полягала у визначенні ефекту ліпосомальної miR-101 на ранні предиктори хвороби Альцгеймера у експериментальних тварин, а саме амілоїдогенез, цитокинову ланку нейрозапалення, функціональний стан нюхової сенсорної системи та структурно-функціональну організацію сну.

### Матеріали і методи

**Дизайн дослідження.** Дослідження було виконано на 25 нелінійних білих щурах-самцях 14-місячного віку, масою від 450 до 520 г з віварію ДУ «Інститут неврології, психіатрії і наркології НАМН України». Тварини перебували при контрольованому 12-годинному циклі світло–темрява, стандартному кормі для гризунів і водопровідній воді. Щурів було розподілено до чотирьох груп: контрольна група – інтактні тварини ( $n = 6$ ); група Аβ<sub>40</sub> (модель ХА) – щури через 20 діб після введення суспензії агрегатів Аβ<sub>40</sub> в гіпокамп ( $n = 6$ ); група Аβ<sub>40</sub>+L(miR-101) – щури, яким через 10 діб після введення Аβ<sub>40</sub> в гіпокамп наступні 10 діб інтраназально вводили miR-101 у ліпосомах ( $n = 7$ ); група Аβ<sub>40</sub>+L(0) – щури, яким через 10 діб після введення Аβ<sub>40</sub> в гіпокамп вводили інтраназально пусті ліпосоми протягом 10 діб ( $n = 6$ ). Експериментальні протоколи для щурів були проведені відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів з тваринами» (Київ, 2011) та «Порядку проведення науковими установами дослідів та експериментів на тваринах» (№ 249 від 01.03.2012).

Модель хвороби Альцгеймера у тварин створювали шляхом інтрагіпокамपालного мікроін'єкційного введення 15 нмоль агрегатів Human beta Amyloid 1-40 protein (China Peptides Co., Ltd, China) у 10 мкл водної суспензії, як детально наведено у попередній публікації (Sokolik et al., 2017). Стереотаксичні операції у тварин проводили під загальним наркозом, використовуючи тіопентал натрію внутрішньочеревно у дозі 50 мг/кг маси тіла. Наразі в підґрунті експериментального моделювання хвороби Альцгеймера лежать три підходи: трансгенні тварини з додатковою експресією гену *AβPP* людини (Drummond, Wisniewski, 2017); доставка екзогенних токсичних олігомерів Аβ до цільових відділів головного мозку: шлуночки мозку, базальні ядра Мейнерта, гіпокамп, нюхові цибулини, передні відділи неокортексу (Степаничев и др., 2016; Колобов, Сторожева, 2014; Lobzin et al., 2017); а також руйнування ділянок неокортексу або гіпокампу фізичними (електрокоагуляція) або хімічними (вплив алюмінію, органічних сполук ртуті та ін.) способами. Відомо, що у пацієнтів з ХА саме нейрони гіпокампу більш за все потерпають від токсичності олігомерів Аβ, які згодом утворюють сенільні бляшки, характерні для амілоїдогенної патології (Mukhin, 2013). Тому інтрагіпокамपालне введення агрегатів Аβ у тварин є адекватною і верифікованою моделлю ХА.

Через 10 діб після створення моделі ХА починали назальне введення miR-101-3р (ООО «НПФ «Синтол», РФ) у ліпосомах тваринам з групи Аβ<sub>40</sub>+L(miR-101) та пустих ліпосом щурам з групи Аβ<sub>40</sub>+L(0). Нуклеотидна послідовність miR-101 була наступною: 5'UACAGUACUGUGUAACUGAA3'. Концентрація miR-101 у суспензії ліпосом становила  $12,5 \times 10^{18}$  молекул на літр. Ліпосоми створювали методом ліпідних плівок (Shulga, 2014) із лецитину соняшнику "BIOLER" (Дніпро, Україна). Діаметр ліпосом (100 нм) калібрували в екструдері "LiposoFast-Basic LF-1" (Avestin, Канада) з полікарбонатними мембранами, розмір отворів у яких складав 0,1 мкм. За 10 сеансів терапії кожна тварина з групи Аβ<sub>40</sub>+L(miR-101) отримала  $2,5 \times 10^{14}$  молекул miR-101, об'єм разової порції ліпосомальної суспензії складав 20 мкл. Дослідження впливу саме miR-101 було обрано тому, що вона є ключовим оператором функції матричної РНК (мРНК) для протеїну попередника β-амілоїдних пептидів (AβPP) внаслідок формування комплексу [miR-101·мРНК<sup>AβPP</sup>] з подальшою його деактивацією і тому здатна пригнічувати синтез АβPP та його амілоїдогенний процесинг.

Через 10 діб назальної терапії ліпосомальною miR-101 або пустими ліпосомами (20-а доба експерименту) тварин декапітували і в супернатантах нервових тканин окремих структур головного мозку (гіпокамп, нюхові цибулини, нюхові бугри) визначали рівень ендogenous токсичного β-амілоїдного пептида 42 (Aβ<sub>42</sub>) та цитокінів (TNFα, IL-6 і IL-10).

**Тестування нюхової сенсорної системи.** Для оцінки функціонального стану нюхової системи була задіяна нейроетологічна методика пред'явлення позитивних нюхових одорантів: запах ізовалеріанової кислоти та запах арахісової пасти (Мельник и др., 2012; Witt et al., 2009; Brai, Alberi, 2015). Молярні концентрації розчинів ізовалеріанової кислоти для визначення нюхової чутливості щурів перебували в інтервалі від  $10^{-2}$  моль/л до  $10^{-7}$  моль/л з кроком  $10^{-1}$  моль/л. Тестовані концентрації арахісової пасти в соняшниковій олії складали 50 % і 20 %. Проведенню дослідження передувало період адаптації тварин до експериментальної камери протягом 5 хв. Розчин ізовалеріанової кислоти або суспензію арахісового масла в об'ємі 0,1 мл наносили на клаптик фільтрувального паперу, який розташовували на відстані 45 см від місця знаходження тварини. Оцінку дистантної хеморецептивної чутливості до одорантів проводили протягом 5 хв. Визначали латентний період виявлення запаху, час дослідницької реакції запаху, кількість підходів до одоранту.

**Вивчення структурно-функціональної організації сну.** Електроенцефалографії сну щурів передувало імплантації довгострокових ніхромових електродів у скляній ізоляції з діаметром неізольованого кінчика 0,1 мм у структури головного мозку щурів (нюхові цибулини, мезенцефалічна ретикулярна формація середнього мозку, гіпокамп (поле CA1)) відповідно до їх координат (Буреш и др., 1962). Кіркові ніхромові електроди розташовували епідурально в лобно-скроневій зоні мозку, індіферентний електрод – у кістці носової пазухи. Сталеві міографічні електроди вводили в зону верхнього косоного м'яза шиї. Стереотаксичні операції здійснювали в стерильних умовах під тіопенталовим наркозом.

