

Вплив мікроРНК miR-101 на структурно-функціональну організацію циклу неспання–сон за умов амілоїдозу у щурів

В.В. Гейко, Н.О. Левічева, В.В. Соколік

ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України», Харків;
e-mail: nbi.inprn@ukr.net

Досліджували ефекти трансназального введення мікроРНК (miR-101) у ліпосомальній формі на структурно-функціональну організацію сну за умов моделювання хвороби Альцгеймера у щурів пізнього зрілого віку. Показано, що при експериментальному амілоїдозі курсове введення miR-101 сприяло суттєвому (у 22 рази) приросту тривалості фази глибокого повільнохвильового та двократному підвищенню продукції парадоксального сну, що супроводжувалося нормалізацією ритмічної організації циклу неспання–сон і відображало позитивну спрямованість цих ефектів на його якісні характеристики, ймовірно, зумовлену пригнічуючим впливом на синтез попередника β -амілоїдних пептидів. Отримані результати можуть свідчити про перспективність подальшого вивчення терапевтичного потенціалу miR-101.

Ключові слова: цикл неспання–сон; моделювання хвороби Альцгеймера; β -амілоїдний пептид; miR-101; трансназальне введення.

ВСТУП

Сучасна тенденція щодо збільшення частки осіб похилого віку у соціумі з прогнозованим її підвищенням до 71% до 2040 р. [1] неминуче призведе до збільшення контингенту з віковими захворюваннями, серед яких найбільш розповсюджена хвороба Альцгеймера (ХА) та пов'язані з нею когнітивні розлади і деменція. Все це зумовлює значну медико-соціальну проблему, що посилюється відсутністю дієвих методів лікування нейродегенеративних патологій [2]. Враховуючи те, що їхньому прогресуванню не вдається ефективно перешкоджати фармакологічними методами, особливої актуальності набуває розробка способів терапії на ранніх та доклінічних стадіях розвитку для уповільнення клінічної маніфестації захворювань. До одних з ранніх симптомів ХА належать більш виражені, ніж за умов нормального старіння, порушення сну [3], які суттєво можуть вплинути на розвиток інвалідизації пацієнтів [4, 5].

© В.В. Гейко, Н.О. Левічева, В.В. Соколік

Раніше за умов експериментального амілоїдозу у щурів пізнього зрілого віку нами було виявлено нейрофізіологічні показники порушень сну, які включають: критичне зниження представленості фази парадоксального сну у поєднанні з пролонгуванням латентного періоду і скороченням тривалості його першого епізоду, а також суттєве зменшення представленості стадії глибокого повільнохвильового сну з переважанням незавершених (неповних) циклів неспання–сон. Їх поява і подальше формування на початкових етапах моделювання ХА дали змогу розглядати ці показники як ранні прояви (або предиктори) розвитку нейродегенеративної патології, які підтверджують адекватність застосованої в роботі моделі [6].

Відомо, що мікроРНК, які являють собою клас регуляторних некодуючих РНК довжиною близько 22 нуклеотидів, є регуляторами профілів експресії генів у широкому спектрі біологічних процесів та забезпечують пост-транскрипційне блокування генів внаслідок

розпізнавання специфічних послідовностей у матричних РНК-мішенях. За нормальних умов багато мікроРНК широко і контролювано експресуються у нервовій системі, що підкреслює їх важливість для роботи мозку, а зміна регуляції генів може призводити до патології у вигляді порушень навчання, пам'яті та пізнання, а також розвитку психоневрологічних розладів. Відомо, що деякі мікроРНК експресуються в гіпокампі та неокортексі, що передбачає їх функціональне залучення до регуляторної мережі, яка забезпечує синаптичну пластичність і формування пам'яті. Активність мікроРНК безпосередньо пов'язана з патогенезом нейродегенеративних захворювань. Описано регуляцію синтезу протеїну – попередника β -амілоїдного пептиду (A β PP) за допомогою мікроРНК miR-101, яка модулює його експресію в культивованих нейронах, а пригнічення ендогенної miR-101 підвищує вміст A β PP *in vivo* [7]. Відповідно до цього та з урахуванням обґрунтованої експериментальними і клінічними дослідженнями думки про те, що для різноманітних груп фармакологічних препаратів і біологічно активних речовин трансназальний шлях введення за своєю ефективністю відповідає внутрішньовенному [8], було доцільним вивчення впливу miR-101 на структурно-функціональну організацію сну у тварин.

