■ ОРИГІНАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.2:616

ПРЯМА ТА НЕПРЯМА ДІЯ ЛІПОСОМАЛЬНОЇ ФОРМИ MIR-101 НА КЛІТИНИ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ ХВОРОБИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

В.В. СОКОЛІК [1], О.Г. БЕРЧЕНКО [1], О.К. КОЛЯДА [2], С.М. ШУЛЬГА [3]

[1] ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України», Харків, Україна, вул. Академіка Павлова, 46, 61068
[2] ДУ «Інститут геронтології ім. Д.Ф.Чеботарьова НАМН України», Київ, Україна, вул. Вишгородська, 67, 04114
[3] ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», Київ, Україна, вул. Осиповського, 2А, 04123

E-mail: Shulga5@i.ua, v.sokolik67@gmail.com, berchenko.olga@ukr.net, alex.genetic@gmail.com

В даний час хвороби мозку є невирішеною проблемою XXI століття. Хвороба Альцгеймера була вперше виявлена 100 років тому і за цей час жоден пацієнт з таким діагнозом не вилікувався. Тому пошук нових стратегій лікування з використанням регуляторних агентів, таких, як специфічні мікроРНК, є актуальним. Метою роботи було визначити вплив ліпосомальної форми miR-101 на рівень β-амілоїдного пептиду 42 (Aβ42) та систему цитокінів за клітинної моделі хвороби Альцгеймера. Робота включала ПЛР, ІФА та флуоресцентні методи. За допомогою FAM було виявлено, що ліпосомальна форма miR-101 накопичується в мононуклеарних клітинах крові, попередньо оброблених агрегатами Aβ40, і функціонує впродовж 2–3 год, а не миттєво руйнується нуклеазами. Екзогенна miR-101 не впливає на транскрипцію гена AβPP, але зменшує утворення ендогенного Aβ42. Непрямий протизапальний ефект ліпосомальної форми miR-101 був встановлений після 12 годин інкубації з мононуклеарними клітинами: зниження внутрішньоклітинного рівня TNFα та IL-10. Однак miR-101 не впливала на експресію генів TNFα і IL-6 та затримувала пік активації експресії гену IL-10 на 9 годин. Таким чином, ліпосомальна форма miR-101 показала прямий антиамілоїдогенний ефект та непрямий протизапальний ефект за клітинної моделі хвороби Альцгеймера.

Ключові слова: *miR-101, хвороба Альцгеймера, ліпосоми, β-амілоїдний пептид, цитокіни, мононуклеарні клітини крові.*

Вступ. Надмірне накопичення β-амілоїдного пептиду (Aβ) з подальшою його олігомеризацією викликає цитотоксичність нейронів і є ключовим патогенним фактором за хвороби Альцгеймера (ХА). Він утворюється з протеїну попередника β-амілоїдного пептиду (АβРР) під час амілоїдогенного процесінгу специфічними секретазами (Frozza, 2018). Рівні АβРР можуть регулюватися на геномному, транскрипційному або трансляційному рівнях. На геномному рівні у пацієнтів з синдромом Дауна (трисомія 21) є три копії гена *AβPP*, а симптоми ХА розвиваються на ранніх етапах життя (Rumble, 1989). Подібним чином, дуплікація локусу АβРР, за відсутності повної трисомії 21, також призводить до раннього початку ХА (Sleegers, 2006). Порушення регуляції транскрипції *AβPP* також може збільшити ризик розвитку ХА. Генетичні варіації промотору *AβPP* збільшують транскрипцію АβРР у 2–3 рази та ризик розвитку ХА (Brouwers, 2006). Фактори росту контролюють період напіврозпаду матричної рибонуклеїнової кислоти АβРР ($mRNA^{A\beta PP}$) (Rajagopalan, 2000). Ці ефекти факторів росту залежать від послідовності 29 п.н. в АβРР 3'UTR (Rajagopalan, 1998). Трансляція АβРР також регулюється; наприклад, інтерлейкіном-1 (IL-1) (Rogers, 1999). IL-1 є прозапальним цитокіном, а генетичні варіації його гену пов'язані з підвищеним ризиком розвитку ХА (Griffin, 2000; Bertram, 2007). У сукупності ці результати дають вагомі докази того, що підвищення рівня АβРР збільшує ризик розвитку хвороби Альцгеймера.

МікроРНК (miRNA) – це невеликі некодуючі РНК, які контролюють експресію генів на рівні трансляції. Комплементарне зв'язування між miRNA та відповідними mRNA призводить до репресії експресії генів-мішеней шляхом транс-

© В.В. СОКОЛІК, О.Г. БЕРЧЕНКО, О.К. КОЛЯДА, С.М. ШУЛЬГА, 2021

ляційного інгібування та деградації mRNA (Pillai, 2005). Близько тисячі генів miRNA кодується в геномі людини, і останні дані свідчать про те, що деякі miRNA диференційовано експресуються у пацієнтів з ХА порівняно з віковим контролем (Lukiw, 2007). Ці відмінності в експресії miRNA можуть відігравати важливу роль у патогенезі ХА (Hébert, 2008).

Показано, що специфічні мікроРНК: miR-9, miR-29, miR-29a / b-1, miR-124, miR-101, miR-107, miR-298 і miR-328 демонструють збільшення продукування Аβ у пацієнтів або моделей тварин з ХА шляхом регулювання експресії β-секретази (BACE1) та АβРР у центральній нервовій системі (ЦНС) (Hébert, 2008; Hébert, 2009; Boissonneault, 2009; Long, 2011). Клінічні дослідження підтвердили, що рівень miR-29a/101 у периферичній крові пацієнтів з ХА суттєво знижений (Ma, 2016). Було також показано, що деякі мікроРНК беруть участь у фізіологічній регуляції рівня АβРР. Так надмірна експресія miR-106a та miR-520c обумовлює значне зниження рівня АβРР у клітинах HEK-293 (Patel, 2008). Зниження експресії miR-16 потенційно спричинює накопичення АβРР в ембріонах мишей P8 (SAMP8) з прискореним старінням з ХА; тоді як надмірна експресія miR-16, навпаки, викликає інгібування експресії *AβPP in vitro* та *in vivo* (Hébert, 2009). Отже, надмірна експресія цих miRNA може відігравати вирішальну роль у генерації Аβ. Надмірна експресія miR-29 у людей та трансгенних мишей з ХА викликає зниження ендогенного BACE1 та збільшення продукування Аβ (Delay, 2012). Тоді як знижену експресію miR-17, miR-101 та miR-16 супроводжує високий рівень АβРР.