Поліграфічну реєстрацію сну проводили у період помірної емоційної активності щурів (з 10.00 до 15.00) за умов природного освітлення (Берченко, 1982, 1990). Електроенцефалограми (ЕЕГ) та міографи у біполярних відведеннях записували з використанням діагностичного комплексу «Нейрон-Спектр». За електроенцефалографічними, електроміографічними та поведінковими характеристиками ідентифікували неспанння та окремі фази сну: парадоксальний сон (ПС),

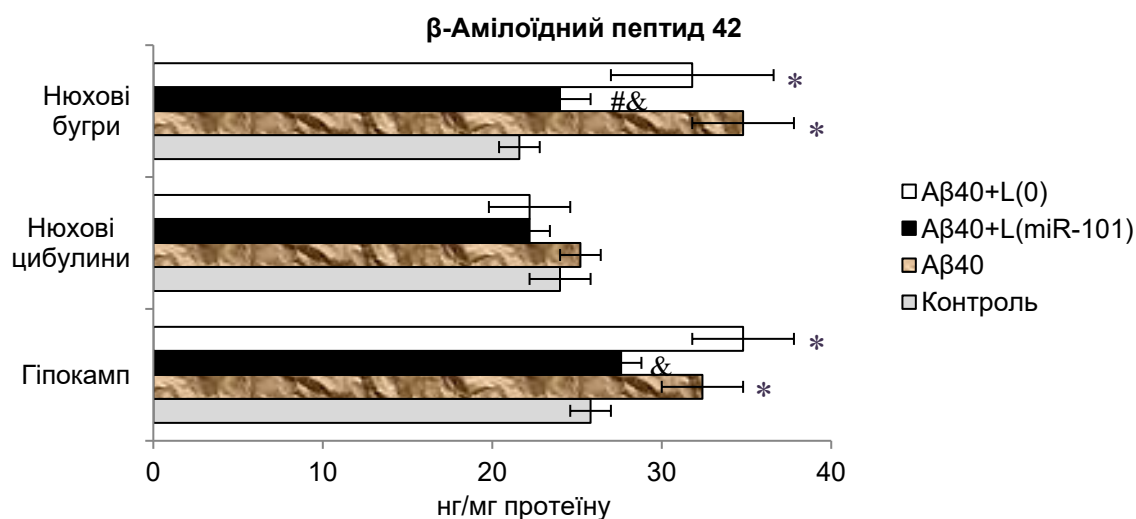
поверхневий повільний сон (ППС) і глибокий повільний сон (ГПС) та визначали їх відсотковий вміст (Кассиль, 1993). На основі циклограм сну встановлювали долю незавершених (редукованих, позбавлених фази парадоксального сну) та завершених циклів від загальної кількості циклів сну у відсотках.

**Імуноферментний аналіз біохімічних показників.** Рівень  $A\beta_{42}$  і цитокінів (TNF $\alpha$ , IL-6 і IL-10) вимірювали за допомогою наборів реагентів Rat Amyloid beta peptide 1-42 ELISA Kit (Bioassay Technology Laboratory, China) і Rat ELISA Kits (Invitrogen BCM Diagnostics, USA) для цитокінів та виражали у нанограмах на міліграм протеїну (нг/мг для  $A\beta_{42}$ ) і у пікограмах на міліграм протеїну (пг/мг для цитокінів). Абсорбцію зразків зчитували мікропланшетним аналізатором GBG Stat FAX 2100 (USA) при  $\lambda = 450$  нм з корекцією довжини хвилі при  $\lambda = 630$  нм. Вміст загального протеїну визначали методом Lowry (Lowry et al., 1951).

**Статистичний аналіз.** Проведено статистичний аналіз отриманих результатів, обчислено середні значення і стандартні відхилення. Статистичний аналіз відмінностей проводили з використанням *t*-тесту Стьюдента за умов з'ясування нормальності розподілу даних у вибірці. За умов множинного порівняння середніх значень груп *P* було скориговане за допомогою поправки Бонферроні. При обмеженні лише п'ятьма порівняннями: між групами Контроль і  $A\beta_{40}$ , Контроль і  $A\beta_{40}+L(miR-101)$ , Контроль і  $A\beta_{40}+L(0)$ ,  $A\beta_{40}$  і  $A\beta_{40}+L(miR-101)$  та  $A\beta_{40}+L(miR-101)$  і  $A\beta_{40}+L(0)$  статистичний рівень значущості становив  $P \leq 0,01$ .

### Результати і обговорення

**Антиамілоїдогенна дія ліпосомальної miR-101.** Показано, що введення агрегатів  $A\beta_{40}$  в гіпокамп моделює у щурів амілоїдогенний стан через 20 діб у гіпокампі і нюхових буграх (вірогідне збільшення концентрації  $A\beta_{42}$  на 26 % у гіпокампі та на 61 % у нюхових буграх), тоді як у нюхових цибулинах рівень  $A\beta_{42}$  вірогідно не змінювався (рис. 1).



\*  $P \leq 0,01$  порівняно до Контролю;

#  $P \leq 0,01$  при зіставленні груп  $A\beta_{40}$  і  $A\beta_{40}+L(miR-101)$ ;

&  $P \leq 0,01$  при зіставленні груп  $A\beta_{40}+L(miR-101)$  і  $A\beta_{40}+L(0)$

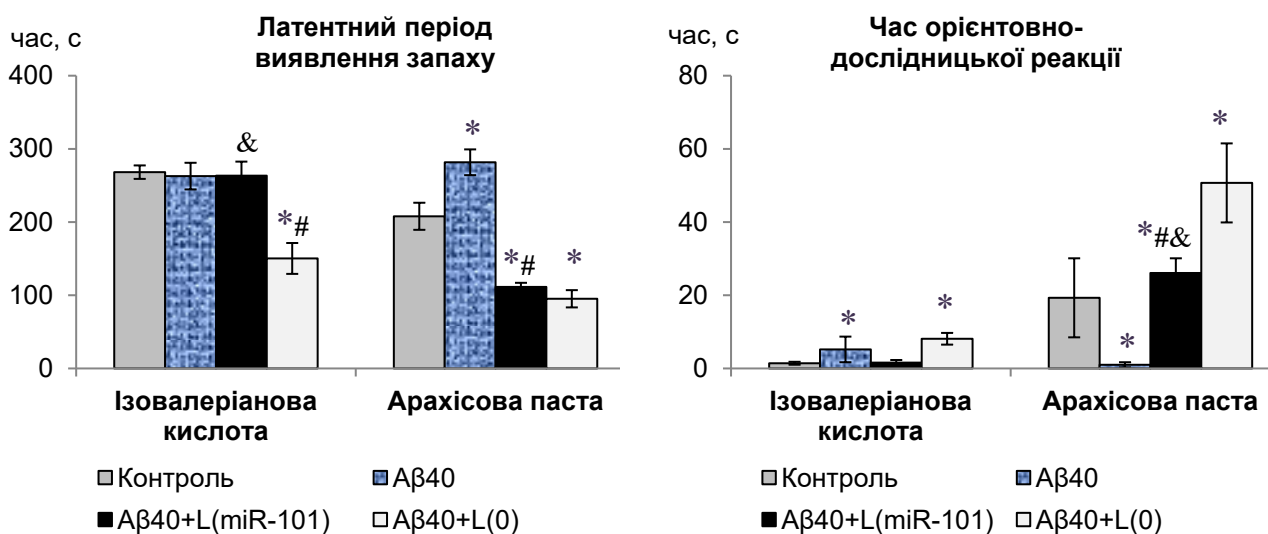
**Рис. 1. Антиамілоїдогенний вплив назальної терапії miR-101 в ліпосомальній формі у щурів з експериментальною моделлю хвороби Альцгеймера.** Контроль – інтактні тварини ( $n = 6$ );  $A\beta_{40}$  – модель хвороби Альцгеймера ( $n = 6$ );  $A\beta_{40}+L(miR-101)$  – щури з моделлю хвороби Альцгеймера та подальшою терапією miR-101 у ліпосомах ( $n = 7$ ); група  $A\beta_{40}+L(0)$  – щури з моделлю хвороби Альцгеймера та подальшою терапією пустими ліпосомами ( $n = 6$ )