Метою нашої роботи було дослідження курсового інтраназального застосування ліпосомальної форми miR-101 на нейрофізіологічні особливості циклу неспання–сон у динаміці розвитку нейродегенеративної патології у щурів за умов моделювання ХА.

МЕТОДИКА

Усі процедури з експериментальними тваринами схвалені Комісією з питань етики та деонтології ДУ «Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України» і виконані відповідно до «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах (Київ, 2011),

«Порядку проведення науковими установами дослідів та експериментів на тваринах» (№ 249 від 01.03.2012), Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006).

Фізіологічний цикл неспання-сон вивчали за умов хронічного експерименту з використанням 15 нелінійних білих щурів-самців пізнього зрілого віку (від 15 до 16 міс), масою $384,0 \pm 25,0$ г, з моделлю ХА, які склали дві групи: I (n = 6) – без впливу miR-101; II (n = 9) – з курсовим трансназальним введенням miR-101.

Моделювання ХА здійснювали мікроін'єкційним введенням A β_{40} у гіпокамп у дозі 15 нмоль/л, об'ємом його агрегованої форми 10 мкл на тварину. Тривалість введення через голку хроматографічного шприця становила 5 хв, швидкість введення індивідуальної дози – 0,03 мкл/с. Для ін'єкцій застосовували A β_{40} -Human («China Peptides Co., Ltd», Китай) в ізотонічному розчині хлориду натрію (NaCl), який піддавали агрегуванню протягом однієї доби при 37 °С з наступним диспергуванням та стерилізацією ультразвуком безпосередньо перед введенням [9, 10]. Така модель ХА є загальноприйнятною, оскільки відтворює не лише провідний механізм амілоїдозу – токсичність агрегатів A β , але й симптоматику деменційного процесу при ХА у вигляді порушень мнестичних властивостей тварин і зниження пам'яті [11]. Використання A β_{40} , а не A β_{42} , можна пояснити тим, що хоча подовжений на 2 амінокислотні залишки A β і вважають більш специфічним маркером амілоїдозу [12], але в ЦНС A β_{40} утворюється більше, ніж A β_{42} [13], тому саме його агрегати мають токсичний вплив у нейрональних синапсах. До того ж ні A β_{40} , ні A β_{42} щурів не агрегують, тому в експериментальній моделі ХА були задіяні агрегати A β_{40} -Human [14].

МікроРНК miR-101 (ТОВ «NPF SINTOL», Росія) використовували у ліпосомальній формі (метод ліпідних плівок) [15]. За 10 сеансів введення кожна тварина дослідної групи отримувала $2,5 \cdot 10^{14}$ молекул miR-101,

об'єм разової порції ліпосомальної суспензії становив 20 мкл. Дослідження впливу саме miR-101 було обрано тому, що вона виступає ключовим оператором функції матричної РНК для АβPP. Внаслідок формування та подальшої деградації міжРНКового комплексу (miR-101+мРНК^{АβPP}) деактивується ця мРНК. Саме у такий спосіб miR-101 здатна пригнічувати синтез АβPP та амілоїдогенний процесинг. Курсове, тривалістю 10 днів, щоденне введення miR-101 починали з 8-ї доби після внутрішньогіпокампулярної ін'єкції Аβ₄₀.