Встановлено, що зміна синаптичної пластичності є однією з важливих особливостей для пацієнтів з ХА. Відновлення когнітивних функцій може бути досягнуто шляхом відновлення регуляторних ефектів miRNA, що діють на синаптичному рівні. Надмірна експресія miR-188-5p відновлює зменшення дендритної щільності в первинних культурах нейронів гіпокампа щурів з експозицією Аβ. Вважають, що довгострокове потенціювання (LTP) є синаптичним механізмом, що лежить в основі зберігання довгострокової пам'яті в мозку. Підвищення рівня miR-188-5p може покращити поведінкові результати та посилити синаптичну активність, а також відновити когнітивні функції в моделях мишей з ХА, таких як миші 5XFAD (Lee, 2016; Zhang, 2014). Однак деякі мікроРНК аномально підвищені в моделях ХА і можуть мати негативний вплив на нейрони. У дослідженні пацієнтів з ХА було виявлено, що експресія miR-34a/p73 помітно підвищена в гіпокампі, який бере участь у модуляції синаптичної активності, зменшуючи експресію синаптотагміну-1 (Agostini, 2011). Надмірна експресія miR-30b у тканинах гіпокампа може загрожувати синаптичній структурі і функції нейронів гіпокампа та спричинити когнітивні порушення у нормальних тварин дикого типу. Підвищена регуляція miR-181 та Sirtuin 1 (SIRT1) та зниження рівня протеїну фактора транскрипції AP-1 (c-Fos) спостерігалися у дорсальному та вентральному відділах гіпокампу мишей 3xTg-AD. SIRT1 і AP-1 субодиниці транскрипційного фактору c-Fos беруть участь у консолідації пам'яті як потенційні цілі miR-181 (Rodriguez-Ortiz, 2014). Нейротрофічний фактор мозку (*brain derived neurotrophic factor*, BDNF) відіграє ключову роль у синаптичній пластичності та пізнанні. Попередні дослідження встановили, що зниження BDNF у префронтальній корі та гіпокампі пов'язане з когнітивними дефіцитами у тваринних моделях ХА (Arancibia, 2011; Ramser, 2013). Недавнє дослідження показало, що miR-10a є негативним регулятором у реконструкції синапсів в результаті зменшення сигналів BDNF-TrkB у щурів з моделлю ХА.

Нейрозапалення (НЗ) в тканинах мозку за ХА головним чином опосередковується мікроглією та астроцитами. Це підтверджується підвищеним рівнем прозапальних цитокінів, зокрема фактором некрозу пухлини α (TNFα) та інтерлейкіну-6 (IL-6) у сироватці та тканині мозку пацієнтів з ХА, порівняно до контролю (Fillit, 1991; Strauss, 1992). Більше того, посилена регуляція АβРР також пов'язана з нейрозапаленням. На перебіг запального процесу впливає змінена експресією miRNA в мозку за ХА. MiR-155 – одна з найбільш добре вивчених мікроРНК за нейрозапальних подій, пов'язаних з ХА. У тваринній моделі 3xTg AD спостерігається високий рівень експресії цієї мікроРНК. Підвищена регуляція miR-155 одночасно супроводжується посиленою активацією мікроглії та астроцитів, що запускає продукцію

медіаторів запалення. Крім того, miR-155 може сприяти розвитку ХА шляхом активації різних функцій Т-клітин під час запалення (Song, 2015). Клінічні дані людського мозку з амілоїдозом свідчать про те, що рівні miR-125b та miR-146 підвищені, щоб посилити нейрозапалення та зменшити вміст фактора комплементу H (CFH), що пов'язано з вивільненням нейронами miR-146a та miR-155 та поширенням запалення в мозку (Lukiw, 2012; Redis, 2012).

Вважається, що терапія мікроРНК – це майбутнє персоніфікованої медицини, і вона показала перспективу в ранніх клінічних випробуваннях. Однак у системі доставки miRNA до цитоплазми цільових клітин для виконання їх функцій існує багато фізіологічних бар'єрів (зокрема, гематоенцефалічний бар'єр для ЦНС). Для подолання цих бар'єрів були розроблені системи доставки miRNA. Серед них наночастинки на основі ліпідів (ліпосоми) мають великий потенціал завдяки своїй біосумісності та низькій токсичності порівняно з неорганічними наночастинками та вірусними системами (Lin, 2013). Ліпосоми (L) відповідають сучасній системі контролю у цільовій доставці ліків. Ліпосоми були однією з перших систем випуску нанорозмірних лікарських засобів, а також представляють перше покоління носіїв ліків на основі ліпідів (Yingchoncharoen, 2016). Ліпідний бішар ліпосом забезпечує значний бар'єр проникності, який визначає внутрішній компартмент і здатний до захисту внутрішнього вмісту. Таким чином, ліки, інкапсульовані в цьому ліпідному двошарі, захищені від позаліпосомних реакцій, які можуть змінити ефективність препарату, такі як ензимна деградація або модифікація препарату (Fenske, 2008).

Метою цього дослідження було визначити вплив ліпосомальної форми miR-101 на рівень β-амілоїдного пептиду та активацію системи цитокінів у клітинній моделі хвороби Альцгеймера.

Матеріали і методи. *Дизайн дослідження дії ліпосомальної форми miR-101 на клітинній моделі хвороби Альцгеймера*. Дослідження *in vitro* за умов впливу агрегатів β-амілоїдного пептиду (Aβ40) та подальшої терапії ліпосомальними формами мікроРНК (miR-101 та її антисенсовий аналог miR-101_as) було виконане на суспензії мононуклеарних клітин людини (n = 3 зразки), отриманих *ex tempera*. Комісія з етики Інституту неврології, психіатрії та наркології у Харкові, Україна, схвалила дослідження (Протокол № 12-а, 12 грудня 2019 р.). Під час збору зразків крові була отримана письмова інформована згода волонтерів. Мононуклеари з кожного зразка венозної крові чоловіків-добровольців у віці 25–38 років виділяли за допомогою фікол-урографічного градієнту щільності, тричі промивали фізіологічним розчином (0,9 % NaCl) і ресуспендували в середовищі RPMI до концентрації 11–13 тис × 10^9 на літр.

Beta Amyloid Peptide (1–40) (Human), Abcam, UK розчиняли у бідистиляті до концентрації 1,5 ммоль в літрі та агрегували 24 години при 37 °C. Великі грубі конгломерати Aβ40 диспергували за допомогою ультразвуку і стерилізували безпосередньо перед додаванням до суспензії мононуклеарів. Суспензію агрегатів Aβ40 додавали до інкубаційного середовища з розрахунку 1 : 17.

Для дослідження ефекту miR-101 (miR-101-3p, ООО «НПФ «Синтол», РФ) її ліпосомну форму, а також окремо порожні ліпосоми та ліпосоми з антисмисловою miR-101 (miR-101_as, ООО «НПФ «Синтол», РФ), одержували методом ліпідних плівок. Діаметр ліпосом калібрували в екструдері «Liposo Fast-Basic LF-1» (Avestin, Канада) за допомогою полікарбанатних мембран з отворами 100 нм (0,1 мкм). Концентрація мікроРНК у суспензії ліпосом становила 12,5 × 10^{18} молекул на літр. Усі задіяні ліпосомальні препарати додавали до інкубаційного середовища у співвідношенні 1 : 50. Знежирений лецитин олії соняшника фірми «BIOLER» (Дніпро, Україна). Його склад наведено в табл. 1. Концентрація miR-101 у суспензії ліпосом становила 12,5 × 10^{18} молекул на літр. У табл. 2 наведені нуклеотидні послідовності miR-101 та miR-101_as.

У дослідженні було виокремлено по 4 експериментальні групи з кожного зразка людських мононуклеарних клітин: контроль: 0,9 % NaCl + 0,9 % NaCl, група L(0): $Aβ_{40}$ + пусті ліпосоми, група L(miR-101_as): $Aβ_{40}$ + ліпосоми з антисмисловою miR-101, група L(miR-101): $Aβ_{40}$ + + ліпосоми з miR-101, які інкубували за 37 °C з відповідними добавками впродовж 19 год.

До всіх груп, окрім контролю, додавали агрегати β-амілоїдного пептида 40 для створення експериментальної моделі хвороби Альцгеймера на клітинах. Після однієї години інкубації додавали відповідні ліпосомні препарати у всі

групи, крім контролю. До контролю в обох випадках додавали еквівалентний об'єм фізіологічного розчину. З кожної групи відбирали аліквоти (V = 300 мкл) для вимірювання експресії і синтезу Aβ42, TNFα, IL-6, IL-10 у динаміці часу: фон, 0-а, 1-а, 3-а, 6-а, 12-а і 18-а години інкубації методами ПЛР та ІФА.