**Fig. 1. Anti-amyloidogenic effect of nasal therapy with miR-101 in liposomal form in rats with an experimental model of Alzheimer's disease.** Control – intact animals ( $n = 6$ );  $A\beta_{40}$  – model of Alzheimer's disease ( $n = 6$ );  $A\beta_{40} + L (miR-101)$  – rats with a model of Alzheimer's disease and subsequent miR-101 therapy in liposomes ( $n = 7$ ); group  $A\beta_{40} + L(0)$  – rats with a model of Alzheimer's disease and subsequent therapy with empty liposomes ( $n = 6$ )

Десятиденний курс назальної терапії miR-101 в ліпосомальній формі, який починали через 10 діб після створення експериментальної моделі ХА, специфічно, тобто вірогідно порівняно з пустими ліпосомами, нормалізував рівень A $\beta$ <sub>42</sub> у цих структурах. У нюхових цибулинах вміст A $\beta$ <sub>42</sub> не змінювався (рис. 1). Враховуючи те, що A $\beta$ PP і A $\beta$  є основними учасниками патогенезу хвороби Альцгеймера, зниження надлишкової експресії A $\beta$ PP повинно пом'якшити патологічні процеси, що лежать в основі амілоїдозу. Отже, miR-101 може стати новою мішенню для терапевтичної модуляції рівнів A $\beta$ PP. Можна припустити, що або пряма доставка екзогенної miR-101 у ЦНС, або регуляція її ендогенної експресії повинні зменшити рівні A $\beta$ PP у мозку хворих. В роботі (Long, Lahiri, 2011) було показано, що miR-101 експресується з двох незалежних геномних локусів, які містяться в міжгенних областях на хромосомі 1 і хромосомі 9. Промоторні елементи, які регулюють транскрипцію miR-101, детально не досліджено. Тому назальна терапія екзогенною miR-101 в ліпосомальній формі може бути перспективною у терапії ХА пацієнтів.

Отже, виявлена антиамілоїдогенна дія miR-101 може мати вторинні впливи на процеси навчання, нюху і нейрозапалення (ранні предиктори розвитку амілоїдозу) у щурів з експериментальною моделлю хвороби Альцгеймера.

**Нормалізуючий вплив ліпосомальної miR-101 на чутливість щурів з моделлю хвороби Альцгеймера до позитивних одорантів.** Нюх відіграє ключову роль у запуску і формуванні різних форм поведінки тварин: статевої, харчової, агресивної, дослідницької. В процесі хемокомунікації важливе значення мають запахи, які сигналізують про гормональний статус тварини, її ієрархічне положення та інше, що є важливим для видів, які утворюють складні соціальні спільноти. До таких одорантів належить запах ізовалеріанової кислоти (Мельник, 2007). Запах арахісового масла для тварин також є емоційно-позитивним одорантом, бо виступає стимулом харчової поведінки. Нюхова чутливість і сприйняття запахів протягом життя ссавців змінюються. Прикладом слугує вікове зниження нюхової чутливості, що супроводжується дегенеративними змінами в нюховому епітелії.



\*  $P \leq 0,01$  порівняно до Контролю;

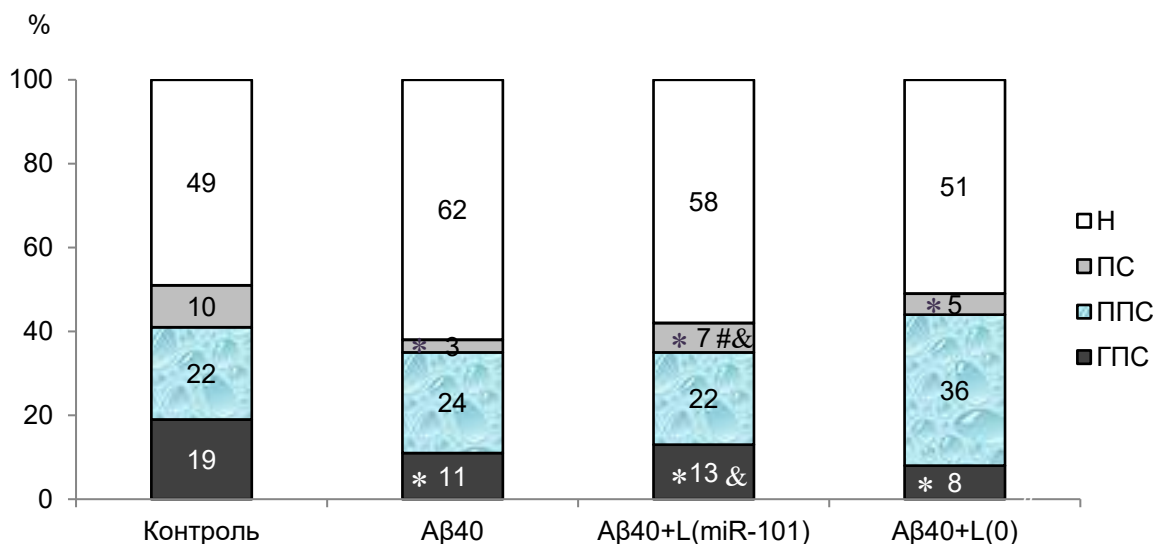
#  $P \leq 0,01$  при зіставленні груп A $\beta$ <sub>40</sub> і A $\beta$ <sub>40</sub>+L(miR-101);

&  $P \leq 0,01$  при зіставленні груп A $\beta$ <sub>40</sub>+L(miR-101) і A $\beta$ <sub>40</sub>+L(0)