Усіх дослідних тварин піддавали стереотаксичній операції з імплантації довгострокових електродів (ніхром у скляній ізоляції з діаметром неізолюваного кінчика 100 мк) у структури головного мозку згідно з їх координатами [16]: нюхові цибулини, мезенцефалічну ретикулярну формацію середнього мозку, гіпокамп (поле СА1), в який одночасно з цим вводили суспензію агрегатів Аβ₄₀. Стационарні сталеві міографічні електроди встановлювали у ділянці верхнього косоного м'яза шиї. Кіркові ніхромові електроди розташовували епідурально в лобно-скроневої зоні мозку, індіферентний – у кістці носової пазухи. Операції здійснювали за стерильних умов у стані загального наркозу тварин (тіопентал натрію внутрішньоочеревино в дозі 50 мг/кг).

Поліграфічну реєстрацію сну проводили у період помірної емоційної активності щурів (з 10.00 до 15.00) за умов природної освітленості [17]. Електроенцефалограми (ЕЕГ) та міограми у біполярних відведеннях записували з використанням діагностичного комплексу «Нейрон-Спектр» на 7, 21 і 28-му добу після нейрохірургічного втручання, пов'язаного з моделюванням ХА. З урахуванням поведінкових, електроенцефалографічних та електроміографічних характеристик ідентифікували неспання, фази повільнохвильового і парадоксального сну. Разом з візуальним аналізом електрографічних показників циклу неспання-сон, визначали їх відсотковий вміст. На основі побудови циклограм сну враховували кількість неповних (редукова-

них, позбавлених фази парадоксального сну) циклів від їх загальної кількості.

Статистичну обробку результатів для визначення вірогідності відмінностей між групами порівняння проводили із застосуванням програми «Excel» (непараметричний критерій t Стьюдента), а також програми «Graph».

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті аналізу структурно-функціональної організації циклу неспання-сон за умов формування експериментальної ХА, яка характеризується скороченням стадії глибокого повільнохвильового сну у поєднанні з дефіцитом фази парадоксального, було виявлено певні ефекти впливу miR-101 на їх кількісну представленість (рис. 1).

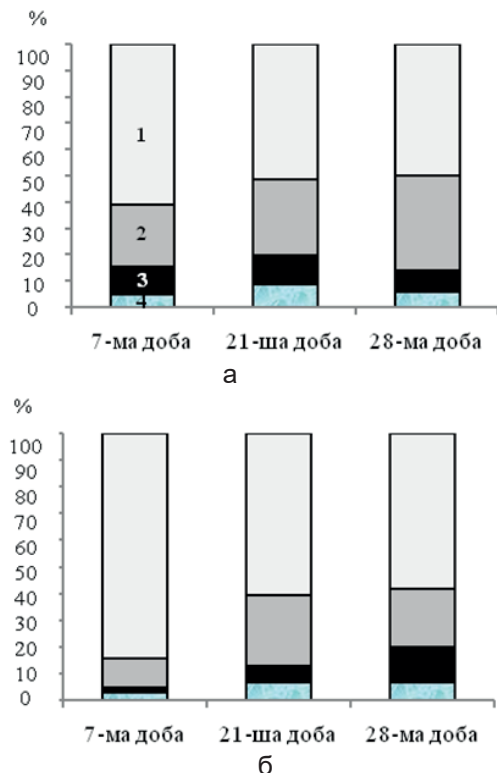


Рис. 1. Вплив курсового введення miR-101 на структурну організацію циклу неспання-сон у щурів за умов моделювання хвороби Альцгеймера: а – у процесі стабілізації моделі, б – у поєднанні з введенням miR-101; 1 – неспання, 2 – поверхневий повільний сон, 3 – глибокий повільний сон, 4 – парадоксальний сон

Слід відмітити чималий (194% до 28-ї доби спостережень) сумарний приріст представленості стадій повільнохвильового поверхневого і глибокого сну у тварин, які отримували miR-101, на відміну від щурів без впливу, у яких стабілізація моделі ХА супроводжувалася помірним (в середньому на 20%) збільшенням фази повільнохвильового сну (див. рис. 1; 2, а). Десятиразове інтраназальне введення ліпосомальної форми miR-101 сприяло значному зростанню представленості стадії глибокого повільного сну у тварин з ХА (див. рис. 2, б), моделювання якої призводило до пригнічення його генерації на 28% до 28-ї доби після внутрішньогіпокампулярної ін'єкції агрегованого $A\beta_{40}$, разом з тим продукція парадоксального сну мала тенденцію до помірного зростання незалежно від групи (див. рис. 2, в).

