
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ИНТРАНАЗАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ БЕЛКА GRP78 (HSPA5)
ПРОТИВОДЕЙСТВУЕТ ГИБЕЛИ НЕЙРОНОВ В ГОЛУБОМ ПЯТНЕ
В МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОЙ ДЕПРИВАЦИИ СНА У КРЫС**

© 2024 г. М. Б. Пази¹*, И. В. Екимова¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург,
Россия

* E-mail: pazimariia@gmail.com

Поступила в редакцию 13.06.2024 г.

После доработки 03.07.2024 г.

Принята к публикации 04.07.2024 г.

Хроническое недосыпание (сон менее 6 ч в сутки) в связи с производственной необходимостью и снижением качества сна является эндемическим заболеванием в современном обществе. Хроническое недосыпание вызывает серьезные нейрорегенеративные нарушения, сопряженные с необратимыми нейродегенеративными изменениями в головном мозге. Поиск фармакологических агентов способных снизить риск развития нейродегенерации в результате хронической потери сна является актуальной задачей биомедицины. Интраназальное введение глюкозо-регулируемого белка теплового шока 78 кДа (GRP78) оказывает нейропротективный эффект в модели болезни Паркинсона у крыс. Нейропротективный потенциал интраназально введенного GRP78 при хроническом недосыпании ранее не исследовался. Задача исследования – выяснить, способно ли профилактическое интраназальное введение GRP78 ослабить и/или остановить процесс нейродегенерации в голубом пятне в модели хронического ограничения сна (ОС) у крыс. Исследование проведено на 6-месячных самцах крыс популяции Вистар. Для депривации сна был применен валидизированный метод качающейся платформы в режиме: 3 ч лишения сна и 1 ч покоя непрерывно в течение 5 суток. Рекомбинантный белок GRP78 человека вводили интраназально за два дня до начала ОС и в течение 5 суток ОС. Клеточно-молекулярные изменения в голубом пятне при ОС и при введении GRP78 исследовались с помощью иммуногистохимии и вестерн-блоттинга. Показано, что хроническое ОС приводит к гибели 30% норадренергических нейронов в голубом пятне, которое было сопряжено с повышением уровней активированных каспаз-3, 9. Это свидетельствует о развитии апоптоза по митохондриальному пути. Признаков реактивного микроглиоза не обнаружено в модели хронического ОС у крыс. Мы продемонстрировали, что интраназально введенный GRP78 проникает и накапливается в норадренергических нейронах голубого пятна, это противодействует гибели нейронов по пути апоптоза. Полученные данные позволяют считать GRP78 потенциальным нейропротекторным средством для профилактики патологических последствий хронического недосыпания.

Ключевые слова: хроническое ограничение сна, голубое пятно, шаперон GRP78, HSPA5, нейродегенерация, апоптоз

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая инсомния (или хроническая бессонница) – наиболее распространенное нарушение сна, которое характеризуется недостаточным количеством или качеством сна. Патофизиология инсомнии может быть связана с экзогенными (нарушение гигиены сна) и эндогенными соматическими факторами (нейродегенеративные и психоневрологические заболевания, ожирение и др.) [1, 2]. До сих пор лечение инсомнии остается сложной проблемой, около 40% пациентов с хронической инсомнией не достигают стойкой ремиссии симптомов [1]. Распространенность хронической инсомнии в общей популяции составляет примерно 10% [3], при этом за последние десять лет синдром инсомнии, среди нарушений сна, возрос почти в два раза [4, 5]. Одной из причин такого роста может быть увеличение распространенности хронического недосыпания (сон < 7 ч в сутки) среди взрослого населения в связи с возросшими нагрузками на работе и экстремальным рабочим графиком, изменением образа жизни современного постиндустриального общества, который тесно связан с искусственным светом [6, 7]. Каждый 10-й человек в современном обществе испытывает симптомы недосыпания на себе. Помимо возникающей на фоне хронического недосыпа дневной сонливости, депривация сна приводит к развитию когнитивного дефицита (нарушение внимания, обучения, пространственной памяти) [8] и психоэмоциональных нарушений [9, 10]. Ранее считалось, что нейроповеденческие нарушения после потери сна устраняются после нескольких ночей восстановительного сна, однако ряд проведенных на добровольцах исследований показывает, что они сохраняются даже после периода восстановления [11–13].

Это указывает на серьезные функциональные нарушения в ЦНС и сигнальных системах, которые в настоящий момент остаются недостаточно изученными. Кроме того, до сих пор не выявлены регуляторные механизмы противодействия функциональным нарушениям, что подчеркивает необходимость дальнейших исследований в этом направлении. В свою очередь эпидемиологические данные показывают, что хроническое недосыпание предрасполагает к развитию метаболических, сердечно-сосудистых заболеваний, воспаления, снижения иммунитета и является фактором риска нейродегенеративных расстройств [14–16]. Исследования на животных показывают, что хроническое ограничение сна (ОС) вызывает гибель орексинергических нейронов [17] и необратимые нейродегенеративные изменения в голубом пятне и гиппокампе CA1, структурах мозга, наиболее активных во время бодрствования и уязвимых к болезням Альцгеймера и Паркинсона (БП) [16, 18]. В животных моделях ограничения сна также отмечается дефицит пространственной памяти, который сопряжен с развитием нейровоспаления и увеличением уровня амилоидного пептида Abeta 42 и гиперфосфорилированного таубелка в гиппокампе [16]. Считается, что одной из причин развития нейродегенерации при хронической депривации сна являются метаболические повреждения нейронов, индуцированные длительным бодрствованием [17, 18]. Среди них – норадренергические (НА) нейроны голубого пятна, которые включены в механизмы поддержания бодрствования. Эти нейроны показывают высокий уровень активности в течение всего периода бодрствования, в то же время их импульсная активность значительно снижается во время медленноволнового сна (МВС) и приближается к состоянию покоя в фазе парадоксального сна (ПС) [19]. Избыточная активность НА-ергических нейронов во время длительного бодрствования делает их уязвимыми к метаболическим потребностям непрерывного бодрствования, из-за нехватки АТФ развивается митохондриальная дисфункция, нарушается окислительно-восстановительный гомеостаз [18]. Все это сопровождается неизбежным образованием активных форм кислорода, что приводит к окислению биомолекул, нарушению их конформации, утрате их функциональных свойств. Большая часть синтеза и фолдинга белков у млекопитающих происходит в просвете эндоплазматического ретикулума (ЭР). Накопление aberrантных и неправильно свер-

нутых белков в ЭР вызывает стресс ЭР [20, 21]. Стресс ЭР направлен на восстановление белкового гомеостаза. Однако, если стресс является длительным или превышает адаптивные возможности клетки, то активируются сигнальные каскады стресса ЭР, направленные на апоптоз. Предыдущие исследования показали, что острая депривация сна (6 ч) приводит к активации адаптивного каскада стресса ЭР в коре головного мозга мышей [22]. Не исключено, что в случае длительной стресс-реакции в результате хронического недосыпания, стресс ЭР может развиваться по апоптотическому пути и вносить существенный вклад в развитие нейродегенерации.