Визначення концентрації β-амілоїдного пептиду 42 та цитокінів у мононуклеарах імуноферментним аналізом. У дослідженні імуноферментний аналіз концентрації Aβ42 здійснювали відповідно до інструкції набору реагентів Human Aβ 1-42 (Amyloid Beta 1-42) ELISA Kit Elabscience Biotechnology Inc., США. Рівень цитокінів методом ІФА (TNFα, IL-6, IL-10) встановлювали за допомогою відповідних наборів реагентів альфа-ФНО-ІФА-БЕСТ, Інтерлейкін-6-ІФА-БЕСТ та Інтерлейкін-10-ІФА-БЕСТ, РФ. Поглинання зразків зчитували за допомогою мікропланшетного аналізатора GBG Stat FAX 2100 (США) за 450 нм з корекцією довжини хвилі у 630 нм. Дані ІФА виражали в пікограмах на мілілітр (пг/мл).

Екстракція РНК та ПЛР у режимі реального часу. Методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) за допомогою відповідних праймерів у мононуклеарах визначали відносну експресію на рівні матричної рібонуклеїнової кислоти (mRNA) для генів *AβPP*, *TNFα*, *IL-6* і *IL-10*. Загальну РНК з клітин виділяли за допомогою набору«Рибо-Сорб» «АмплиСенс» (РФ). Аналіз експресії генів проводили методом ПЛР у реальному часі. Як матрицю використовували комплементарну дезоксирибонуклеїнову кислоту (кДНК), отриману в ході реакції зворотної транскрипції з використанням набору «АмплиСенс» (РФ). Для ампліфікації використовували Rotor-Gene Q (QIAGEN) (Німеччина) і специфічні праймери виробництва Синтол (РФ) (табл. 3).

Реакції ампліфікації проводили у трьох повторностях для кожного гену за наступних умов: 60 с при 95 °С, 40 циклів: 30 с 94 °С, 30 с 60 °С, 30 с 72 °С з використанням SYBR Green mix («Синтол», РФ). До реакційних сумішей додавали наступні концентрації $MgCl_2$ («Синтол», РФ): 1 ммоль для ампліфікації гену *AβPP*, 2 ммоль для ампліфікації генів *IL-6*, *IL-10* та *ACTB*, 4 ммоль для ампліфікації гену TNFα. Рівень експресії визначали методом дельта Ct. Отримані дані нормували за експресією референтного гена *ACTB* (для β-актину) у вигляді співвідношення кількості копій кДНК визначаємого чинника до кількості копій кДНК

Таблиця 1. **Знежирені компоненти лецитину олії соняшника**

Назва фосфоліпідів	Вміст, %
Фосфатидилхолін	46,84
Лізофосфатидилхолін	4,69
Фосфатидилінозитол	27,74
Фосфатидилетаноламін	12,92
Фосфатидна кислота	6,83
Інші фосфоліпіди	0,98

Таблиця 2. **Нуклеотидна послідовність miRNA**

Ім'я	Нуклеотидна послідовність
miR-101	5′UACAGUACUGUGAUAACUGAA3′
miR-101_as	5′UUCAGUUAUCACAGUACUGUA3′

Таблиця 3. Послідовності олігонуклеотидних праймерів

Набір праймерів	Номер за каталогом	Прямий праймер	Зворотний праймер
AβPP	NM_000484	3′-AACCAGTGACCATCCAGAAC-5′	3′-ACTTGTCAGGAACG AGAAGG-5′
TNFα	NM_000594.2	3′-CCCAGGGACCTCTCTCTAATC-5′	3′-ATGGGCTACAGGCTTGTCACT-5′
IL-6	NM_000600	3′-GGTCTTTGCTGCTTTCACAC-5′	3′-GGTACATCCTCGACGGCATC-5′
IL-10	NM_007527.3	3′-CATCGATTTCTTCCCTGTGAA-5′	3′-TCTTGGAGCTTATTAAAGGCATTC-5′
ACTB	NM_001101.3	3′-GGATGCAGAAGGAGATCACTG-5′	3′-CGATCCACACGGAGTACTTG-5′

ACTB і виражали в умовних одиницях експресії (CUE) або у відсотках (%) від показників інкубації з 0,9 % NaCl (прийнятими за 100 %) у кожен відтинок часу.

Флуоресцентне дослідження. Для дослідження динаміки поглинання та релізу ліпосом з miR-101 мононуклеарами людини *in vitro* було створено ліпосомальний препарат miR-101 з флуоресцентною міткою − флуоресцином (FAM). Зразки ліпосом з miR-101-FAM були досліджені на флуориметрі Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Німеччина) з побудовою графіків імісії і визначенням піків флуоресценції (рис. 1).

На графіку імісії флуоресценції зразків ліпосомальних препаратів з miR-101-FAM з'ясували, що пік флуоресценції припадає на довжину хвилі λ = 519 нм, що узгоджується з відомим інтервалом флуоресценції FAM λ = = 518−520 нм та свідчить щодо придатності створеного препарату для подальших досліджень.

Ліпосоми з miR-101-FAM, як і в попередній експериментальній постановці, додавали до суспензії мононуклеарів людини (n = 3 зразки) у RPMI середовищі через 1 год попередньої інкубації з агрегатами Aβ40 (клітинна модель ХА). Аліквоти для флуоресцентного вимірювання відбирали щогодини впродовж 5 год (0, 1, 2, 3, 4 і 5 год). Потім інкубаційне середовище замінювали на вільне від ліпосомальної форми miR-101-FAM з попередньою триразовою відмивкою клітин фізіологічним розчином та продовжували інкубацію з погодинним відбором аліквот для флуоресцентної детекції ще три години (6, 7 і 8 год). Вимірювання інтенсивності флуоресценції проводили окремо у пробах мононуклеарів та інкубаційного середовища на мікропланшетному скануючому флуориметрі Bio-Tek FL600 з програмним забезпеченням KC4 («Bio-Tek», США) при λEx = 485BP20, λEm = 530BP25 нм у 96 лункових планшетах Imaging Plate CG 96 well (GE Healthcare). Для цього відібрані аліквоти попередньо розділяли центрифугуванням на осад клітин і середовище. Клітини тричі відмивали фізіологічним розчином.

Статистичний аналіз. Дані представлені як середнє значення ± стандартне відхилення (SD). Для порівняння непараметричних даних застосовували U-тест Манна-Уітні. Значення $P < 0,05$ вважали значимим.

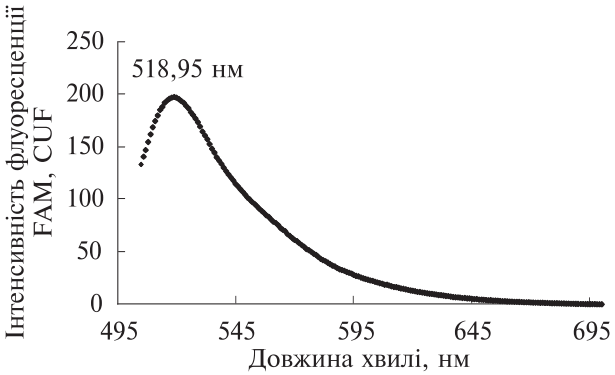

Рис. 1. Спектр імісії флуоресценції флуоресцеїну ліпосом з miR-101-FAM

Результати. *Динаміка накопичення та вивільнення ліпосомальної форми miR-101-FAM під час інкубації мононуклеарних клітин крові людини з моделлю ХА.* Дослідження *in vitro* динаміки поглинання та релізу мононуклеарами людини ліпосом з miR-101, яка мічена флуоресцентною міткою − флуоресцином (FAM), показало наявність плато-максимуму на кривій накопичення ліпосомальної форми miR-101-FAM на 1−2 год інкубації клітин за умов стаціонарно високої позаклітинної концентрації сигналу в інкубаційному середовищі (рис. 2, *а*, *б*).