Таким чином, показано, що за умов моделювання амілоїдозу курсове введення ліпосомальної форми miR-101 сприяє суттєвому приросту тривалості фаз і стадій повільнохвильового і парадоксального сну в динаміці експериментальної ХА у щурів. Найбільш виражений позитивний ефект (у 9 і 22 рази відповідно на 21-шу і 28-му добу спостережень) відзначається відносно представленості глибокого повільного сну, що характеризується мінімальними значеннями на 28-му добу розвитку ХА.

Беручи до уваги отримані нами раніше дані [6] про істотне скорочення стадії глибокого повільного сну як корелята формування нейродегенеративної патології при ХА, а також сучасні уявлення про його «дренажну» функцію [18], такі результати можуть свідчити на користь терапевтичної спрямованості ефектів miR-101, котрі, зокрема, сприяють пригніченню підвищеної продукції $A\beta$ з його попередника та токсичності агрегатів останнього. Враховуючи літературні відомості щодо суттєвої ролі фази парадоксального сну у забезпеченні ризику розвитку деменцій [19, 20], а також його системоутворюючої функції в організації циклу неспання–сон,

доцільним є дослідження ритмічної організації сну у вигляді завершених і незавершених циклів у напрямку вивчення ефектів, яким властивий терапевтичний потенціал.

Ми виявили, що курсове введення miR-101 у тварин з ХА супроводжується скорочен-

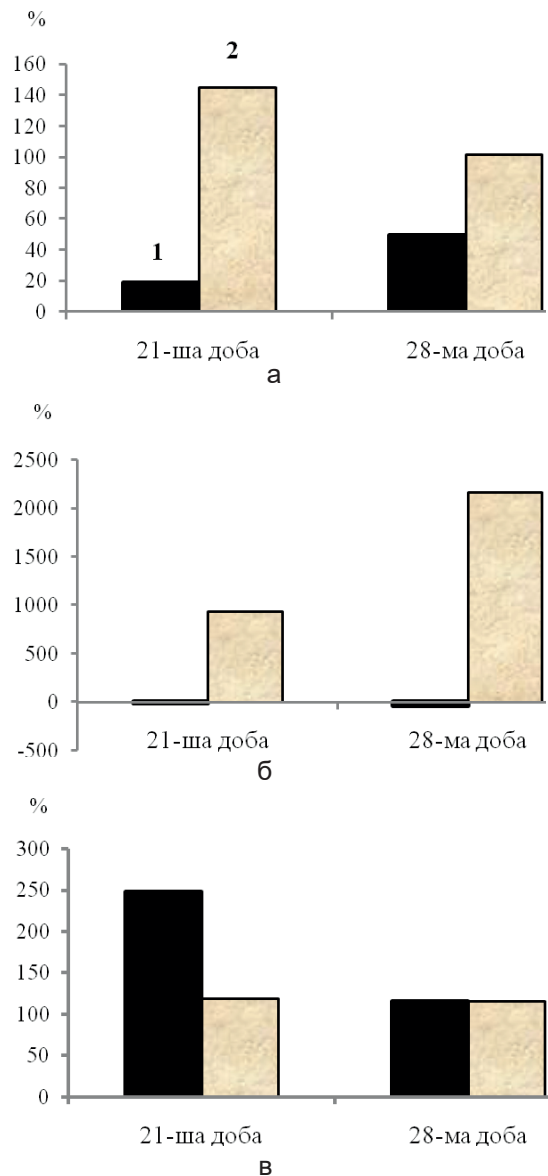


Рис. 2. Вплив трансназального введення miR-101 на динаміку представленості повільнохвильового і парадоксального сну у структурі циклу неспання–сон у щурів за умов моделювання хвороби Альцгеймера відносно 7-ї доби (100%): а – поверхневий повільний сон, б – глибокий повільний сон, в – парадоксальний сон; 1 – без введення miR-101, 2 – курсове введення miR-101