Мобилизация системы глюкозо-регулируемого белка теплового шока 78 кДа (GRP78), также известного как BiP (Binding immunoglobulin protein), является одним из молекулярных механизмов клеточной защиты от «неправильных» белков и связанным с ними стресса ЭР. GRP78 – это многофункциональный белок, который участвует в широком спектре процессов сворачивания и рефолдинга белковых молекул, протеасомной деградации неправильно свернутых белков, поддержании гомеостаза кальция и регуляции клеточного ответа стресса ЭР [23]. Нейропротективные свойства GRP78 и его способность предотвращать развитие стресса ЭР по апоптотическому пути выявлены в животных моделях старческой дегенерации сетчатки глаза, ишемии головного мозга и α -синуклеиновой патологии [24]. Кроме того, в нашей лаборатории показано, что рекомбинантный белок человека GRP78, введенный интраназально, проникает в мозг и противодействует развитию нейродегенерации и активации апоптотической ветви стресса ЭР в нигростриатной системе в модели доклинической стадии БП у крыс [25]. Нейропротективный потенциал интраназально введенного GRP78 при хроническом недосыпании ранее не исследовался.

Задача исследования – выяснить, способно ли профилактическое интраназальное введение рекомбинантного белка GRP78 ослабить и/или остановить процесс нейродегенерации в голубом пятне в модели хронической депривации сна у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В работе использованы самцы крыс популяции Вистар (6-месячные животные, 250–300 г). До эксперимента крыс содержали в стандартных условиях вивария Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН по 5 самцов в клетке. На адаптационный период (7 дней) и на время эксперимента животных перемещали в комнату с временным контролем фотопериода 12:12 ч (10:00–22:00 – свет), где они содержались в одиночных клетках со свободным доступом к воде и пище и температурой воздуха 23 ± 1 °C.

Создание модели хронической депривации сна

Для создания модели хронического недостатка сна был применен метод циклического ограничения сна, ранее разработанный в лаборатории [26]: чередование 3 ч депривации сна и 1 ч покоя в течение 5 суток непрерывно. Ограничение времени сна было достигнуто с помощью помещения клетки с животным на качающуюся платформу орбитального шейкера S-3.02L.A20 («ELMI», Латвия), которая вращалась с частотой 170–180 оборотов/мин. В периоды покоя орбитальный шейкер автоматически останавливался. Депривация сна у крыс с помощью качающейся платформы эффективно ограничивает время МВС и полностью устраняет ПС [26]. В контрольной группе животных содержали в клетках на не включенном шейкере, где сон был неограничен. До начала эксперимента всех животных адаптировали к работе шейкера, помещая клетку с крысой на качающуюся платформу на 20 мин в светлую фазу суток в течение двух дней. В контрольной и экспериментальной группах было по 5 животных.

Интраназальное введение GRP78

Рекомбинантный белок GRP78 человека (Sigma, США) растворяли в стерильном апиогенном фосфатном буфере pH 7.4 (PBS). Крысу укутывали в полотенце и укладывали на спину так, чтобы зафиксировать положение головы под углом 40° – 45° относительно горизонтальной плоскости. GRP78 (0.6 мкг/12 мкл) вводили в каждую ноздрю с помощью микропипетки (JET BIOFIL®, Корея) по каплям, 2–3 мкл в момент вдоха. Такой способ введения предотвращал стекание белка в носоглотку, а также позволял избежать механического воздействия на обонятельный эпителий. Контрольная группа животных получала эквивалентный объем растворителя GRP78, PBS.

GRP78 вводили за два дня до начала ОС, а также ежедневно на протяжении всего ОС до начала светового дня (в промежутке 9:00–10:00 утра). Контрольная группа животных получала растворитель GRP78 (PBS) по аналогичной схеме. GRP78 также вводили intactным животным, не подвергавшимся ОС (рис. 1).

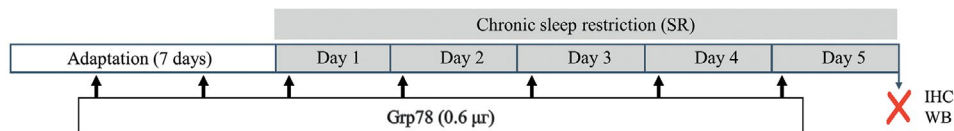


Рис. 1. Схема эксперимента. Adaptation (7 days) – адаптация животных в течение 7 дней. Chronic sleep restriction (SR) – хроническое ограничение сна. Day 1–5 – 1–5 сутки ограничения сна. IHC – immunohistochemistry, взятие биоматериала головного мозга для иммуногистохимического анализа. WB – western-blot, взятие биоматериала головного мозга для вестерн-блоттинга анализа.

Иммуногистохимическое исследование

Сразу после окончания процедуры депривации сна крыс наркотизировали (Zoletil®; внутримышечно, 75 мг/кг) и декапитировали. Мозг извлекали и разделяли пополам: одна половина использовалась для проведения иммуногистохимического исследования, вторая половина – для вестерн-блоттинга.

Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования головной мозг фиксировали в 4%-ном растворе параформальдегида (4°C). Через несколько дней мозг промывали в PBS, переносили на 6 суток в 20%-ный раствор сахарозы для криопротекции, а затем замораживали в охлажденном (-45°C) изобутане.

Для подсчета количества выживших НА-ергических нейронов голубого пятна был использован биотин-стрептавидиновый метод окраски. Серия срезов голубого пятна (20 мкм) была получена с помощью криостата Leica CM-1520 («Leica Biosystems», Нуссloch, Германия) в соответствии с атласом мозга [27]. 10–12 чередующихся серий срезов помещали на предметные стекла SuperFrost Plus Adhesion («Gerhard Menzel GmbH», Брауншвейг, Германия) и хранили при температуре -22°C .

Перед началом окраски срезы высушивали при комнатной температуре в течение суток. Перед инкубацией с первичными антителами срезы трижды помещали в PBS на 10 мин, а затем в цитратный буфер (96 – 98°C ; pH 6.0) для демаскирования антигенов. Для гашения активности эндогенной пероксидазы срезы выдерживали в 10%-ном растворе метанола на PBS с добавлением 3% H_2O_2 в течение 20 мин; трижды промывали в PBS и помещали на 1 ч при комнатной температуре в блокирующий раствор (4% сыворотки козы (Sigma, США), 0.01% Tween-20 на PBS). Далее срезы инкубировали в течение 24 ч с антителами против тирозингидроксилазы (ТГ) (1: 900; Abcam, Великобритания), GRP78 (1: 400, Affinity Biosciences, Китай) и маркера микроглии

Iba-1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) (1:500; Novus Biologicals, США) при комнатной температуре. На следующие сутки срезы последовательно инкубировали со вторичными биотинилированными антителами козы против кролика (1:400 Vector Laboratories, США) и стрептавидинпероксидазой (1:250; Vector Laboratories, США). Реакции визуализировали с использованием 3,3-диаминобензидина (Sigma-Aldrich, США) в качестве хромогена.