Виявлено динаміку поступового релізу флуоресцентного сигналу з клітин за умов заміни інкубаційного середовища на вільне від ліпосомальної форми miR-101-FAM вже с першої години інкубації (рис. 2, *в*).

Отримані дані свідчать, що насичуваність мононуклеарів miR-101-FAM у ліпосомах за надлишку останньої в інкубаційному середовищі досягається досить швидко: в перші 1−2 год імісія флуоресцентного сигналу зростала на 51−57 % і потім починала падати до вихідних значень. Тоді як зниження флуоресцентного сигналу після заміни інкубаційного середовища мононуклеарів на вільне від miR-101-FAM у ліпосомах відбувається повільніше: лише на 2−3 год (відповідно 7-а і 8-а година на рис. 2, *в*) імісія флуоресцентного сигналу вірогідно знижується на 45−53 %. Тобто, завдяки ліпосомальній формі miR-101-FAM здатна активно і швидко накопичуватись у клітинах та

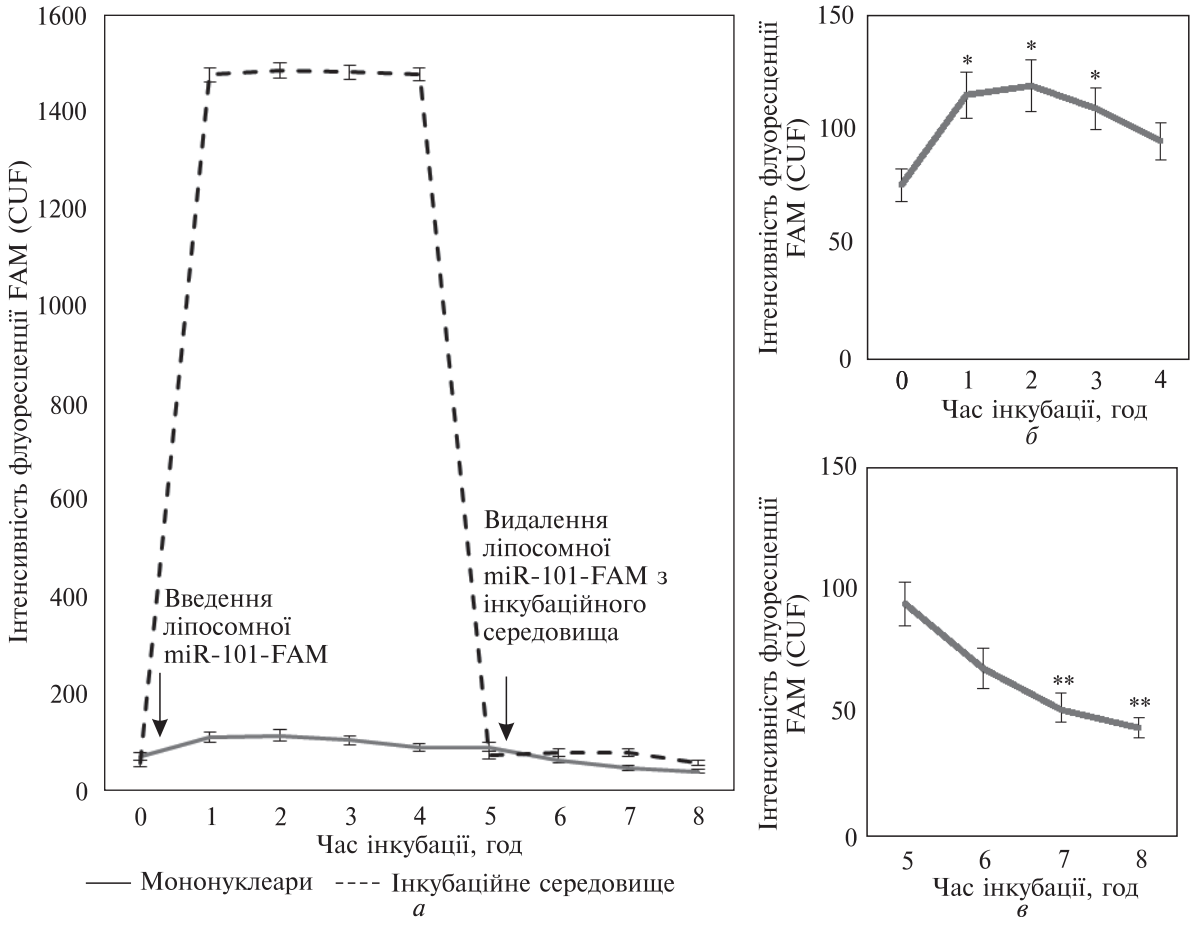

Рис. 2. Динаміка флуоресцентного сигналу FAM у складі ліпосом з miR-101 під час інкубації суспензії мононуклеарів (*а*); поглинання та накопичення ліпосомального miR-101-FAM мононуклеарами з середовища інкубації (*б*); та вивільнення ліпосомного miR-101-FAM мононуклеарами до інкубаційного середовища (*в*). CUF − умовні одиниці флуоресценції. Дані подаються як середнє значення ± SD (n = 3). * $p < 0,05$ порівняно з до введення ліпосомального miR-101-FAM; ** $p < 0,05$ у порівнянні з показником перед заміною інкубаційного середовища на вільне від міченої мікроРНК

виконувати свою терапевтичну дію щонайменше декілька годин, а не руйнуватися миттєво нуклеазами.

Антиамілоїдогенний ефект ліпосомальної форми miR-101 в моделі хвороби Альцгеймера. Вивчення динаміки експресії гену *AβPP* у мононуклеарах *in vitro* за умов впливу агрегатів β-амілоїдного пептиду 40 (Aβ40) та подальшої терапії ліпосомальними формами мікроРНК (miR-101 та її антисенсовий аналог miR-101_as) показало дрейф кривої експресії гену *AβPP* навіть без специфічного впливу, тобто в умовах мікродобавок фізіологічного розчину. Проте, на рис. 3, *а*, *б* видно вірогідну відмінність цього показника лише між 0-ю, 3-ю та 18-ю год інкубації. Тому доцільно було виразити дані у відсотках від показників інкубації з 0,9 % NaCl (прийнятими за 100 %) кожного проміжку часу (рис. 3, *в*). Специфічну дію miR-101 на експресію гену *AβPP* у мононуклеарах не було виявлено (рис. 3, *в*): динаміка кривої для L(miR-101) повторює динаміку кривих для L(0) − порожніі ліпосоми та L(miR-101_as) − антисенсова miR-101 в ліпосомах майже у кожній точці. Це свідчить про відсутність безпосереднього впливу miR-101 на експресію гену *AβPP* на стадії транскрипції матричних РНК^{AβPP}. Проте це не скасовує спроможність мікроРНК фор-