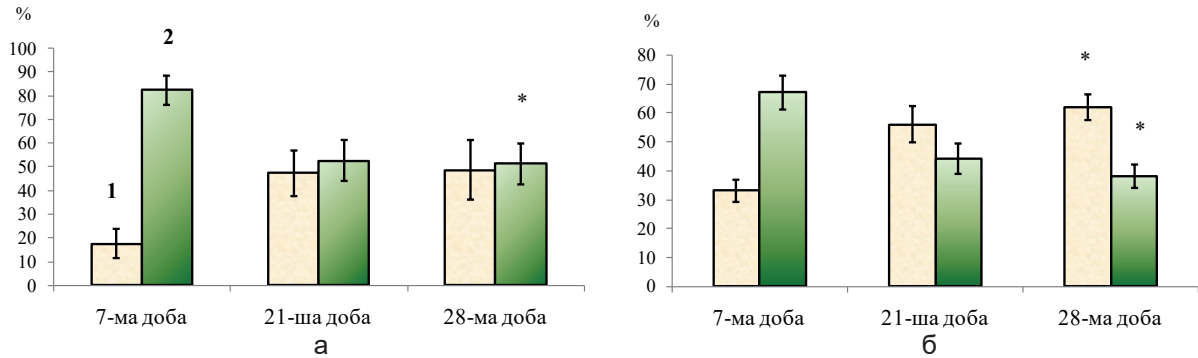


Рис. 3. Вплив miR-101 на ритмічну організацію сну в динаміці розвитку експериментальної хвороби Альцгеймера: а – без введення miR-101, б – введення miR-101; 1 – повний цикл, 2 – неповний цикл; *P < 0,05 порівняно зі значеннями на 7-му добу

ням кількості редукованих циклів, майже до нормалізації показників цієї базальної характеристики сну, які відповідають значенням інтактних тварин відповідного віку (рис. 3)

[6]. Така динаміка відображена в циклограмах сну, які наочно демонструють позитивний вплив miR-101 на його якісні характеристики (рис. 4).

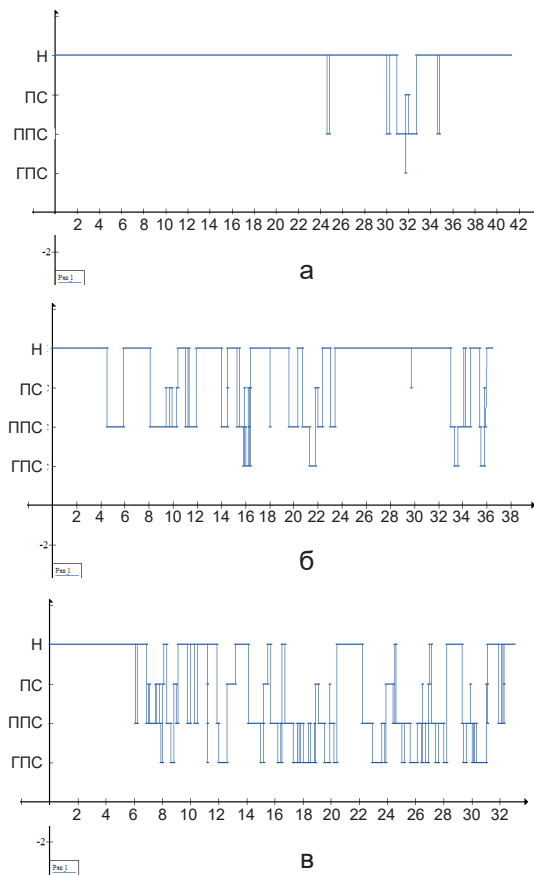


Рис. 4. Вплив miR-101 на циклічну організацію сну за умов експериментальної хвороби Альцгеймера (тварина № 2). За віссю абсцис – тривалість сну, с; за віссю ординат – фази і стадії сну (Н – неспанья, ППС – поверхневий повільний сон, ГПС – глибокий повільний сон, ПС – парадоксальний сон); а–в – 7, 21, 28-ма доба після моделювання хвороби відповідно