Дополнительно стекла со срезами голубого пятна были окрашены по методу Ниссля. Для этого срезы помещали в 96%-ный этиловый спирт на 48 ч для обезжиривания. Затем трижды промывали дистиллированной водой и помещали в 1%-ный раствор толуидинового синего на 3–5 мин при 37 °С. После окраски срезы промывали дистиллированной водой и выдерживали последовательно в 70%- и 96%-ном этиловом спирте для дифференциации окраски под зрительным контролем с использованием светового микроскопа Leica. Далее фиксировали в ксилоле и заключали под покровное стекло с помощью среды BioMount (Италия). Окрашенные срезы хранили при комнатной температуре в недоступном для света месте.

Изображения окрашенных срезов голубого пятна получали на микроскопе Zeiss Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) со встроенной камерой и программным обеспечением Axio-Vision 4.8. Количественный анализ проводили с использованием 10–12 срезов от каждого экспериментального животного, разнесенных примерно на 70 мкм. Количество клеток подсчитывали для стандартного участка ткани, полученного камерой светового микроскопа с использованием объектива $\times 20$ – 697×523 мкм. Количество Iba- и ТГ-иммунореактивных клеток, и окрашенных по методу Ниссля, подсчитывали вручную и выражали как среднее количество клеток микроглии и нейронов на срезе голубого пятна. Оптическую плотность, отражающую содержание GRP78-иммунопозитивного вещества, рассчитывали как разницу между интенсивно окрашенными нейронами, содержащими иммунореактивное вещество, и интенсивностью фоновой окраски (не содержащей иммунореактивного вещества) на одном и том же участке. Результаты были представлены в относительных единицах оптической плотности.

Анализ проводился с использованием программы PhotoM 1.21 (http://www.t_lambda.chat.ru/), полученные данные представляли как среднее количество положительно окрашенных клеток структуры $\pm$ ошибка среднего.

Вестерн-блоттинг

Для оценки содержания белков-маркеров развития апоптоза в голубом пятне применяли метод вестерн-блоттинг. После окончания процедуры депривации сна крыс наркотизировали (Zoletil®; внутримышечно, 75 мг/кг), извлекали головной мозг и выделяли голубое пятно согласно стереотаксическому атласу мозга крысы [27]. Образцы ткани замораживали при -80 °С. Затем образцы тканей голубого пятна гомогенизировали в буфере для лизиса (20 mM Трис–HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5% Triton X-100; 2 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и коктейля ингибиторов фосфатаз (Roche, Базель, Швейцария). После центрифугирования при 5500 g в течение 10 мин супернатант отбирали в эппендорф и использовали для дальнейшего анализа. Супернатант смешивали с загрузочным буфером (0.0625 M Трис–HCl, pH 6.8; 10% глицерина; 2% SDS; 0.1 mM ЭДТА; 0.006% бромфенолового синего; 10% β -меркаптоэтанола) и нагревали при 95 °С в течение 7 мин. Аликвоты равного объема помещали в 11%-ный полиакриламидный гель и разделяли электрофорезом в камере Mini-Protean (Bio-Rad, США). Затем белковые бэнды переносили на поливинилхлоридные (ПВДФ, PVDF) мембраны (размер пор 0.2 мкм; BioRad, США) с помощью устройства TransBlot (BioRad, США).

Полученные мембраны помещали на 1 ч в сыывороточный блок (PBS с добавлением 0.1% Tween-20 и 3% BSA или PBS с добавлением 0.1% Tween-20 и 5% обезжиренного сухого молока) для предотвращения неспецифичного связывания. Затем мембраны инку-

бировавали при 4 °C в течение 12 ч в растворе первичных поликлональных антител против расщепленной каспазы-9 (Asp353) (1:1000, Affinity Biosciences, Китай), расщепленной каспазы-3 (Asp175) (1:1000, Affinity Biosciences, Китай), или β -актина (1:1000, Santa Cruz, США). На следующий день мембраны трижды промывали в PBS с добавлением Tween-20 и инкубировали при комнатной температуре с раствором вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:10000, HRP-goat-anti-rabbit IgG или HRP-donkey-anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch Europe Ltd). Белковые бэнды визуализировали с использованием набора для анализа хемилюминесцентного субстрата Novex ECL HRP (Invitrogen, США) и тепловизора ChemiDoc MP (Bio-Rad, США).

Денситометрический анализ проводился с использованием программного обеспечения ImageJ 1.8 (Национальный институт здравоохранения, NIH, США). Содержание белков было нормировано по сигналу контроля нагрузки, β -актина. Отношения оптической плотности бэндов исследуемых белков к общему содержанию белка сравнивались со средним значением в контрольной группе.

Статистический анализ данных

Данные, полученные в исследовании, статистически обрабатывали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8 (Калифорния, США). Нормальность распределения проверялась с помощью критерия Шапиро-Уилка. Сравнения между группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, с последующим Тьюки post-hoc или t -критерия Стьюдента. Межгрупповые различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$. Данные были представлены в виде графиков как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка, а также в виде индивидуальных значений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

GRP78, введенный интраназально, накапливается в нейронах голубого пятна

Недавно нами было показано, что рекомбинантный белок GRP78 человека, введенный интраназально, способен проникать в головной мозг и интернализироваться нейронами и микроглиями в контрольных условиях и в модели БП у крыс [25]. Экзогенный GRP78 обнаруживался в телах нейронов компактной части черной субстанции (кЧЧС), вентральной тегментальной области и голубом пятне через 3 ч после его введения.

В этом исследовании, для того чтобы оценить, насколько активно экзогенный GRP78 интернализуется нейронами голубого пятна, мы окрасили срезы головного мозга антителами против GRP78 и оценили содержание GRP78 в нейронах голубого пятна у животных, получавших интраназально GRP78, а также у животных с введением PBS вместо GRP78. Проведенный анализ показал, что через 3 ч после введения GRP78 его содержание возрастает в 1.4 раза (0.148 ± 0.01 , $n = 3$, $p = 0.01$) в нейронах голубого пятна по сравнению с контролем (0.107 ± 0.01 , $n = 3$) (рис. 2). Можно ожидать, что такого повышения уровня GRP78 будет достаточно для реализации его нейропротективного потенциала.