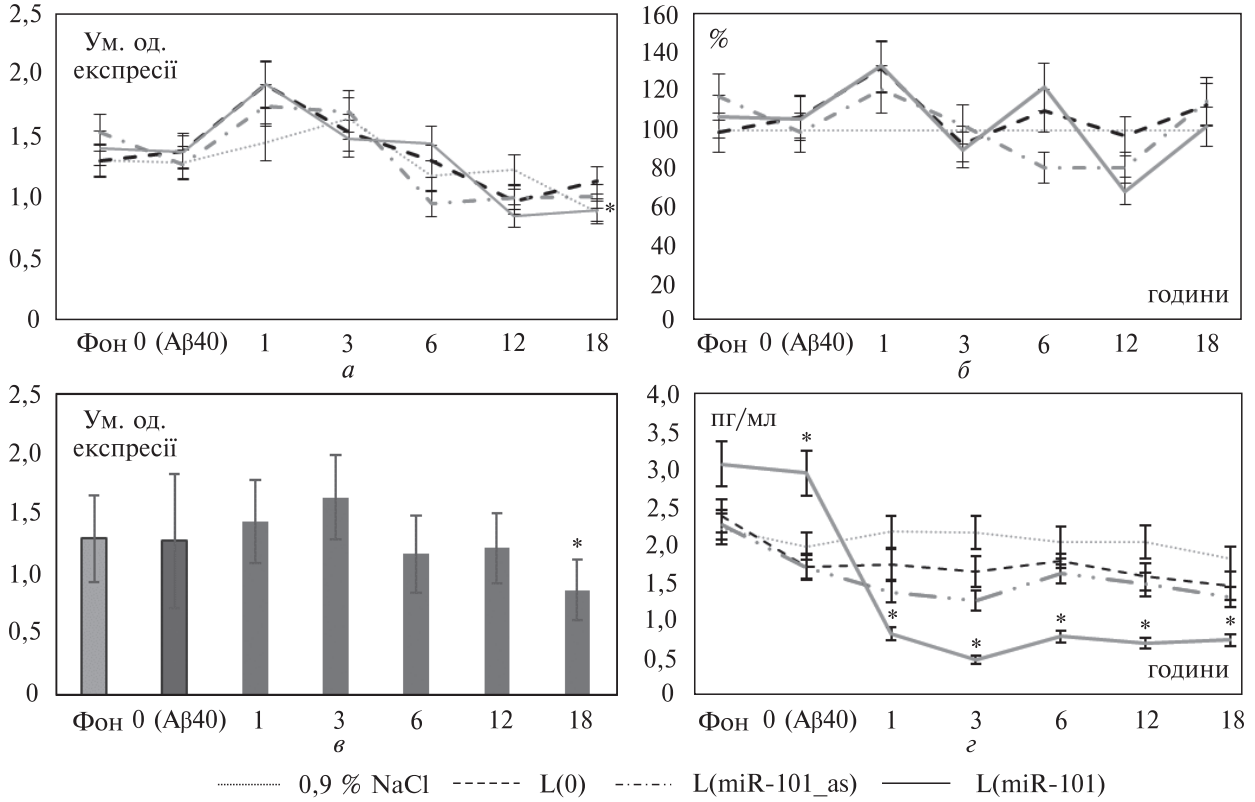

Рис. 3. Динаміка експресії гену *AβPP* у мононуклеарах за умов впливу агрегатів $Aβ_{40}$ та терапії ліпосомальними формами miRNA: L(0) – порожні ліпосоми, L(miR-101) – ліпосоми з miR-101 та L(miR-101_as) – ліпосоми з антисенсовим аналогом miR-101. Контроль – 0,9 % NaCl. (*а*) в умовних одиницях експресії; (*б*) у відсотках від показників інкубації з 0,9 % NaCl (прийнятим за 100 %) у кожному часовому інтервалі; (*в*) динаміка експресії *AβPP* у мононуклеарах під впливом фізіологічного розчину; (*г*) динаміка концентрації ендогенного Aβ42 у мононуклеарах під тими самими впливами. Дані подаються як середнє значення ± SD (n = 3). * $p < 0,05$ у порівнянні з показниками для L(0); L(miR-101_as) або Контроль через відповідні проміжки часу; ** $p < 0,05$ порівняно з 0-ою або 3-ою год інкубації

мувати комплекс з мРНК, дестабілізація якого призводить до руйнації останньої, і пригнічення синтезу протеїнів на стадії трансляції [34].

Визначення динаміки концентрації ендогенного β-амілоїдного пептиду 42 у мононуклеарній суспензії *in vitro* за умов впливу агрегатів Aβ40 та подальшої терапії ліпосомальними формами мікроРНК (miR-101 та її антисенсовий аналог miR-101_as) показало вірогідне зниження рівня Aβ42 лише у випадку miR-101 вже з першої години дії, яке зберігалося до кінця дослідження (рис. 3, *г*). Цей результат є доказом вищенаведеної тези стосовно інгибування трансляції *AβPP* відповідним різновидом мікроРНК, зокрема miR-101. Отримані дані свідчать про пролонгований і специфічний характер пригнічення утворення ендогенного Aβ42 завдяки зниження синтезу *de novo* його попередника AβPP у випадку дії miR-101.

Антизапальна дія ліпосомальної форми miR-101 на моделі хвороби Альцгеймера in vitro. На рис. 4, *а–в* наведено результати експериментального дослідження динаміки концентрації цитокінів (IL-10, IL-6, TNFα) у мононуклеарній суспензії *in vitro* за умов впливу Aβ40 агрегатів та терапії ліпосомними формами miRNA. Видно суттєве зниження рівня IL-10 на 12 год інкубації з токсичними агрегатами Aβ40 і ліпосомальною формою miR-101 на відміну від ефекту порожніх ліпосом, ліпосом з антисенсовою miR-101 або 0,9 % NaCl (рис. 4, *а*). Це свідчить про опосередковану антизапальну