Отже, результати порівняльного аналізу структурно-функціональної і ритмічної організації циклу неспання-сон за умови моделювання ХА введенням агрегованого $A\beta_{40}$ дають можливість зробити висновок щодо певної нормалізуючої спрямованості впливів курсового введення miR-101, що, ймовірно, має превентивний блокуючий характер внаслідок зниження експресії $A\beta$ PP, тим самим перешкоджаючи амілоїдогенезу та уповільнюючи нейрозапальні процеси, які призводять до розвитку і прогресування нейродегенеративної патології [21].

ВИСНОВОК

За умов експериментальної ХА курсове введення ліпосомальної форми miR-101 позитивно впливає на ритмічну та структурно-функціональну організацію циклу неспання–сон у вигляді скорочення кількості його редукованих циклів та значного збільшення представленості повільно-хвильової фази, особливо істотно (у 22 рази) – стадії глибокого повільного сну. Така нормалізуюча спрямованість ефектів впливу miR-101 може свідчити про перспективність вивчення її терапевтичного потенціалу.

Автори виражають щире вдячність О.В. Кириченко за активну практичну участь у підборі, життєвому забезпеченні та ідеальному догляді за експериментальними тваринами, а також – ілюстративному оформленні статті.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

В. В. Гейко, Н. А. Левичева, В. В. Соколик

ВЛИЯНИЕ МИКРОРНК MIR-101 НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ЦИКЛА БОДРСТВОВАНИЕ-СОН В УСЛОВИЯХ АМИЛОИДОЗА У КРЫС

Исследовали эффекты трансназального введения микроРНК (miR-101) в липосомальной форме на структурно-функциональную организацию сна в условиях моделирования болезни Альцгеймера у крыс позднего зрелого возраста. Показано, что при экспериментальном амилоидозе курсовое введение miR-101 способствует существенному (в 22 раза) приросту продолжительности фазы глубокого медленноволнового и двукратному повышению продукции парадоксального сна, что сопровождается нормализацией ритмической организации цикла бодрствование-сон и отражает положительную направленность этих эффектов на его качественные характеристики, вероятно, обусловленную угнетающим влиянием на синтез предшественника β -амилоидных пептидов. Полученные результаты могут свидетельствовать о перспективности дальнейшего изучения терапевтического потенциала miR-101.

Ключевые слова: цикл бодрствование–сон; моделирование болезни Альцгеймера; β -амилоидный пептид; miR-101; трансназальное введение.

V. V. Geyko, N. A. Levicheva, V. V. Sokolik

INFLUENCE OF MICRORNA MIR-101 ON THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF THE WAKE-SLEEP CYCLE UNDER AMYLOIDOSIS IN RATS

SI «Institute of Neurology, Psychiatry and Narcology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv; e-mail: nbi.inpn@ukr.net

The effects of transnasal introduction of microRNA (miR-101) in liposomal form on the structural and functional organization of sleep were investigated under conditions of modeling Alzheimer's disease in rats of late adulthood. It is shown that in experimental amyloidosis, course administration of miR-101 promotes a significant (22-fold) increase in the duration of the deep slow-wave phase and a two-fold increase in the production of paradoxical sleep that is accompanied by a normalization of the rhythmic organization of the wake-sleep cycle and reflects the positive direction of these effects on its qualitative characteristics, probably, due to the inhibitory effect on the synthesis of the precursor of β -amyloid peptides. The results obtained may indicate the prospects for further study of the therapeutic potential of miR-101.