Введение экзогенного GRP78 препятствует гибели нейронов голубого пятна в модели хронического ограничения сна у крыс

Для того чтобы оценить повреждающий эффект хронического недосыпания на нейроны голубого пятна у крыс было проведено иммуногистохимическое исследование с применением антител против ТГ (маркер живых НА-ергических нейронов), а также окрашивание по методу Ниссля. Выяснено, что ОС в течение 5 дней приводит к снижению количества ТГ-позитивных нейронов на 30% (53 ± 7 , $n = 5$, $p < 0.001$) (рис. 3а, б) по сравнению с контролем (77 ± 6 , $n = 5$). Схожие данные были получены при оценке

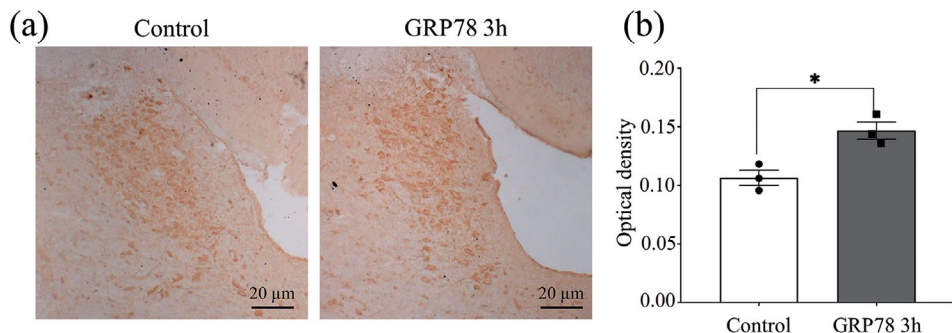


Рис. 2. Экзогенный GRP78, введенный интраназально, накапливается в нейронах голубого пятна у крыс в контрольных условиях. (а) – репрезентативные микрофотографии голубого пятна. (б) – оптическая плотность нейронов голубого пятна. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего. Control – контрольные животные, получавшие растворитель GRP78, стерильный апиогенный фосфатный буфер pH 7.4 (PBS) ($n = 3$); Grp78 – животные, получавшие GRP78 интраназально ($n = 3$). Различия между группами в соответствии с t -критерием Стьюдента и указаны как * $p \leq 0.05$ по сравнению с группой контроля.

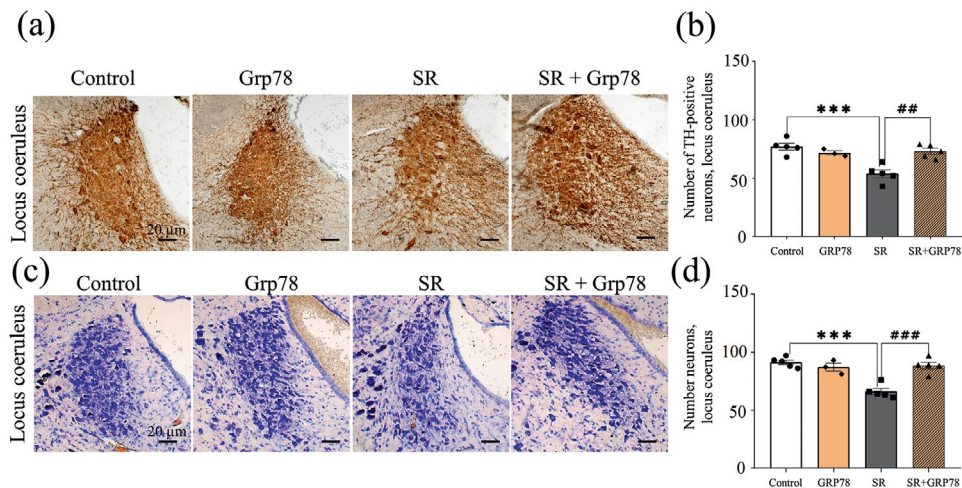


Рис. 3. Интраназальное введение экзогенного GRP78 препятствует дегенерации норадренергических нейронов голубого пятна в модели хронического ограничения сна. (а, с) – репрезентативные микрофотографии голубого пятна, (б) – количество ТГ-позитивных нейронов в голубом пятне, (д) – количество нейронов, окрашенных по методу Ниссля в голубом пятне. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего. Control – контрольные животные ($n = 5$), (Grp78) – введение Grp78 в контрольных условиях ($n = 3$), Sleep restriction (SR) – ограничение сна в течение 5 дней ($n = 5$), SR+Grp78 – введение Grp78 в модели хронического ограничения сна ($n = 5$). Различия между группами в соответствии однофакторным дисперсионным анализом ANOVA с последующим Тьюки post-hoc указаны как: *** $p < 0.001$ по сравнению с группой контроля; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ по сравнению с эффектом ограничения сна.

препаратов голубого пятна, окрашенных по методу Ниссля, количество нейронов в голубом пятне крыс, подвергавшихся ограничению сна, было значимо ниже (66 ± 6 , $n = 5$, $p < 0.001$), чем у крыс контрольной группы (91 ± 4 , $n = 5$) (рис. 3с, d). Интраназальное введение GRP78 препятствовало гибели НА-ергических нейронов в голубом пятне в модели хронического недосыпания (рис. 3). Количество выживших нейронов в голубом пятне после введения GRP78 увеличивалось по сравнению с нелечеными крысами: (73 ± 5 , $n = 5$, $p < 0.01$) при окраске с помощью анти-ТГ-антител и (88 ± 6 , $n = 5$, $p < 0.01$) при окраске по Ниссля.

Введение GRP78 в контрольных условиях, без ОС, не приводило к развитию дегенерации нейронов голубого пятна, что свидетельствует об отсутствии токсического воздействия препарата: (72 ± 3 , $n = 5$) при мечении с помощью анти-ТГ-антител и (87 ± 6 , $n = 5$) при окраске по Ниссля (рис. 3). Полученные данные указывают на нейропротективный потенциал GRP78 в модели хронического ограничения сна у крыс.

*GRP78 ослабляет развитие апоптоза по митохондриальному пути
в модели хронического ограничения сна*

Нейроны голубого пятна проявляют повышенную чувствительность к метаболическому стрессу, индуцированному длительным бодрствованием, что делает их уязвимыми к повреждающему действию ОС. В частности, было показано развитие митохондриальной дисфункции с последующей дегенерацией нейронов в ГП в условиях хронического ОС у мышей [17, 18].

Чтобы выяснить, происходит ли активация апоптоза по митохондриальному пути в нашей модели хронического недосыпания, мы исследовали в лизате голубого пятна уровни расщепленных каспазы-9 и каспазы-3. Показано, что после 5 дней хронического ОС происходит повышение уровня расщепленной каспазы-9 на 38% ($138 \pm 16\%$, $n = 5$, $p = 0.004$) и расщепленной каспазы-3 на 41% ($141 \pm 21\%$, $n = 5$, $p = 0.005$) по сравнению с контрольными значениями содержания расщепленной каспазы-9 ($95 \pm 14\%$, $n = 5$) и расщепленной каспазы-3 ($91 \pm 17\%$, $n = 5$) (рис. 4). Введение GRP78 ослабляло развитие апоптоза, о чем свидетельствовало снижение содержания расщепленной каспазы-9 ($109 \pm 9\%$, $n = 5$, $p = 0.05$) и каспазы-3 ($97 \pm 8\%$, $n = 5$, $p = 0.05$) (рис. 4). Следовательно, проникая в нейроны голубого пятна, экзогенный белок GRP78 проявляет антиапоптотические свойства.