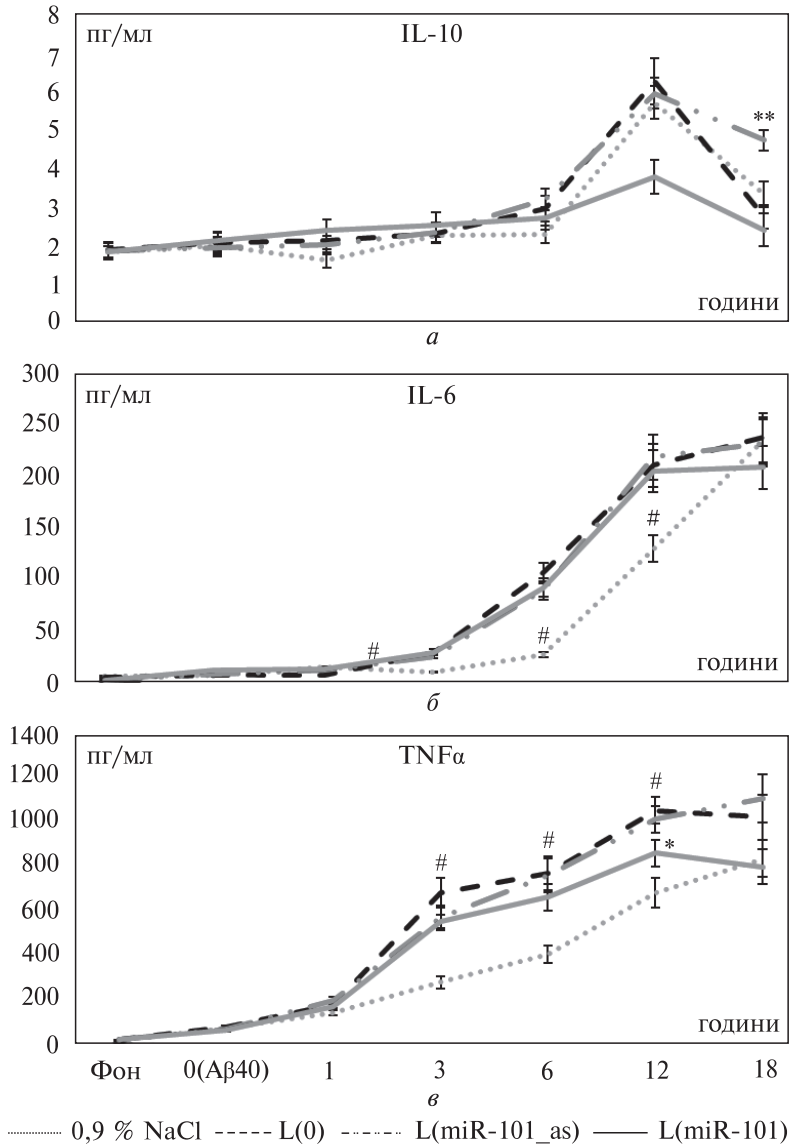

Рис. 4. Динаміки концентрації IL-10 (*а*), IL-6 (*б*), TNFα (*в*) у мононуклеарах за умов впливу Aβ40 та подальшої терапії ліпосомальними формами мікроРНК. Дані подаються як середнє значення ± SD (n = 3). * $p < 0,05$ у порівнянні з показниками для L(0); L(miR-101_as) та контролем (0,9 % NaCl) через відповідні проміжки часу; ** $p < 0,05$ у порівнянні з показниками L(0); L(miR-101) та контролем (0,9 % NaCl) через відповідні проміжки часу; # $p < 0,05$ у порівнянні з показниками лише контролю

дію miR-101 ймовірно за рахунок пригнічення утворення амілоїдогенного Aβ42 у клітинах та відповідно меншу активацію цитокінового каскаду запалення. Специфічного пригнічуючого впливу ліпосомальної форми miR-101, як і інших ліпосомальних форм препаратів, на рівень IL-6 в мононуклеарній суспензії виявлено не було. Натомість показано вирогідне збільшення концентрації цього інтерлейкіну другої хвилі цитокінового каскаду в інтервалі 3–12 год інкубації з ліпосомами: L(0), L(miR-101_as) та L(miR-101) за порівняння з Контролем (рис. 4, *б*). Пригнічуючий вплив ліпосомальної форми miR-101 на прозапальний TNFα було зазначено на 12 год інкубації, як і у випадку протизапального інтерлейкіну-10 (рис. 4, *в*); на 3–6 та 18 год

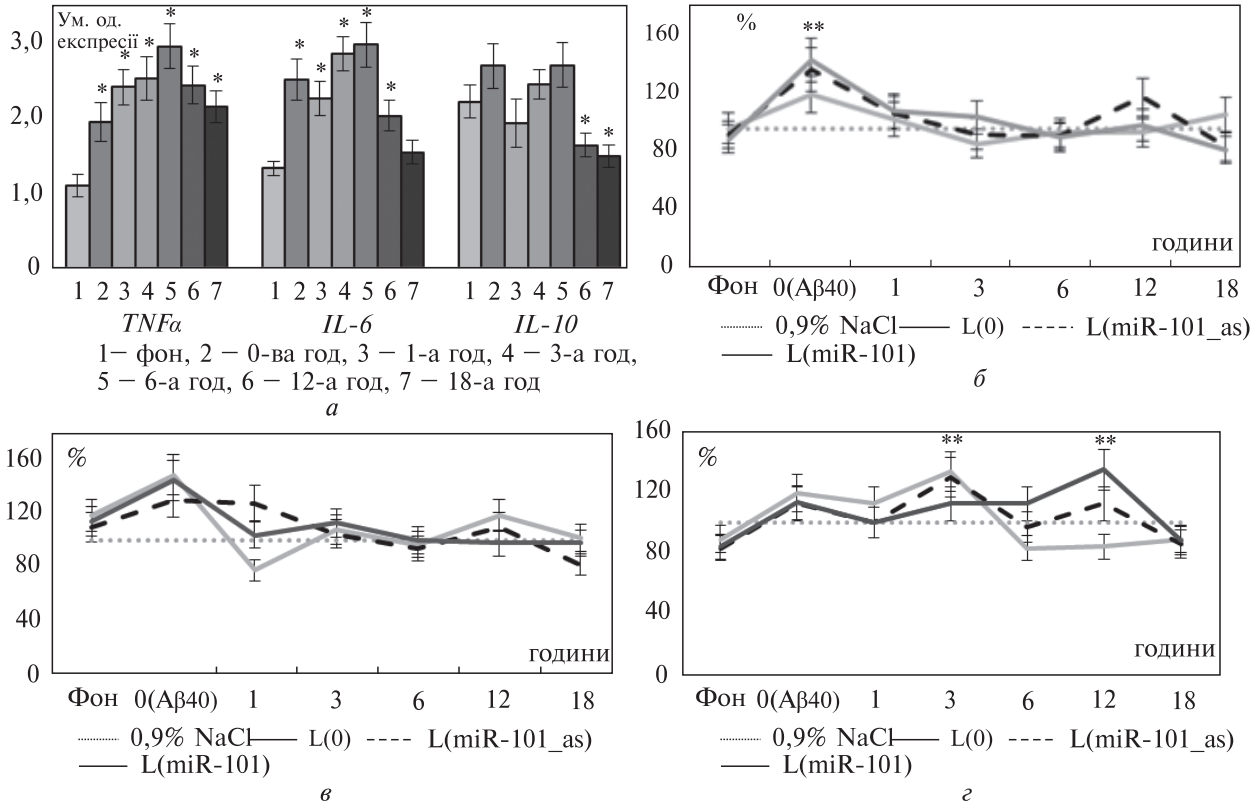

Рис. 5. Динаміка експресії генів цитокінів (*TNFα, IL-6, IL-10*) у мононуклеарах під впливом 0,9 % NaCl в умовних одиницях експресії (*а*); під впливом агрегатів Aβ40 та ліпосомальними формами miR-101 та miR-101_as у відсотках від інкубації з 0,9 % NaCl (прийнятим за 100 %) у кожен період часу для TNFα (*б*), IL-6 (в), IL-10 (*г*). Дані подаються як середнє значення ± SD (n = 3). * $p < 0,05$ порівняно з фоном; ** $p < 0,05$ у порівнянні зі 100 %

інкубації концентрація TNFα була вища контрольних показників та істотно не відрізнялась від відповідних показників інших ліпосомних форм. Таку досить відстрочену дію miR-101 на рівень цитокінів може пояснити опосередкований характер її впливу на цитокіновий каскад запалення у мононуклеарах через ендогенного посередника – сигнальні пептиди вродженого імунітету із сімейства β-амілоїдних пептидів.

Таким чином, специфічний антизапальний вплив (зменшення рівнів TNFα і IL-10) ліпосомальна форма miR-101 демонструє лише на 12 год інкубації на клітинній моделі хвороби Альцгеймера *in vitro*.

На відміну від сталої динаміки активації експресії гену *AβPP* у мононуклеарах в умовах мікродобавок фізіологічного розчину (рис. 3, *в*), експресія генів *TNFα* та *IL-6* за аналогічних умов зростала одразу і потужно (рис. 5, *а*).

Динаміка експресії гена *IL-10* не змінювалась, а в інтервалі часу 12–18 год, навіть вірогідно знижувалась.