Key words: wake-sleep cycle; modeling of Alzheimer's disease; β -amyloid peptide; miR-101; transnasal introduction.

REFERENCES

1. World Alzheimer Report (URL: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>).

2. Illarionov SN. Early diagnosis of neurodegenerative diseases. *Nerves*. 2008;1:11-3. [Russian].
3. Mander BA, Winer JR, Jagust WJ, Walker MP. Sleep: a novel mechanistic pathway, biomarker and treatment target in the pathology of Alzheimer's disease? *Trends Neurosci*. 2016;39,8:552-66.
4. Romanov AL, Kallistov DYU. Role of the systematic complications of obstructive sleep apnea in the development of cardiovascular pathology. *Fiziol Zh*. 2011;57(5):70-2. [Ukrainian].
5. Kostyuk OP, Korol' TYu, Korol' SV, Romanenko SV, Pinchenko VO, Kostyuk PH. Alteration of calcium signaling as one of the mechanisms of Alzheimer disease and diabetic polyneuropathy. *Fiziol Zh*. 2010;56(4):130-8. [Ukrainian].
6. Geyko VV, Berchenko OG, Levicheva NA, Sokolik VV. Characteristics of wakefulness-sleep cycle organization under Alzheimer's disease modeling in rats. *Fiziol Zh*. 2020;66,1:75-82. [Ukrainian].
7. Bilen J, et al. MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration. *Mol Cell*. 2006;24:157-63.
8. Makarenko AN, Grigorieva TI, Kaluev AB. Morphofunctional features of the organization of olfactory analyzer and the problem of axonal transport of matter. *Neurosciences*. 2006;2(4):18-28. [Russian].
9. Perelman MI, Moiseev VS. Bactericidal action of ultrasound. *Problems of technology in medicine*. Taganrog, 1980:38-41. [Russian].
10. Akopyan VB. Basics of ultrasound interaction with biological objects: *Ultrasound in Medicine, Veterinary Medicine and Experimental Biology*. Moscow: MSTU named after N. E. Bauman, 2005. [Russian].
11. Sokolik VV, Maltsev AV. Cytokines neuroinflammatory reaction to β -amyloid 1-40 action in homoaggregatic and liposomal forms in rats. *Biomed Chem*. 2015;9(4):220-5.
12. Hampel H, et al. Biological markers of amyloid β -related mechanisms in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2010;223(2):334-46.
13. Gu L, Guo Z. Alzheimer's A β 42 and A β 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J Neurochem*. 2013;126(3):305-11.
14. Gremer L, et al. Fibril structure of amyloid- β (1-42) by cryo-electron microscopy. *Science*. 2017;358:116-9.
15. Shulga SM. Obtaining and characteristic of curcumin liposomal form. *Biotechnol Acta*. 2014;7:55-61.
16. Buresh Y, Petran M, Zakhar I. *Electrophysiological research methods*. 1962. [Russian].
17. Berchenko OG. Neurophysiological organization of cycle wakefulness-sleep at alcoholism of rats, formed in the different phases of emotional activity. *Physiol J USSR*. 1990;76,6:713-9. [Russian].
18. Nag S, et al. Chronic intracerebroventricular exposure to β -amyloid (1-40) impairs object recognition but does not affect spontaneous locomotor activity or sensorimotor gating in the rat. *Exp Brain Res*. 2001;136(1):93-100.
19. Madaeva IM, Berdina ON. Modern ideas of «slow sleep» and «ram sleep» and their role in pathogenesis of Alzheimer's disease (review of literature). *Acta Biomed Sci*. 2017;2,4:48-52.
20. Pase P, et al. Sleep architecture and the risk of incident dementia in the community. *Neurology*. 2017;89(12):1244-50.
21. Sokolik V, Berchenko O, Levicheva N, Shulga S. Anti-amyloidogenic effect of miR-101 in experimental Alzheimer's disease. *Biotechnol Acta*. 2019;12,3:41-9.

*Матеріал надійшов
до редакції 04.09.2020*