**Рис. 2.** Нормалізуючий вплив ліпосомальної miR-101 на кількісно-часові характеристики сприйняття запахів (латентний період виявлення запаху і час орієнтовно-дослідницької реакції) ізовалеріанової кислоти і арахісового масла у щурів з моделлю хвороби Альцгеймера. Характеристика груп див. рис. 1

**Fig. 2.** Normalizing effect of liposomal miR-101 on the quantitative and temporal characteristics of odor perception (latency period of odor detection and time of approximate research reaction) of isovaleric acid and peanut oil in rats with a model of Alzheimer's disease. Characteristics of groups see Fig. 1

При дослідженні функціонального стану нюхового аналізатору у щурів з експериментальною хворобою Альцгеймера було виявлено зміни нюхової поведінки на пред'явлення запаху ізовалеріанової кислоти, а саме збільшувався час орієнтовно-дослідницької реакції (ОДР) у 3,7 разів. Для арахісового масла встановили вірогідне збільшення латентного періоду виявлення запаху в 1,4 рази та зменшення часу ОДР в 19 разів у тварин з групи Аβ<sub>40</sub> (рис. 2).



\*  $P \leq 0,01$  порівняно до Контролю;

#  $P \leq 0,01$  при зіставленні груп Аβ<sub>40</sub> і Аβ<sub>40</sub>+L(miR-101);

&  $P \leq 0,01$  при зіставленні груп Аβ<sub>40</sub>+L(miR-101) і Аβ<sub>40</sub>+L(0)

**Рис. 3. Вплив ліпосомальної miR-101 на структурну організацію циклу неспання-сон у щурів за умов моделювання хвороби Альцгеймера.** Н – неспання, ПС – парадоксальний сон, ППС – поверхневий повільний сон, ГПС – глибокий повільний сон. Характеристика груп див. рис. 1

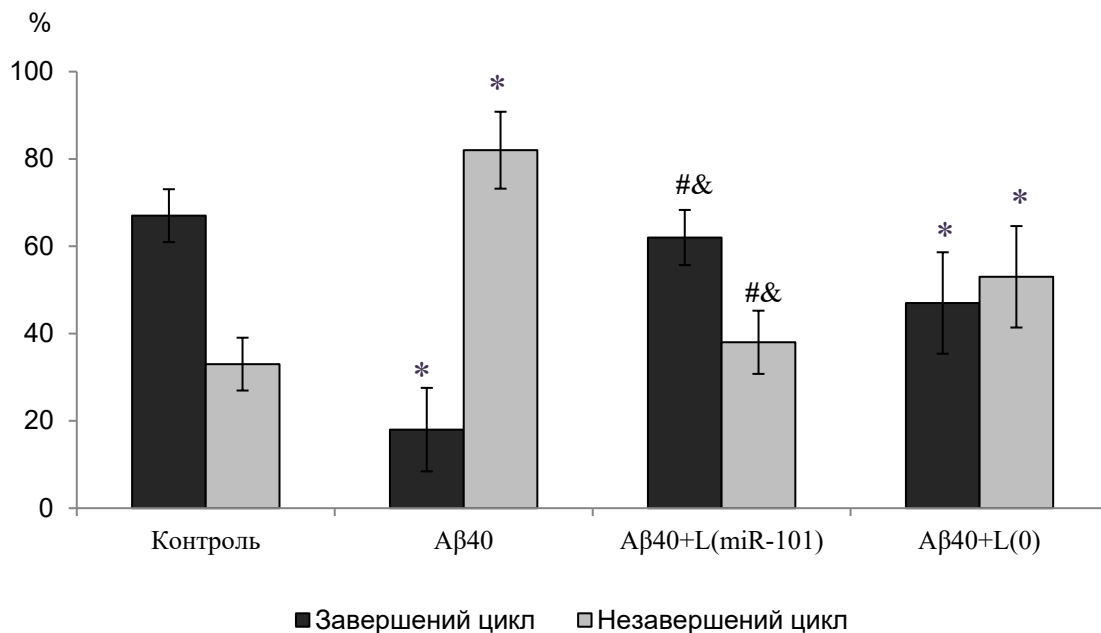
**Fig. 3. The effect of liposomal miR-101 on the structural organization of the wake-sleep cycle in rats under the conditions of modeling Alzheimer's disease.** H – wakefulness, PS – paradoxical sleep, SSWS – superficial slow-wave sleep, DSWS – deep slow-wave sleep. Characteristics of groups see Fig. 1

Порівняльний аналіз кількісно-часових показників дослідження нюхового аналізатора після курсового введення ліпосомальної miR-101 або пустих ліпосом показав, що введення miR-101 запобігає порушенню нюхової функції оцінювання запахів ізовалеріанової кислоти та арахісового масла, що проявлялося у скороченні часу ОДР для ізовалеріанової кислоти та вірогідного зменшення латентного періоду виявлення запаху у 2,6 разів і збільшення у 32,6 разів часу ОДР для арахісового масла за зіставлення з групою Аβ<sub>40</sub>. Отримані дані свідчили про те, що miR-101 сприяла відновленню оцінки запахів ізовалеріанової кислоти і арахісового масла та орієнтовно-дослідницьких реакцій у щурів з експериментальною ХА (рис. 2). 10-добовий курс пустих ліпосом щурам з інтрагіпокампульним введенням Аβ<sub>40</sub> обумовив зниження латентного періоду та збільшення часу ОДР у випадку обох одорантів. Поведінкова реакція на новизну подразника у тварин групи Аβ<sub>40</sub>+L(0) мала незгасимий характер за відсутності габітуації. Ці дані ми пояснюємо розгальмовуванням багатокомпонентної орієнтовно-дослідницької реакції в умовах амілоїдогенезу, яке не спроможні компенсувати пусті ліпосоми, на відміну від нормалізуючої дії ліпосомальної miR-101 на функціональну активність нейронів гіпокампу.

Одним з ранніх проявів ХА є послаблення ідентифікації запахів, що проявляється мало не за 10 років до появи симптомів втрати пам'яті (Kovacs, 2013). Порушення нюхової функції за умов ХА виникає внаслідок змін центральних, а не периферійних механізмів оцінки запаху (Larson et al., 1999; Manckoundia et al., 2016). На даний час з'ясовано, що порушення ідентифікації якості запаху зумовлено зниженням кількості нейронів – мітральних клітин у нюховій цибулині та

функціональними змінами у периформній корі, що є важливою діагностичною ознакою для виявлення ранніх стадій даного захворювання (Hoogland et al., 2003). Існує взаємозв'язок між об'ємом лівого гіпокампу та здатністю до нюхової ідентифікації. Тому вищенаведені результати доводять позитивний вплив miR-101 на центральні механізми обробки нюхової інформації у щурів з моделлю хвороби Альцгеймера.