Для оцінки специфічності впливу агрегатів Aβ40 та ліпосомальних форм miRNA виразили дані у відсотках від показників інкубації з 0,9 % NaCl (прийнятими за 100 %) у кожен проміжок часу (рис. 5, *б–г*). Динаміка експресії генів *TNFα* та *IL-6* показує відсутність впливу на транскрипцію відповідних *мРНК* ($mRNA^{TNFα}$ та $mRNA^{IL-6}$) досліджуваних ліпосомальних форм miRNA (miR-101 та miR-101_as) та пряму специфічну дію агрегатів Aβ40 (модель клітинної ХА) на ранній стадії. Динаміка експресії гена прозапального *IL-10* у мононуклеарах відрізнялася від вищенаведеної для генів прозапальних цитокинів *TNFα* та *IL-6* (рис. 5, *б–г*), а саме пік активації спостерігався пізніше (на 3-у год інкубації) та ліпосомальна форма miR-101 його

відстрочувала майже на 9 год (12 год інкубації на рис. 5, *г*). Такий неочікуваний ефект ліпосомальної форми miR-101 можна пояснити лише непрямим впливом: пригнічення утворення ендогенних β-амілоїдних пептидів цією miRNA. Отже, ліпосомальна форма miR-101, яка комплементарна до специфічних ділянок mRNA$^{A\beta PP}$, не впливала на експресію генів прозапальних цитокінів (*TNFα* та *IL-6*) та специфічно відстрочувала на 9 год пік активації експресії гену протизапального цитокіну *IL-10*.

Обговорення. Природними аналогами екзогенних ліпосом є ендогенні екзосоми (30–100 нм) і мікровезикули (50–1000 нм), які переносять між клітинами широкий спектр біологічно активних молекул, включаючи мікроРНК (Losurdo, 2020). На сьогоднішній день, згідно збірника молекулярних даних (Vesiclepedia) 10 520 miRNA було виявлено в екзосомах, мікровезикулах та апоптотичних тілах, що свідчить про високий ступінь складності у позаклітинній везикулярній комунікації. Отже, імітація ліпосомами з miR-101 цього сигнально-регуляторного механізму інформаційної міжклітинної взаємодії у нашому дослідженні показала ефективний і тривалий захист miRNA ліпідною мембраною і, як наслідок, оптимальну функціональність miR-101. Експресія більшості miRNA відбувається тканинно і часо специфічно (Fu, 2019). Однак період напіввиведення miRNA короткий через наявність нуклеаз (Czauderna, 2003). Більш того, через свою полярність miRNA важко проходять крізь двошарову фосфоліпідну мембрану клітини. Таким чином, за внутрішньовенного введення вільна miRNA не може швидко проникнути в ендотелій судин і утримується в органах зберігання крові (печінці та селезінці), і в кінцевому підсумку виводиться нирками. Для вирішення цієї проблеми було розроблено велику кількість векторів для доставки miRNA. У наших попередніх роботах ефективність ліпосомальної форми упаковки miR-101 та куркуміну була виявлена, за вве-дення інтраназально курсами тваринам з моделлю хвороби Альцгеймера *in vivo* (Sokolik, 2017; Sokolik, 2019).

Деякі дослідники відзначають особливості експресії мікроРНК не тільки в цільових відділах головного мозку (Barak, 2013; Reddy, 2017; Amakiri, 2019), але і в мононуклеарних клітинах крові (Schipper, 2007) за хвороби Альцгеймера. Зокрема, miR-101 пригнічує експресію *AβPP* у нейронах гіпокампа (Vilardo, 2010) та у культурі клітин людини (Chakrabarty, 2007). Наше дослідження мононуклеарних клітин крові також показало, що miR-101 є негативним регулятором експресії *AβPP*. Обговорюючи непряму протизапальну дію ліпосомальної форми miR-101 на цитокіни та їх гени (*TNFα, IL-6, IL-10*), крім непрямого впливу β-амілоїдних пептидів, слід зауважити, що miR-101 регулює пов'язаний із запаленням ген циклооксигенази-2 (*COX-2*) (Strillacci, 2009). Було показано, що COX-2 активується в мозку за ХА, а також асоціюється з втратою нейронів. Ці результати свідчать, що miR-101 являє собою нову мішень для терапевтичної модуляції рівнів АβPP. Можливо, пряма доставка miR-101, або посилення регуляції її ендогенної експресії зменшать клітинний рівень АβPP. MiR-101 експресується з двох незалежних геномних локусів на хромосомах 1 та 9, які знаходяться в міжгенних областях. Елементи промотору, які регулюють транскрипцію miR-101, є невизначеними і тільки починають характеризуватися. Тому ліпосомна доставка екзогенної miR-101 на даний момент є найбільш перспективною.

Таким чином, результати дослідження дозволяють простежити в динаміці точну регуляцію цією мікроРНК експресії окремих генів (*AβPP, TNFα IL-6*, *IL-10*) та зробити висновок, що ліпосомальна форма miR-101 ефективна для корекції амілоїдозу та запалення за хвороби Альцгеймера.

Дотримання етичних стандартів. Під час збору зразків крові для отримання мононуклеарної суспензії була отримана письмова інформована згода волонтерів (Протокол № 12-а, 12 грудня 2019 р. комісії з етики Інституту неврології, психіатрії та наркології у Харкові, Україна).

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

DIRECT AND AN INDIRECT EFFECT OF LIPOSOMAL MIR-101 ON CELLULAR MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE

V.V. Sokolik, O.G. Berchenko,
O.K. Kolyada, S.M. Shulga

SI «Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 46, Akademika Pavlova str., Kharkiv, Ukraine, 61000
SI «D.F. Chebotaryov Institute of Gerontology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 67, Vyshgorodskaya str., Kyiv, Ukraine, 04114
SI «Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine», 2a, Osypovskoho str., Kyiv, Ukraine, 04123

E-mail: Shulga5@i.ua, v.sokolik67@gmail.com, berchenko.olga@ukr.net, alex.genetic@gmail.com

At present, brain diseases are an unsolved problem of the 21st century. Alzheimer's disease was first discovered 100 years ago, and during this time not a single patient with this diagnosis has been cured. Therefore, the search for new treatment strategies using regulatory agents such as specific miRNAs is urgent. The aim was to determine the effect of liposomal miR-101 on amyloid-β protein 42 (Aβ42) levels and the cytokine system in a cellular model of Alzheimer's disease. The work included PCR, ELISA and fluorescent methods. Using FAM, it was found that liposomal miR-101 accumulates in blood mononuclear cells pretreated with Aβ40 aggregates and functions for 2–3 hours, rather than being instantly destroyed by nucleases. Exogenous miR-101 did not affect AβPP gene transcription and decreased the formation of endogenous Aβ42. An indirect anti-inflammatory effect of liposomal miR-101 was established after 12 hours of incubation with mononuclear cells: a decrease in intracellular levels of TNFα and IL-10. However, miRNA-101 did not affect the expression of TNFα and IL-6 and delayed the peak of activation of IL-10 expression by 9 hours. Thus, liposomal miR-101 showed a direct anti-amyloidogenic effect and an indirect anti-inflammatory effect in a cellular model of Alzheimer's disease.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Agostini M, Tucci P, Killick R et al. (2011) Neuronal differentiation by TAp73 is mediated by microRNA-34a regulation of synaptic protein targets. Proc Natl Acad Sci USA. doi: 10.1073/pnas.1112061109

Amakiri N, Kubosumi A, Tran J et al. (2019) Amyloid beta and MicroRNAs in Alzheimer's disease. Front Neurosci. doi: 10.3389/fnins.2019.00430

Arancibia S, Silhol M, Mouliere F et al. (2008) Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. Neurobiol Dis. doi: 10.1016/j.nbd.2008.05.012

Barak B, Shvarts-Serebro I, Modai S et al. (2013) Opposing actions of environmental enrichment and Alzheimer's disease on the expression of hippocampal microRNAs in mouse models. Transl. Psychiatry. doi: 10.1038/tp.2013.77

Bertram L, McQueen MB, Mullin K et al. (2007) Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: The alzgene database. Nat Genet. doi: https://doi.org/10.1038/ng1934

Boissonneault V, Plante I, Rivest S et al. (2009) MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1. J Biol Chem. doi: 10.1074/jbc.M807530200.