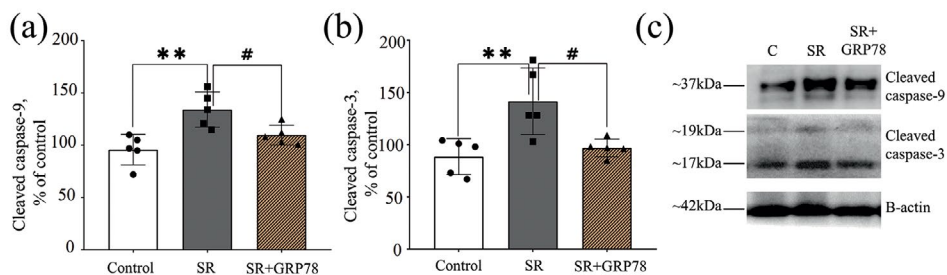


Рис. 4. Интраназальное введение экзогенного GRP78 предотвращает развитие апоптоза в модели хронического ограничения сна. (a) – содержание расщепленной каспазы-9, (b) – содержание расщепленной каспазы-3, (c) – репрезентативные иммуноблоты. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего. Control – контрольные животные ($n = 5$), SR – sleep restriction, ограничение сна в течение 5 дней ($n = 5$), SR+Grp78 – введение Grp78 в модели хронического ограничения сна ($n = 5$). Различия между группами в соответствии однофакторным дисперсионным анализом ANOVA с последующим Тьюки post-хос указаны как: ** $p < 0.01$ по сравнению с группой контроля; # $p < 0.05$ по сравнению с эффектом ограничения сна.

Оценка реакции микроглии при хроническом недосыпании и терапии с экзогенным GRP78

Далее мы оценили признаки микроглиоза в голубом пятне, которые могут вносить вклад в патогенез нейродегенерации и нейроповеденческие нарушения, индуцированные депривацией сна [28, 29]. Для этого мы исследовали количество Iba-1-иммунопозитивных микроглиоцитов в голубом пятне через 5 дней после ОС. Статистически значимых различий в количестве микроглиоцитов в голубом пятне выявлено не было (рис. 5), что указывает на отсутствие реактивного микроглиоза. Кроме того, в условиях ОС не происходило перехода морфологии микроглиоцитов в воспалительный фенотип: не наблюдалось укорочения отростков и перехода клеток в амeboид-подобное состояние. Интраназальное введение GRP78 животным при депривации сна и в контрольных условиях не влияло на количество Iba-1-иммунопозитивных микроглиоцитов в голубом пятне (рис. 5). В совокупности эти данные указывают, что микроглия в голубом пятне находится в физиологическом, не реактивном состоянии при хроническом ОС, и интраназальное введение экзогенного GRP78 не приводило к ее патоморфологическим изменениям.

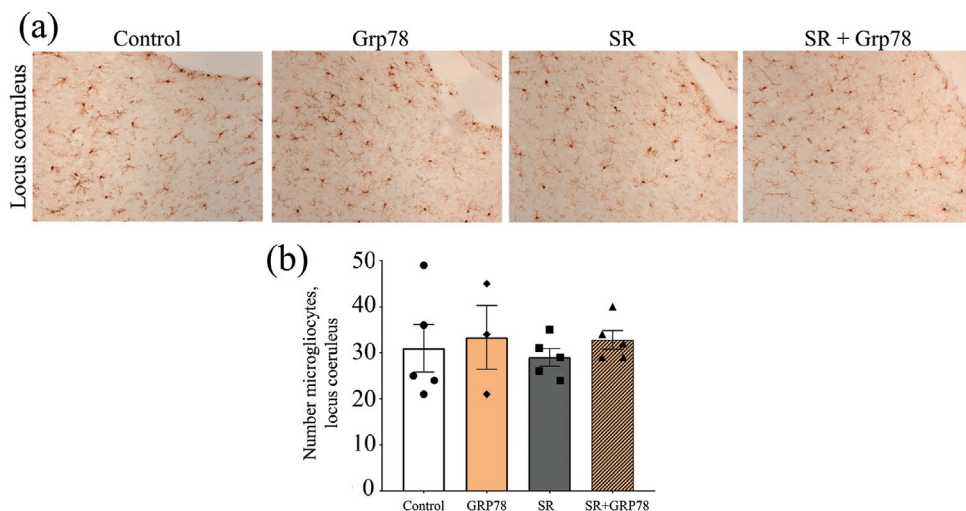


Рис. 5. Ограничение сна и интраназальное введение GRP78 не оказывают влияния на состояние микроглии в голубом пятне. (а) – репрезентативные микрофотографии голубого пятна, (б) – количество Iba-1-позитивных микроглиоцитов в голубом пятне. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего. Control – контрольные животные ($n = 5$), (Grp78) – введение Grp78 в контрольных условиях ($n = 3$), Sleep restriction (SR) – ограничение сна в течение 5 дней ($n = 5$), SR+Grp78 – введение с Grp78 в модели хронического ограничения сна ($n = 5$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время в научном сообществе проявляется растущий интерес к выяснению роли нарушений сна и хронического недосыпания в развитии нейродегенеративных заболеваний. При этом актуальной задачей современной биомедицины является поиск фармакологических агентов, способных снизить риск развития нейродегенерации в результате хронического недостатка сна. Создание адекватных моделей хронического не-

досыпания на животных позволит ускорить решение этих важных задач. У людей хроническое недосыпание рассматривается, как правило, на фоне ежесуточного ограничения сна до 4–6 ч в ночное время [13]. Однако применение аналогичного режима у грызунов может быть неправомерно, так как у этих животных наблюдается полифазный суточный ритм, при котором в активную (ночную) фазу суток периоды бодрствования (~1.5–3 ч) прерываются на сон длительностью (~30 мин – 1 ч); в неактивную фазу суток (днем) более длительные периоды сна также прерываются на короткие периоды бодрствования (~30 мин) [30, 31]. Поэтому модели полифазного циклического ОС являются предпочтительными при исследовании эффектов депривации сна у грызунов.

В нашем исследовании для оценки нейропротективного потенциала интраназально введенного GRP78 при хроническом недосыпании была применена ранее разработанная в лаборатории модель полифазного циклического ОС (3 ч депривации сна и 1 ч покоя) у крыс с применением качающейся платформы [26]. Для модели было характерно: (1) возрастание времени бодрствования, (2) значимое сокращение представленности МВС и полное отсутствие ПС в периоды работы шейкера, (3) долговременное нарушение гомеостатических механизмов регуляции МВС и глубокого МВС (гМВС).

Одним из способов неинвазивной и быстрой доставки в мозг нейропротекторных соединений является интраназальный способ. Обоснованием для использования интраназального пути введения GRP78 послужили, во-первых, данные литературы, указывающие на то, что эндогенный GRP78 может покидать ЭР, проникать через клеточную мембрану и попадать во внеклеточное пространство [32], спинномозговую жидкость и периферическую кровь в норме и при патологии [33–35]. В то же время экзогенный GRP78 или его синтетический аналог IRL201805, введенные внутривенно, способны интернализироваться моноцитами периферической крови и влиять на фенотипические и метаболические функции миелиоидных клеток при ревматоидном артрите [36]. Во-вторых, недавно мы впервые показали, что меченный флуоресцентным красителем GRP78, введенный интраназально, проникает в нейроны и микроглиоциты кЧС, вентральной сегментальной области и голубого пятна вне патологических условий и в модели БП у крыс [25]. В настоящем исследовании мы продемонстрировали, что экзогенный GRP78 накапливается в нейронах голубого пятна и его содержание возрастает в 1.4 раза через 3 ч после интраназального введения (рис. 2), это предполагает его высокую биодоступность, чтобы оказать терапевтическое воздействие.