**Оптимізація циклу неспання-сон за умов курсової дії ліпосомальної miR-101 при експериментальній хворобі Альцгеймера.** Експериментальна ХА у тварин характеризувалася скороченням стадії глибокого повільного сну (ГПС) на 44 % у поєднанні з 74 % дефіцитом фази парадоксального сну (ПС), що призводило до зниження не лише якості, але і тривалості сну у циклі неспання-сон порівняно з інтактними тваринами контрольної групи (рис. 3).



\*  $P \leq 0,01$  порівняно до Контролю;

#  $P \leq 0,01$  при зіставленні груп Aβ40 і Aβ40+L(miR-101);

&  $P \leq 0,01$  при зіставленні груп Aβ40+L(miR-101) і Aβ40+L(0)

**Рис. 4. Ритмічна організація сну у щурів з експериментальною хворобою Альцгеймера і курсовим введенням ліпосомальної miR-101.** Характеристика груп див. рис. 1

**Fig. 4. Rhythmic organization of sleep in rats with experimental Alzheimer's disease and course administration of liposomal miR-101.** Characteristics of groups see Fig. 1

Інтраназальне введення ліпосомальної miR-101 спричинило збільшення представленості цих ключових стадій у структурі циклу: передусім фази парадоксального сну (на 133 %), порівняно з показниками групи Aβ40, але не призвело до остаточної нормалізації за порівняння з групою Контролю. У щурів з групи Aβ40+L(0) спостерігалися різноспрямовані зміни частки ГПС і ПС в циклі неспання-сон: подальше зменшення частки глибокого повільного сну та деяке зростання частки парадоксального сну, які склали лише 58 % і 50 %, відповідно, від контрольних значень, та відрізнялись від відповідних показників групи Aβ40+L(miR-101) (рис. 3). Беручи до уваги сучасні уявлення стосовно елімінаторної функції глибокого повільного сну (Nag et al., 2001), отримані результати засвідчують терапевтичну ефективність miR-101.

Враховуючи літературні відомості щодо суттєвої ролі фази парадоксального сну у забезпеченні ризику розвитку деменцій (Madaeva, Verdina, 2017; Pase et al., 2017), а також його системоутворюючої функції в організації циклу неспання-сон, доцільним було дослідження ритмічної організації сну у вигляді наявності завершених і незавершених циклів. Показано, що агрегати β-амілоїдного пептиду 40 у щурів обумовлювали збільшення незавершених (редукованих) циклів (рис. 4). MiR-101 в ліпосомах спричинила скорочення кількості редукованих циклів сну у щурів з

моделлю хвороби Альцгеймера майже до нормалізації показників цієї базальної характеристики сну, що відповідало показникам інтактних тварин. Пусті ліпосоми у дослідних тварин не мали такого ефекту.

Отже, результати порівняльного аналізу структурно-функціональної і ритмічної організації циклу неспання-сон за умови моделювання ХА та дії ліпосомальної miR-101 уможливають висновок щодо оптимізуючого специфічного характеру впливу цієї мікроРНК.

**Протизапальний вплив ліпосомальної miR-101 при амілоїдозі.** На моделі хвороби Альцгеймера було встановлено, що агрегати A $\beta$ <sub>40</sub> обумовлюють прозапальне становище у гіпокампі головного мозку тварин (вірогідне збільшення концентрації прозапальних цитокінів TNF $\alpha$  і IL-6), тоді як у нюхових цибулинах і нюхових буграх рівень цих цитокінів не зазнав істотних змін (табл. 1).

Назальне введення miR-101 в ліпосомальній формі протягом 10 діб знизило у гіпокампі рівень IL-6 та TNF $\alpha$ , що виявилось вірогідним порівняно з моделлю хвороби Альцгеймера та показниками терапії пустими ліпосомами (табл. 1). У нюхових цибулинах з'ясувалось несподівано вірогідне, але неспецифічне, зменшення концентрації TNF $\alpha$  у щурів з моделлю ХА після назальної терапії як пустими ліпосомами, так і ліпосомами з miR-101. У нюхових буграх виявлено зменшення вмісту IL-10 під впливом miR-101, яке відрізняло цих тварин від інших груп (табл. 1).

**Таблиця 1. Протизапальний вплив назальної терапії miR-101 в ліпосомальній формі (модель хвороби Альцгеймера у щурів)**

**Table 1. Anti-inflammatory effects of nasal therapy miR-101 in liposomal form (model of Alzheimer's disease in rats)**

		пг/мг протеїну			
Цитокін	Група	Контроль (n = 6)	A $\beta$ <sub>40</sub> (n = 6)	A $\beta$ <sub>40</sub> +L(miR-101) (n = 7)	A $\beta$ <sub>40</sub> +L(0) (n = 6)
Гіпокамп					
TNF $\alpha$		64,78 $\pm$ 2,01	68,64 $\pm$ 1,82*	61,32 $\pm$ 2,00 #&	65,95 $\pm$ 2,27
IL-6		53,40 $\pm$ 5,10	60,6 $\pm$ 1,65*	48,75 $\pm$ 4,20#&	61,35 $\pm$ 2,70*
IL-10		183,30 $\pm$ 7,23	188,25 $\pm$ 11,97	166,50 $\pm$ 9,88	176,20 $\pm$ 9,10
Нюхові цибулини					
TNF $\alpha$		65,76 $\pm$ 4,42	63,77 $\pm$ 3,94	57,32 $\pm$ 3,69#	55,59 $\pm$ 3,41*
IL-6		60,00 $\pm$ 5,40	62,85 $\pm$ 8,70	51,60 $\pm$ 6,15	52,65 $\pm$ 4,50
IL-10		156,55 $\pm$ 5,42	160,94 $\pm$ 11,45	143,90 $\pm$ 6,38	141,80 $\pm$ 8,30
Нюхові бугри					
TNF $\alpha$		61,14 $\pm$ 1,45	66,51 $\pm$ 3,99	62,37 $\pm$ 2,80	61,66 $\pm$ 2,66
IL-6		53,25 $\pm$ 4,05	58,05 $\pm$ 5,55	50,85 $\pm$ 4,05	52,95 $\pm$ 3,45
IL-10		170,75 $\pm$ 6,13	178,90 $\pm$ 9,60	157,05 $\pm$ 6,68 **&	173,10 $\pm$ 6,02

\*  $P \leq 0,01$  порівняно до Контролю;

#  $P \leq 0,01$  при зіставленні груп A $\beta$ <sub>40</sub> і A $\beta$ <sub>40</sub>+L(miR-101);

&  $P \leq 0,01$  при зіставленні груп A $\beta$ <sub>40</sub>+L(miR-101) і A $\beta$ <sub>40</sub>+L(0)

Порівнюючи отримані дані з результатами дослідження антизапального впливу куркуміну в ліпосомальній формі за аналогічної експериментальної постановки (Sokolik et al., 2015), необхідно зауважити, що поліфенол мав більший антицитокіновий потенціал, порівняно з miR-101. Антицитокіновий потенціал куркуміну можна пояснити його безпосередньою пригнічуючою дією на рівні індукції генів досліджених цитокінів та лише опосередкованим ефектом на рівень A $\beta$  у ЦНС тварин. Безпосередньою мішенню для miR-101 слугує саме мРНК<sup>A $\beta$ PP</sup>, з якої транслюється A $\beta$ PP.