Brouwers N, Sleegers K, Engelborghs S et al. (2006) Genetic risk and transcriptional variability of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. Brain. doi: https://doi.org/10.1093/brain/awl212

Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T et al. (2007) MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. Proc Natl Acad Sc. USA. doi: 10.1073/pnas.0705917104

Czauderna F, Fechtner M, Dames S et al. (2003) Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. Nucleic Acids Res. doi: https://doi.org/10.1093/nar/gkg393

Delay C, Mandemakers W, Hebert SS. (2012) MicroRNAs in Alzheimer's disease. Neurobiol Dis. doi: 10.1016/j.nbd.2012.01.003.

Fenske DB, Chonn A, Cullis PR. (2008) Liposomal nanomedicines: an emerging field. Toxicol Pathol. doi: 10.1177/0192623307310960

Fillit H, Ding WH, Buee L et al. (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. Neurosci Lett. doi: 10.1016/0304-3940(91)90490-K.

Frozza RL, Lourenco MV, De Felice FG. (2018) Challenges for Alzheimer's disease therapy: insights from novel mechanisms beyond memory defects. Front. Neurosci. doi: 10.3389/fnins.2018.00037

Fu Y, Chen J, Huang Z. (2019) Recent progress in microRNA-based delivery systems for the treatment of human disease. ExRNA. doi: https://doi.org/10.1186/s41544-019-0024-y

Griffin WS, Nicoll JA, Grimaldi LM et al. (2000) The pervasiveness of interleukin-1 in Alzheimer pathogenesis: A role for specific polymorphisms in disease risk. Exp Gerontol. doi: https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00110-8

Hébert SS, Horré K, Nicolaï L et al. (2008) Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. Proc Natl Acad Sci USA. doi: https://doi.org/10.1073/pnas.0710263105

Hébert SS, Horré K, Nicolaï L et al. (2009) MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression. Neurobiol Dis. doi: 10.1016/j.nbd.2008.11.009

Kou X, Chen D, Chen N. (2020) The regulation of microRNAs in Alzheimer's disease. Front Neurol. doi: 10.3389/fneur.2020.00288

Lee K, Kim H, An K et al. (2016) Replenishment of microRNA-188-5p restores the synaptic and cognitive deficits in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. Sci Rep. doi: 10.1038/srep34433

Lin Q, Chen J, Zhang Zh et al. (2008) Lipid-based nanoparticles in the systemic delivery of siRNA. Nanomedicine. doi: https://doi.org/10.2217/nnm.13.192

Long JM, Lahiri DK. (2011) MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid-beta precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. Biochem Biophys Res Commun. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.053

Losurdo M, Grilli M. (2020) Extracellular vesicles, influential players of intercellular communication within adult neurogenic niches. Int J Mol Sci doi: https://doi.org/10.3390/ijms21228819

Lukiw WJ. (2007) Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. Neuroreport. doi: 10.1097/WNR.0b013e3280148e8b

Lukiw WJ, Alexandrov PN. (2012) Regulation of complement factor H (CFH) by multiple miRNAs in Alzheimer's disease (AD) brain. Mol Neurobiol. doi: 10.1007/s12035-012-8234-4

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. doi: 10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2016.11.011..

Patel N, Hoang D, Miller N et al. (2008) MicroRNAs can regulate human APP levels. Mol Neurodegeneration. doi: 10.1186/1750-1326-3-10

Pillai RS. (2005) MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? RNA. doi:10.1261/rna.2248605

Rajagopalan LE, Westmark CJ, Jarzembowski JA et al. (1998) HnRNP C increases amyloid precursor protein (APP) production by stabilizing APP mRNA. Nucleic Acids Res. doi: https://doi.org/10.1093/nar/26.14.3418

Rajagopalan LE, Malter JS. (2000) Growth factor-mediated stabilization of amyloid precursor protein mRNA is mediated by a conserved 29-nucleotide sequence in the 3'-untranslated region. J Neurochem. doi: https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0740052.x

Ramser EM, Gan KJ, Decker H et al. (2013) Amyloid-β oligomers induce tau-independent disruption of BDNF axonal transport via calcineurin activation in cultured hippocampal neurons. Mol Biol Cell. doi: 10.1091/mbc.e12-12-0858

Reddy PH, Tonk S, Kumar S et al. (2017) A critical evaluation of neuroprotective and neurodegenerative MicroRNAs in Alzheimer's disease. Biochem Biophys Res Commun. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.067

Redis RS, Calin S, Yang Y et al. (2012) Cell-to-cell miRNA transfer: from body homeostasis to therapy. Pharmacol Ther. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.08.003

Rodriguez-Ortiz CJ, Baglietto-Vargas D, Martinez-Coria H et al. (2014) Upregulation of miR-181 decreases c-Fos and SIRT-1 in the hippocampus of 3xTg-AD mice. J Alzheimers Dis. doi: 10.3233/JAD-140204

Rogers JT, Leiter LM, McPhee J et al. (1999) Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is upregulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. J Biol Chem. doi: 10.1074/jbc.274.10.6421

Rumble B, Retallack R, Hilbich C et al. (1989) Amyloid a4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. N Engl J Med. doi: 10.1056/NEJM198906013202203

Schipper HM, Maes OC, Chertkow HM et al. (2007) MicroRNA expression in Alzheimer blood mononuclear cells. Gene Regulation and Systems Biology. doi: https://doi.org/10.4137/GRSB.S361

Sleegers K, Brouwers N, Gijselinck I et al. (2006) APP duplication is sufficient to cause early onset alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. Brain. doi: https://doi.org/10.1093/brain/awl203

Sokolik VV, Berchenko OG, Shulga SM. (2017) Comparative analysis of nasal therapy of curcumin soluble and liposomal forms of rats with model of Alzheimer's disease. J Alzheimer's Dis. Parkinsonism. doi: 1000357. 10.4172/2161-0460.1000357

Sokolik VV, Berchenko OG, Levicheva NO et al. (2008) Anti-amyloidogenic effect of MiR-101 in experimental Alzheimer's disease. Biotechnologia Acta. doi: https://doi.org/10.15407/biotech12.03.041

Song J, Lee JE. (2015) MiR-155 is involved in Alzheimer's disease by regulating T lymphocyte function. Front Aging Neurosci. doi: 10.3389/fnagi.2015.00061

Strauss S, Bauer J, Ganter U et al. (1992) Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients. Lab Invest. 66:223–230

Strillacci A, Griffoni C, Sansone P et al. (2009) MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. Exp. Cell. Res. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.12.010

Vilardo E, Barbato C, Ciotti M et al. (2010) MicroRNA-101 regulates amyloid precursor protein expression in hippocampal neurons. J Biol Chem. doi: 10.1074/jbc.M110.112664

Yingchoncharoen Ph, Kalinowski DS, Richardson DR. (2016) Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: What is available and what is yet to come. Pharmacological Reviews. doi: https://doi.org/10.1124/pr.115.012070

Zhang J, Hu M, Teng Z et al. (2014) Synaptic and cognitive improvements by inhibition of 2-AG metabolism are through upregulation of microRNA-188-3p in a mouse model of Alzheimer's disease. J Neurosci. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1165-14.2014

Надійшла в редакцію 13.07.21
Після доопрацювання 04.08.21
Прийнята до друку 18.11.21