Проведенный патоморфологический анализ показал, что ограничение сна в течение 5 суток приводит к гибели 31% НА-ергических нейронов голубого пятна (рис. 3). Схожие данные были получены и другими исследователями. Так, в мышинной модели хронического ОС с насыщенной средой в течение 7 дней [16] была показана дегенерация нейронов голубого пятна на уровне 25–30%. При этом выяснено, что длительность режима ОС влияет на уровень дегенерации в голубом пятне [17, 37]. Так, в модели фрагментации сна (1–4 недели) у мышей гибель НА-ергических нейронов в голубом пятне была в 1.5 раза больше при использовании 4-недельного режима ОС по сравнению с 1-недельным. В нашей работе показано, что экзогенный GRP78 препятствовал развитию нейродегенерации в голубом пятне в модели хронического ОС у крыс. Нейропротективные свойства интраназально введенного GRP78 выявлены нами и в модели БП у крыс [25]. Мы выяснили, что защитный эффект экзогенного GRP78 на дофаминергические нейроны кЧС обусловлен его способностью препятствовать мисфолдингу белков и развитию стресса ЭР по проапоптозному пути и оказывать противовоспалительное действие [25].

Среди вероятных механизмов развития нейродегенерации при ОС выделяют развитие митохондриальной дисфункции, которая приводит к нарушению окислительно-восстановительного гомеостаза, образованию активных форм кислорода, что в конечном счете приводит к апоптозу нейронов по митохондриальному пути [17, 18]. В частности, на модели депривации ПС у крыс в течение 6 дней было выявлено по-

вышение экспрессии проапоптотических факторов: фактора активации апоптотической протеазы-1 (Араф-1), цитохрома с, каспазы-9 и каспазы-3 [38]. В нашей работе развитие нейродегенерации в голубом пятне при хроническом ОС было сопряжено с возрастанием уровня активированных каспаз-3, 9 и (рис. 5), что указывает на развитие митохондриально-опосредованного апоптоза. В то же время введение GRP78 в модели хронического ОС у крыс препятствовало активации каспаз-3, 9 (рис. 4), что свидетельствует об антиапоптотическом эффекте экзогенного GRP78. Защитный эффект GRP78 был выявлен и другими авторами в модели отрыва спинномозгового корешка у крыс: сверхэкспрессия экзогенного GRP78 в мотонейронах спинного мозга значительно снижала уровень активных форм кислорода и ослабляла митохондриальную дисфункцию, что в конечном счете приводило к увеличению количества выживших нейронов [39].

Предполагается, что другим повреждающим следствием хронического ОС на мозг, которое вносит вклад в развитие нейродегенерации и нейроповеденческих нарушений, является нейровоспаление [28, 40, 41]. В нашей модели хронического ОС у крыс не обнаружено признаков реактивного микроглиоза в голубом пятне, характерного для воспаления (рис. 5). Это согласуется с данными других исследователей. В частности, в полифазной модели хронического ОС с помощью бегового колеса (3 ч депривации сна и 1 ч покоя) не было выявлено признаков воспалительной реакции в голубом пятне через 4 дня ОС у крыс [42]. В то же время в литературе имеются данные, указывающие на развитие воспаления при ОС в других областях мозга. Активация микроглии и повышение уровней провоспалительных цитокинов в гиппокампе было обнаружено через 24–96 ч в модели депривации ПС у крыс [43], острой депривации сна в течение 48 ч у крыс [41] и хронического ОС у мышей [29] и крыс [28]. Это указывает на повышенную уязвимость гиппокампа к повреждающему воздействию ОС.

Немаловажный вклад в развитие нейродегенерации при хроническом ОС может вносить ослабление лимфатического клиренса головного мозга, активность которого максимальна во время гМВС [44, 45]. В нашей модели хронического ОС ослабляются гомеостатические механизмы регуляции МВС и особенно гМВС [26], и это может способствовать накоплению в паренхиме головного мозга токсических продуктов обмена и амилоидных белков. Позитронно-эмиссионная томография показала, что одной ночи лишения сна достаточно, чтобы амилоидный белок А β накапливался в здоровом мозге у человека [46]. В то же время нарушение гМВС увеличивал уровень А β в спинномозговой жидкости человека [47]. Мы предполагаем, что нейропротективный эффект GRP78, выявленный в нашей модели, может быть отчасти обусловлен его способностью увеличивать представленность гМВС, во время которого усиливается работа лимфатической системы. Введение экзогенного GRP78 в ликворную систему головного мозга крыс приводило к увеличению спектра мощности ЭЭГ в области дельта-диапазона (0.75–4 Гц) во время МВС [48]. В то же время сверхэкспрессия GRP78 у плодовых мушек (*Drosophila melanogaster*) сопровождалась увеличением продолжительности восстановительного сна в ответ на ОС, что указывает на участие GRP78 в поддержании гомеостатических механизмов сна [49]. Однако воздействие GRP78 на гомеостатические механизмы сна и лимфатический клиренс при ОС требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование подтверждает терапевтическую значимость интраназального введения GRP78 для защиты головного мозга от повреждающего действия хронического недостатка сна. Впервые показано, что проведение профилактического введения экзогенного GRP78 оказывает мощный нейропротективный эффект в модели хронического ОС у крыс. Нейропротективное действие экзогенного GRP78 связано с его способностью проникать и накапливаться в НА-ергических нейронах голубого пятна и противодействовать развитию апоптоза.

Полученные данные о защитном потенциале GRP78 позволяют считать GRP78 потенциальным нейропротекторным средством для профилактики патологических последствий хронического недосыпания.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы (И. В. Е.), проведение экспериментов (М. Б. П.), обработка и анализ данных (М. Б. П., И. В. Е.), написание и редактирование рукописи (М. Б. П., И. В. Е.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075–15–2022–296), грант на создание и развитие НЦМУ «Павловский центр». Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, протокол № 1–17/2022 от 27.01.2022 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Riemann D, Nissen C, Palagini L, Otte A, Perlis ML, Spiegelhalder K* (2015) The neurobiology, investigation, and treatment of chronic insomnia. *Lancet Neurol* 14: 547–558.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00021-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00021-6)
2. *Strygin KN, Poluektov MG* (2017) INSOMNIA. *Medical Council* 52–58.
<https://doi.org/10.21518/2079-701X-2017-0-52-58>
3. *Schutte-Rodin S, Broch L, Buysse D, Dorsey C, Sateia M* (2008) Clinical guideline for the evaluation and management of chronic insomnia in adults. *J Clin Sleep Med* 04: 487–504.
<https://doi.org/10.5664/jcsm.27286>
4. *Shan W, Peng X, Tan W, Zhou Z, Xie H, Wang S* (2024) Prevalence of insomnia and associations with depression, anxiety among adults in guangdong, China: A large-scale cross-sectional study. *Sleep Med* 115: 39–47.
<https://doi.org/10.1016/j.sleep.2024.01.023>
5. *Ahn E, Baek Y, Park J-E, Lee S, Jin H-J* (2024) Elevated prevalence and treatment of sleep disorders from 2011 to 2020: a nationwide population-based retrospective cohort study in Korea. *BMJ Open* 14: e075809.
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2023-075809>
6. *Hisler G, Muranovic D, Krizan Z* (2019) Changes in sleep difficulties among the U.S. population from 2013 to 2017: results from the National Health Interview Survey. *Sleep Health* 5: 615–620.
<https://doi.org/10.1016/j.sleh.2019.08.008>
7. *Norell-Clarke A, Hagquist C* (2017) Changes in sleep habits between 1985 and 2013 among children and adolescents in Sweden. *Scand J Public Health* 45: 869–877.
<https://doi.org/10.1177/1403494817732269>
8. *Costa A, Pereira T* (2019) The effects of sleep deprivation on cognitive performance. *Eur J Public Health* 29: ckz034.096.
<https://doi.org/10.1093/eurpub/ckz034.096>
9. *Al-Abri M* (2015) Sleep deprivation and depression: A bi-directional association. *Sultan Qaboos Univ Med J* 15: e4–e6.
10. *Rosen I, Gimotty P, Shea J, Bellini L* (2006) Evolution of sleep quantity, sleep deprivation, mood disturbances, empathy, and burnout among interns. *Acad Med* 81: 82–85.
<https://doi.org/10.1097/00001888-200601000-00020>