Нормалізація концентрації окремих цитокінів під дією miR-101 у щурів з моделлю хвороби Альцгеймера, на нашу думку, має вторинний характер, оскільки пов'язане зі зменшенням рівня ендогенного токсичного A $\beta$ <sub>42</sub> у гіпокампі та нюхових буграх (рис. 1). Проте ряд авторів припускають можливість як прямого антизапального впливу miR-101 шляхом зниження індукованих рівнів прозапальних цитокінів (Wang et al., 2016), так і збільшення продукції IL-6 у відповідь на трансфекцію клітин miR-101 (Saika et al., 2017) або у разі її надмірної експресії у LPS-активованих макрофагах (Gao et al., 2014).



**Висновок**

Назальна терапія miR-101 у ліпосомальній формі обумовила вірогідний антиамілоїдогенний та протизапальний ефект у щурів з моделлю хвороби Альцгеймера, а також специфічно сприяла відновленню у них функціонального стану нюхового аналізатору та оптимізації циклу неспанння-сон.

**Список літератури / References**

- Буреш Я., Петрань М., Захар И. (1962). Электрофизиологические методы исследования. Москва: Изд-во иностранной литературы. 466 с. [Buresh J., Petran M., Zakhar I. (1962). *Electrophysiological research methods*. Moscow: Foreign Literature Publishing House. 466 p.]
- Берченко О.Г. (1982). Экспериментальное исследование суточной периодики эмоциональных реакций и ее изменения в условиях нарушения процессов бодрствование-сон. Дисс. .... канд. биол. наук. Харьков. 203 с. [Berchenko O.G. (1982). *Experimental study of the daily periodicity of emotional reactions and its changes in conditions of disturbed wakefulness-sleep processes*. Thesis for the Degree of the Candidate of Biol. Sciences. Kharkov. 203 p.]
- Берченко О.Г. (1990). Нейрофизиологическая организация цикла бодрствование-сон при алкоголизме крыс, сформированном в различные фазы эмоциональной активности. *Физиологический журнал СССР*, 76(6), 713–719. [Berchenko O.G. (1990). Neurophysiological organization of the wakefulness-sleep cycle in alcoholism of rats formed in different phases of emotional activity. *Physiological Journal of the USSR*, 76(6), 713–719.]
- Кассиль В.Г. (1993). Онтогенез становления различных форм высшей нервной деятельности. *Физиол. ж. им. И.М. Сеченова*, 79(3), 1–26. [Kassil V.G. (1993). Ontogenesis of the formation of various forms of higher nervous activity. *Russian Journal of Physiology*, 79(3), 1–26.]
- Колобов В.В., Сторожева З.И. (2014). Современные фармакологические модели болезни Альцгеймера. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*, 8(3), 38–44. [Kolobov V.V., Storozheva Z.I. (2014). Modern pharmacological models of Alzheimer's disease. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*, 8(3), 38–44.]
- Мельник С.А. (2007). Эндокринная модификация обонятельной чувствительности самцов мышей. Автореф. дисс. ...канд. биол. наук. Нижний Новгород: ННГУ. 23 с. [Melnik S.A. (2007). *Endocrine modification of the olfactory sensitivity of male mice*. Abstract of the thesis for the Degree of the Candidate of Biol. Sciences. Nizhny Novgorod: UNN. 23 p.]
- Мельник С.А., Гладышева О.С., Крылов В.Н. (2012). Влияние предварительного воздействия паров изовалериановой кислоты на обонятельную чувствительность самцов домово́й мыши. *Сенсорные системы*, 26(1), 52–56. [Melnik S.A., Gladysheva O.S., Krylov V.N. (2012). Effect of preliminary exposure to isovaleric acid vapors on the olfactory sensitivity of male house mice. *Sensory systems*, 26(1), 52–56.]
- Степаничев М.Ю., Иванов А.Д., Лазарева Н.А. (2016). Нейродегенеративные изменения, вызванные введением фрагмента (25-35) β-амилоидного пептида в гиппокамп, связаны с активацией NGF-сигналинга. *Вестник РГМУ*, 1, 13–18. [Stepanichev M.Yu., Ivanov A.D., Lazareva N.A. (2016). Neurodegenerative changes caused by the introduction of a fragment (25-35) of β-amyloid peptide into the hippocampus are associated with the activation of NGF signaling. *Bulletin of the Russian State Medical University*, 1, 13–18. <https://doi.org/10.24075/brsmu.2016-01-02>.]
- Brai E., Alberi L. (2015). Simple and computer-assisted olfactory testing for mice. *J. Vis. Exp.*, 100, e52944. <https://doi.org/10.3791/52944>
- Brito L.M., Ribeiro-Dos-Santos A., Vidal A.F. et al. (2020). Differential expression and miRNA-gene interactions in early and late mild cognitive impairment. *Biology (Basel)*, 9(9), 251. <https://doi.org/10.3390/biology9090251>
- Dasgupta I., Chatterjee A. (2021). Recent advances in miRNA delivery systems. *Methods Protoc.*, 4(1), 10. <https://doi.org/10.3390/mps4010010>
- Drummond E., Wisniewski T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.*, 133(2), 155-175. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>
- Gao Y., Liu F., Fang L. et al. (2014). Genkwanin inhibits proinflammatory mediators mainly through the regulation of miR-101/MKP-1/MAPK pathway in LPS-activated macrophages. *PLoS One*, 9(5), e96741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096741>
- Hammond S.M. (2015). An overview of microRNAs. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 87, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001>