11. *Belenky G, Wesensten N, Thorne D, Thomas M, Sing H, Redmond D, Russo M, Balkin T* (2003) Patterns of performance degradation and restoration during sleep restriction and subsequent recovery: a sleep dose-response study. *J Sleep Res* 12: 1–12.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2869.2003.00337.x>
12. *Pejovic S, Basta M, Vgontzas A, Kritikou I, Shaffer M, Tsaoussoglou M, Stiffler D, Stefanakis Z, Bixler E, Chrousos G* (2013) Effects of recovery sleep after one work week of mild sleep restriction on interleukin-6 and cortisol secretion and daytime sleepiness and performance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: E890–E896.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00301.2013>
13. *Van Dongen H, Maislin G, Mullington J, Dinges D* (2003) The cumulative cost of additional wakefulness: dose-response effects on neurobehavioral functions and sleep physiology from chronic sleep restriction and total sleep deprivation. *Sleep* 26: 117–126.
<https://doi.org/10.1093/sleep/26.2.117>
14. *Lutsey P, Misialek J, Mosley T, Gottesman R, Punjabi N, Shahar E, MacLehose R, Ogilvie R, Knopman D, Alonso A* (2018) Sleep characteristics and risk of dementia and Alzheimer's disease: The atherosclerosis risk in communities study. *Alzheimers Dement* 14: 157–166.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.06.2269>
15. *Pase M, Himali J, Grima N, Beiser A, Satizabal C, Aparicio H, Thomas R, Gottlieb D, Auerbach S, Seshadri S* (2017) Sleep architecture and the risk of incident dementia in the community. *Neurology* 89: 1244–1250.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004373>
16. *Owen J, Zhu Y, Fenik P, Zhan G, Bell P, Liu C, Veasey S* (2021) Late-in-life neurodegeneration after chronic sleep loss in young adult mice. *Sleep* 44(8): zsab057.
<https://doi.org/10.1093/sleep/zsab057>
17. *Zhu Y, Fenik P, Zhan G, Somach R, Xin R, Veasey S* (2016) Intermittent short sleep results in lasting sleep wake disturbances and degeneration of locus coeruleus and orexinergic neurons. *Sleep* 39: 1601–1611.
<https://doi.org/10.5665/sleep.6030>
18. *Zhang J, Zhu Y, Zhan G, Fenik P, Panossian L, Wang M, Reid S, Lai D, Davis J, Baur J, Veasey S* (2014) Extended wakefulness: compromised metabolics in and degeneration of locus coeruleus neurons. *J Neurosci* 34: 4418–4431.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5025-12.2014>
19. *Aston-Jones G, Bloom F* (1981) Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 1: 876–886.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.01-08-00876.1981>
20. *Benington J, Craig Heller H* (1995) Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol* 45: 347–360.
[https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)00057-O](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)00057-O)
21. *Costa C, Manaa W, Duplan E, Checler F* (2020) The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response and their contributions to Parkinson's disease physiopathology. *Cells* 9: 2495.
<https://doi.org/10.3390/cells9112495>
22. *Naidoo N, Giang W, Galante R, Pack A* (2005) Sleep deprivation induces the unfolded protein response in mouse cerebral cortex. *J Neurochem* 92: 1150–1157.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02952.x>
23. *Voronin MV, Abramova EV, Verbovaya ER, Vakhitova YV, Seredenin SB* (2023) Chaperone-dependent mechanisms as a pharmacological target for neuroprotection. *Int J Mol Sci* 24: 823.
<https://doi.org/10.3390/ijms24010823>
24. *Gorbatyuk M, Gorbatyuk O* (2013) The molecular chaperone GRP78/BiP as a therapeutic target for neurodegenerative disorders: A mini review. *J Genet Syndr Gene Ther* 4.
<https://doi.org/10.4172/2157-7412.1000128>
25. *Pazi M, Belan D, Komarova E, Ekimova I* (2024) Intranasal administration of GRP78 protein (HSPA5) confers neuroprotection in a lactacystin-induced rat model of parkinson's disease. *Int J Mol Sci* 25: 3951.
<https://doi.org/10.3390/ijms25073951>
26. *Guzeev MA, Kurmazov NS, Simonova VV, Pastukhov YuF, Ekimova IV* (2021) Modeling of chronic sleep restriction for translational studies. *SS Korsakov J Neurol Psychiatr* 121(4–2): 6–13.
<https://doi.org/10.17116/jnevro20211214026>
27. *Paxinos G, Watson C* (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Elsevier. Amsterdam.
28. *Manchanda S, Singh H, Kaur T, Kaur G* (2018) Low-grade neuroinflammation due to chronic sleep deprivation results in anxiety and learning and memory impairments. *Mol Cell Biochem* 449: 63–72.
<https://doi.org/10.1007/s11010-018-3343-7>