- Hatfield S., Ruohola-Baker H. (2008). MicroRNA and stem cell function. *Cell Tissue Res.*, 331(1), 57–66. <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0530-3>
- He L., Hannon G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.*, 5, 522–531. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>
- Hebert S.S., Horre K., Nicolai L. et al. (2009). MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression. *Neurobiol Dis.*, 33(3), 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.009>
- Hoogland P., Van Den Berg R., Huisman E. (2003). Misrouted olfactory fibres and ectopic olfactory glomeruli in normal humans and in Parkinson and Alzheimer patients. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 29(3), 303–311. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2003.00459.x>
- Huang Y., Shen X.J., Zou Q. et al. (2011). Biological functions of microRNAs: a review. *J. Physiol. Biochem.*, 67(1), 129–139. <https://doi.org/10.1007/s13105-010-0050-6>
- Iranifar E., Seresht B.M., Momeni F. et al. (2019). Exosomes and microRNAs: new potential therapeutic candidates in Alzheimer disease therapy. *J. Cell Physiol.*, 234(3), 2296–2305. <https://doi.org/10.1002/jcp.27214>
- Kou X., Chen D., Chen N. (2020). The regulation of microRNAs in Alzheimer's disease. *Front Neurol.*, 11, 288. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00288>
- Kovacs T. (2013). The olfactory system in Alzheimer's disease: pathology, pathophysiology and pathway for therapy. *Translational Neuroscience*, 4(1), 34–45. <https://doi.org/10.2478/s13380-013-0108-3>
- Kutter C., Svoboda P. (2008). Meeting report: miRNA, siRNA, piRNA. Knowns of the unknown. *RNA Biology*, 5(4), 181–188. <https://doi.org/10.4161/rna.7227>
- Larson M., Semb H., Winblad B. et al. (1999). Odor identification in normal aging and early Alzheimer's disease: effects of retrieval support. *Neuropsychology*, 13(1), 47–53. <https://doi.org/10.1037//0894-4105.13.1.47>
- Lobzin S.V., Sokolova M.G., Nalkin S.A. (2017). Influence of brain basal cholinergic system dysfunction on the condition of cognitive functions (literature rev.). *North-Western State Med. University*, 9(4), 53–58. <https://doi.org/10.17816/mechnikov20179453-58>
- Long J.M., Lahiri D.K. (2011). MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid-beta precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 404(4), 889–895. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.053>
- Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1), 265–275.
- Ma T., Sun X., Sun S. et al. (2016). The study of peripheral blood miR-29a/101 in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Chin. J. Behav. Med. Brain Sci.*, 11, 1010–1014. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2016.11.011>
- Madaeva I.M., Berdina O.N. (2017). Modern ideas of «slow sleep» and «ram sleep» and their role in pathogenesis of Alzheimer's disease (review of literature). *Acta Biomed. Sci.*, 2(4), 48–52. [https://doi.org/10.12737/article\\_59fad513a63772.41901536](https://doi.org/10.12737/article_59fad513a63772.41901536)
- Manckoundia P., Putot A., Mahmoudi R. et al. (2016). Alterations in olfaction during Alzheimer disease, Parkinson disease and Lewy body disease. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*, 6(5), 274. <https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000274>
- Manna I., De Benedittis S., Quattrone A. et al. (2020). Exosomal miRNAs as potential diagnostic biomarkers in Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13(9), 243. <https://doi.org/10.3390/ph13090243>
- Mukhin V. (2013). Pathogenesis of the basalforebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Sechenov Russian Physiological Journal*, 99(7), 793–804.
- Nag S., Tang F., Yee B.K. (2001). Chronic intracerebroventricular exposure to  $\beta$ -amyloid (1-40) impairs object recognition but does not affect spontaneous locomotor activity or sensorimotor gating in the rat. *Exp. Brain Res.*, 136(1), 93–100. <https://doi.org/10.1007/s002210000561>
- Pase P., Himali J.J., Grima N.A. et al. (2017). Sleep architecture and the risk of incident dementia in the community. *Neurology*, 89(12), 1244–1250. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004373>
- Patel N., Hoang D., Miller N. et al. (2008). MicroRNAs can regulate human APP levels. *Mol. Neurodegener.*, 3, 10. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-3-10>
- Pedroso de Lima M.C., Simões S., Pires P. et al. (2001). Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: From biophysics to biological applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47(2–3), 277–294. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00110-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00110-7)

- Saika R., Sakuma H., Noto D. et al. (2017). MicroRNA-101a regulates microglial morphology and inflammation. *J. Neuroinflammation*, 14, 109. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0884-8>
- Silva M.V.F., Loures C.M.G., Alves L.C.V. et al. (2019). Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J. Biomed. Sci.*, 26(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0524-y>
- Shulga S.M. (2014). Obtaining and characteristic of curcumin liposomal form. *Biotechnol. Acta*, 7(5), 55–61. <https://doi.org/10.15407/biotech7.05.055>
- Silvestro S., Bramanti P., Mazzone E. (2019). Role of miRNAs in Alzheimer's disease and possible fields of application. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(16), 3979. <https://doi.org/10.3390/ijms20163979>
- Sokolik V.V., Berchenko O.G., Shulga S.M. (2017). Comparative analysis of nasal therapy with soluble and liposomal forms of curcumin on rats with Alzheimer's disease model. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*, 7, 357. <https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000357>
- Sokolik V.V., Shulga S.M. (2015). Effect of curcumin liposomal form on angiotensin converting activity, cytokines and cognitive characteristics of the rats with Alzheimer's disease model. *Biotechnol. Acta*, 8(6), 48–55. <https://doi.org/10.15407/biotech8.06.048>
- Wang C.C., Yuan J.R., Wang C.F. et al. (2016). Anti-inflammatory effects of *Phyllanthus emblica* L. on benzopyrene-induced precancerous lung lesion by regulating the IL-1 $\beta$ /miR-101/Lin28B signaling pathway. *Integr. Cancer Ther.*, 16(4), 505–515. <https://doi.org/10.1177/1534735416659358>
- Witt M., Galligan R.M., Despinoy J., Segal R. (2009). Olfactory behavioral testing in the adult mouse. *J. Vis. Exp.*, 23, e949. <https://doi.org/10.3791/949>
- Wu H.Z., Ong K.L., Seeher K. et al. (2016). Circulating microRNAs as biomarkers of Alzheimer's disease: A systematic review. *J. Alzheimers Dis.*, 49(3), 755–766. <https://doi.org/10.3233/JAD-150619>
- Zhang Y., Wang Z., Gemeinhart R.A. (2013). Progress in microRNA delivery. *J. Control. Release*, 172(3), 962–974. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.015>

**Modulating effect of liposomal miR-101 on the processes of amyloidogenesis, smell, sleep and neuroinflammation in experimental Alzheimer's disease**  
 V.V. Sokolik, N.O. Levicheva, V.V. Geiko, O.G. Berchenko, S.M. Shulga

The current therapy for Alzheimer's disease does not give patients a chance of recovery. Therefore, it is relevant to study the novel factors of influence, in particular microRNA, on the pathogenic mechanisms of amyloidosis. The aim of this work was to determine the effect of miR-101 on early predictors of amyloidosis in experimental Alzheimer's disease in animals. The study was carried out on 25 male rats of 14 months of age. A model of Alzheimer's disease was created by intrahippocampal administration of A $\beta$ <sub>40</sub> aggregates to animals. Ten days later, a 10-day course of nasal administration of miR-101 in liposomes was launched. The level of endogenous A $\beta$ <sub>42</sub> and cytokines (TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-10) was determined in the supernatants of the nerve tissues of the target brain structures (hippocampus, olfactory bulbs, and olfactory tubercles). A neuroethological method of presenting smells of isovaleric acid and peanut butter was used to assess the olfactory system functional state in the experimental rats. In the course of polygraphic registration of the sleep-wakefulness cycle, the representation of wakefulness and individual sleep phases, as well as proportion of incomplete and complete sleep cycles were determined. It was shown that injection of A $\beta$ <sub>40</sub> aggregates into the hippocampus simulates an amyloidogenic state in the rat's hippocampus and olfactory tubercles, but not in the olfactory bulbs. Moreover, a pro-inflammatory state was registered in the hippocampus of the animal brain (an increase in the concentration of pro-inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL-6), while the cytokine level in the olfactory bulbs and tubercles did not change. When studying the functional state of olfactory analyzers in the rats with Alzheimer's disease, we revealed negative changes in behavioral response to the smell of isovaleric acid and peanut butter. In terms of somnograms, the A $\beta$ <sub>40</sub> toxicity caused reduction in the deep slow-wave sleep stage combined with deficiency of the paradoxical sleep phase, and predominance of incomplete sleep cycles. Nasal therapy with miR-101 in liposomes normalized the level of A $\beta$ <sub>42</sub> in the hippocampus and olfactory tubercles and decreased the level of proinflammatory cytokines in the hippocampus. MiR-101 prevented olfactory dysfunctions in assessing smells of isovaleric acid and peanut butter, increased the ratio of deep slow-wave sleep and paradoxical sleep in the cycle structure and restored proportion of complete sleep cycles in animals. Thus, liposomal miR-101 has an anti-amyloidogenic and anti-inflammatory effect in rats with a model of Alzheimer's disease. It helps to restore the functional state of olfactory analyzer and optimize structural organization of the sleep-wakefulness cycle in sick animals.

**Key words:** miR-101,  $\beta$ -amyloid peptide, cytokines, Alzheimer's disease, sense of smell, sleep, liposomes.

**About the authors:**

V.V. Sokolik – SI "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the NAMS of Ukraine", Akademika Pavlova Str., 46, Kharkiv, Ukraine, 61068, V.sokolik67@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-6829-2300>

N.O. Levicheva – SI "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the NAMS of Ukraine", Akademika Pavlova Str., 46, Kharkiv, Ukraine, 61068, nati-ki-le@ukr.net, <http://orcid.org/0000-0003-2963-0762>  
V.V. Geiko – SI "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the NAMS of Ukraine", Akademika Pavlova Str., 46, Kharkiv, Ukraine, 61068, vvgеiko@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-5891-1104>  
O.G. Berchenko – SI "Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of the NAMS of Ukraine", Akademika Pavlova Str., 46, Kharkiv, Ukraine, 61068, berchenko.olga@ukr.net, <http://orcid.org/0000-0003-4201-4542>  
S.M. Shulga – SI "Institute of Food Biotechnology and Genomics of the NAS of Ukraine", Osipovskogo Str., 2A, Kyiv, Ukraine, 04123, Shulga5@i.ua, <http://orcid.org/0000-0003-1080-8583>

## Модулирующее влияние липосомальной miR-101 на процессы амилоидогенеза, обоняния, сна и нейровоспаления при экспериментальной болезни Альцгеймера

В.В. Соколик, Н.А. Левичева, В.В. Гейко, О.Г. Берченко, С.М. Шульга

Существующая терапия болезни Альцгеймера не дает шансов пациентам на выздоровление. Поэтому актуальным является изучение новейших факторов влияния, в частности микроРНК, на патогенетические механизмы амилоидоза. Целью работы было определение эффекта miR-101 на ранние предикторы амилоидоза при экспериментальной болезни Альцгеймера у животных. Исследование было выполнено на 25 крысах-самцах 14-мес. возраста. Модель болезни Альцгеймера создавали путем интрагиппокампального введения животным агрегатов A $\beta$ <sub>40</sub>. Через 10 суток начинали 10-дневный курс назального введения крысам miR-101 в липосомах. В супернатантах нервных тканей целевых структур головного мозга (гиппокамп, обонятельные луковицы, обонятельные бугры) определяли уровень эндогенного A $\beta$ <sub>42</sub> и цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-6 и IL-10). Для оценки функционального состояния обонятельной системы была задействована нейротоологическая методика предъявления запахов изовалериановой кислоты и арахисовой пасты. В ходе полиграфической регистрации цикла бодрствование-сон определяли представленность бодрствования и отдельных фаз сна, а также долю незавершенных и завершенных циклов сна у животных. Показано, что введение агрегатов A $\beta$ <sub>40</sub> в гиппокамп моделирует у крыс амилоидогенное состояние в гиппокампе и обонятельных буграх, но не в обонятельных луковицах. Также было отмечено провоспалительное состояние в гиппокампе головного мозга животных (увеличение концентрации провоспалительных цитокинов TNF $\alpha$  и IL-6), тогда как в обонятельных луковицах и обонятельных буграх их уровень не менялся. При исследовании функционального состояния обонятельного анализатора у крыс с болезнью Альцгеймера были выявлены негативные изменения обонятельного поведения на запахи изовалериановой кислоты и арахисового масла. В отношении сомнограмм, токсичность A $\beta$ <sub>40</sub> у животных обуславливала сокращение стадии глубокого медленного сна в сочетании с дефицитом фазы парадоксального сна, а также преобладание незавершенных циклов сна. Назальная терапия miR-101 в липосомах нормализовала уровень A $\beta$ <sub>42</sub> в гиппокампе и обонятельных буграх и снизила в гиппокампе уровень провоспалительных цитокинов. MiR-101 предотвращала нарушение обонятельной функции оценки запахов изовалериановой кислоты и арахисового масла и вызвала увеличение представленности фаз глубокого медленного сна и парадоксального сна в структуре цикла, а также восстановление доли завершенных циклов сна у животных. Таким образом, липосомальная miR-101 имеет антиамилоидогенный и противовоспалительный эффект у крыс с моделью болезни Альцгеймера, а также способствует восстановлению у них функционального состояния обонятельного анализатора и оптимизации структурной организации цикла бодрствование-сон.

**Ключевые слова:** miR-101,  $\beta$ -амилоидный пептид, цитокины, болезнь Альцгеймера, обоняние, сон, липосомы.

### Об авторах:

В.В. Соколик – ГУ «Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины», ул. Академика Павлова, 46, Харьков, Украина, 61068, v.sokolik67@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-6829-2300>  
Н.А. Левичева – ГУ «Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины», ул. Академика Павлова, 46, Харьков, Украина, 61068, nati-ki-le@ukr.net, <http://orcid.org/0000-0003-2963-0762>  
В.В. Гейко – ГУ «Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины», ул. Академика Павлова, 46, Харьков, Украина, 61068, vvgеiko@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0001-5891-1104>  
О.Г. Берченко – ГУ «Институт неврологии, психиатрии и наркологии НАМН Украины», ул. Академика Павлова, 46, Харьков, Украина, 61068, berchenko.olga@ukr.net, <http://orcid.org/0000-0003-4201-4542>  
С.М. Шульга – ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», ул. Осиповского, 2А, Киев, Украина, 04123, Shulga5@i.ua, <http://orcid.org/0000-0003-1080-8583>

Подано до редакції / Received: 15.04.2021

Прорецензовано / Revised: 11.05.2021

Прийнято до друку / Accepted: 18.05.2021