29. *Hurtado-Alvarado G, Domínguez-Salazar E, Pavon L, Velázquez-Moctezuma J, Gómez-González B* (2016) Blood-brain barrier disruption induced by chronic sleep loss: Low-grade inflammation may be the link. *J Immunol Res* 2016: 1–15.
<https://doi.org/10.1155/2016/4576012>
30. *Deurveilher S, Semba K* (2019) Physiological and neurobehavioral consequences of chronic sleep restriction in rodent models. *Handbook Sleep Res* 557–567.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813743-7.00037-2>
31. *Deurveilher S, Rusak B, Semba K* (2012) Time-of-day modulation of homeostatic and allostatic sleep responses to chronic sleep restriction in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302(12): R1411–R1425.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00678.2011>
32. *Takemoto H, Yoshimori T, Yamamoto A, Miyata Y, Yahara I, Inoue K, Tashiro Y* (1992) Heavy chain binding protein (BiP/GRP78) and endoplasmic reticulum chaperones are exported from the endoplasmic reticulum in rat exocrine pancreatic cells, similar to protein disulfide-isomerase. *Arch Biochem Biophys* 296: 129–136.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90554-A](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90554-A)
33. *Baek J-H, Mamula D, Tingstam B, Pereira M, He Y, Svenningsson P* (2019) GRP78 level is altered in the brain, but not in plasma or cerebrospinal fluid in Parkinson's disease patients. *Front Neurosci* 13: 697.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00697>
34. *Casas C* (2017) GRP78 at the centre of the stage in cancer and neuroprotection. *Front Neurosci* 11: 177.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00177>
35. *Shields A, Thompson S, Panayi G, Corrigall V* (2012) Pro-resolution immunological networks: binding immunoglobulin protein and other resolution-associated molecular patterns. *Rheumatology* (Oxford) 51: 780–788.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker412>
36. *Eggleton P, De Alba J, Weinreich M, Calias P, Foulkes R, Corrigall V* (2023) The therapeutic mavericks: Potent immunomodulating chaperones capable of treating human diseases. *J Cell Mol Med* 27: 322–339.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.17669>
37. *Zhu Y, Fenik P, Zhan G, Mazza E, Kelz M, Aston-Jones G, Veasey S* (2007) Selective loss of catecholaminergic wake-active neurons in a murine sleep apnea model. *J Neurosci* 27: 10060–10071.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0857-07.2007>
38. *Somaraajan B, Khanday M, Mallick B* (2016) Rapid eye movement sleep deprivation induces neuronal apoptosis by noradrenaline acting on alpha1 adrenoceptor and by triggering mitochondrial intrinsic pathway. *Front Neurol* 7: 25.
<https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00025>
39. *Leiva-Rodríguez T, Romeo-Guitart D, Herrando-Grabulosa M, Muñoz-Guardiola P, Polo M, Bañuls C, Petegnief V, Bosch A, Lizzcano J, Apostolova N, Forés J, Casas C* (2021) GRP78 Overexpression triggers PINK1-IP3R-mediated neuroprotective mitophagy. *Biomedicine* 9: 1039.
<https://doi.org/10.3390/biomedicine9081039>
40. *Bellesi M, de Vivo L, Chini M, Gilli F, Tononi G, Cirelli C* (2017) Sleep loss promotes astrocytic phagocytosis and microglial activation in mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 37: 5263–5273.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3981-16.2017>
41. *Wadhwa M, Kumari P, Chauhan G, Roy K, Alam S, Kishore K, Ray K, Panjwani U* (2017) Sleep deprivation induces spatial memory impairment by altered hippocampus neuroinflammatory responses and glial cells activation in rats. *J Neuroimmunol* 312: 38–48.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.09.003>
42. *Hall S, Deurveilher S, Robertson G, Semba K* (2020) Homeostatic state of microglia in a rat model of chronic sleep restriction. *Sleep* 43(11): zsaal08.
<https://doi.org/10.1093/sleep/zsaal08>
43. *Hou J, Shen Q, Wan X, Zhao B, Wu Y, Xia Z* (2019) REM sleep deprivation-induced circadian clock gene abnormalities participate in hippocampal-dependent memory impairment by enhancing inflammation in rats undergoing sevoflurane inhalation. *Behav Brain Res* 364: 167–176.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.038>
44. *Xie L, Kang H, Xu Q, Chen M, Liao Y, Thyagarajan M, O'Donnell J, Christensen D, Nicholson C, Iliff J, Takano T, Deane R, Nedergaard M* (2013) Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* 342: 373–377.
<https://doi.org/10.1126/science.1241224>
45. *Lapshina KV, Ekimova IV* (2024) Aquaporin-4 and Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 25: 1672.
<https://doi.org/10.3390/ijms25031672>

46. Shokri-Kojori E, Wang G-J, Wiers C, Demiral S, Guo M, Kim S, Lindgren E, Ramirez V, Zehra A, Freeman C, Miller G, Manza P, Srivastava T, De Santi S, Tomasi D, Benveniste H, Volkow N (2018) β -Amyloid accumulation in the human brain after one night of sleep deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 4483–4488.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1721694115>
47. Ju Y-ES, Ooms S, Sutphen C, Macauley S, Zangrilli M, Jerome G, Fagan A, Mignot E, Zempel J, Claassen J, Holtzman D (2017) Slow wave sleep disruption increases cerebrospinal fluid amyloid- β levels. *Brain* 140: 2104–2111.
<https://doi.org/10.1093/brain/awx148>
48. Lapshina KV, Guzeev MA, Ekimova IV (2016) Glucose-regulated protein Grp78 affects characteristics of sleep and thermoregulation in rats. *J Evol Biochem Physiol* 52: 161–167.
<https://doi.org/10.1134/S002209301602006X>
49. Naidoo N, Casiano V, Cater J, Zimmerman J, Pack A (2007) A role for the molecular chaperone protein BiP/GRP78 in drosophila sleep homeostasis. *Sleep* 30: 557–565.
<https://doi.org/10.1093/sleep/30.5.557>

Intranasal Administration of GRP78 Protein (HSPA5) Counteracts the Neurodegeneration in the Locus Coeruleus in a Model of Chronic Sleep Restriction in Rats

M. B. Pazi^a, * and I. V. Ekimova^a

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia*

*e-mail: pazimariia@gmail.com

Chronic sleep restriction (sleep less than 6 hours per day) due to the workload and a decrease in sleep quality is an endemic disease in modern society. Chronic sleep deprivation causes serious neuropsychiatric disorders associated with irreversible neurodegenerative changes in the brain. The search for pharmacological agents that can reduce the risk of neurodegeneration as a result of chronic sleep loss is an urgent task issue for biomedicine. Intranasal administration of glucose-regulated 78 kDa heat shock protein (GRP78) has a neuroprotective effect in a rat model of Parkinson's disease. The neuroprotective potential of intranasally administered GRP78 in chronic sleep deprivation has not been previously studied. The aim of the study is to find out whether preventive intranasal administration of GRP78 is able to weaken and/or stop the process of neurodegeneration in the locus coeruleus in the model of chronic sleep restriction (SR) in rats. The study was conducted on 6 months old male Wistar rats. For sleep deprivation, a validated method of a swinging platform was used in the mode: 3 hours of sleep deprivation and 1 hour of rest continuously for 5 days. Recombinant human protein GRP78 was administered intranasally two days before the start of SR and during 5 days of SR. Cellular and molecular changes in the locus coeruleus during SR and during the administration of GRP78 were studied using immunohistochemistry and Western blotting. It was shown that chronic SR leads to the degeneration of 30% of noradrenergic neurons in the locus coeruleus, that was associated with an increase in the levels of activated caspases-3 and 9. This indicates the development of apoptosis along the mitochondrial pathway. No signs of reactive microgliosis were found in the model of chronic SR in rats. We have demonstrated that intranasally administered GRP78 penetrates and accumulates in the neurons of the locus coeruleus, GRP78 counteracts the death of neurons along the path of apoptosis. The data obtained allows to consider GRP78 as a potential neuroprotective agent for the prevention of pathological consequences of chronic sleep deprivation.

Keywords: chronic sleep restriction, locus coeruleus, chaperone GRP78, HSPA5, neurodegeneration, apoptosis