

ISSN 0869-8139

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

РОССИЙСКИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ИМЕНИ И. М. СЕЧЕНОВА



Том 110 № 8

август

2024



НАУКА

— 1727 —



СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментальные статьи

Динамика сенсомоторных ритмов ЭЭГ у детей с церебральным параличом при прохождении курса нейрореабилитации в зависимости от успешности представления ими движений

*В. Б. Павленко, С. В. Власенко, Е. Н. Чуян, А. И. Кайда, Л. С. Орехова,
Е. А. Бирюкова, Д. В. Павленко, Ш. Э. Татарис* 1223

Интраназальное введение белка GRP78 (HSPA5) противодействует гибели нейронов в голубом пятне в модели хронической депривации сна у крыс

М. Б. Пази, И. В. Екимова 1238

Применение лактоферрина для профилактики и восстановления изменений костной ткани у крыс Wistar в условиях опорной разгрузки

*К. В. Гордиенко, Н. А. Лукичёва, А. И. Ахметзянова, А. К. Колупаев,
О. А. Саченков, Т. В. Балтина, Е. Р. Садчикова, Г. Ю. Васильева* 1253

Влияние консервации на изменение объема клеток эндотелия роговицы в среде с высокой концентрацией калия

*Л. Е. Каткова, Г. С. Батурина, М. М. Тетерин, А. И. Саханенко,
И. Г. Пальчикова, И. А. Искаков, Е. И. Соленов* 1264

CONTENTS

Experimental articles

- EEG Sensorimotor Rhythms Dynamics in Children with Cerebral Palsy During the Course of Neurorehabilitation, Depending in the Success of Their Imagination of Movements
V. B. Pavlenko, S. V. Vlasenko, E. N. Chuyan, A. I. Kaida, L. S. Orekhova, E. A. Birukova, D. V. Pavlenko and S. E. Tataris 1223
- 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, and I. V. Ekimova 1238
- Application of Lactoferrin for the Prevention and Restoration of Bone Tissue in Wistar Rats under Conditions of Hindlimb Unloading
K. V. Gordienko, N. A. Lukicheva, A. I. Akhmetzyanova, A. K. Kolupaev, O. A. Sachenkov, T. V. Baltina, E. R. Sadchikova, and G. Yu. Vassilieva 1253
- Effect of preservation on Changes in the Volume of Corneal Endothelial Cells in an Environment with a High Concentration of Potassium
L. E. Katkova, G. S. Baturina, M. M. Teterin, A. I. Sakhanenko, I. G. Palchikova, I. A. Iskakov, and E. I. Solenov 1264
-
-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ДИНАМИКА СЕНСОМОТОРНЫХ РИТМОВ ЭЭГ У ДЕТЕЙ
С ЦЕРЕБРАЛЬНЫМ ПАРАЛИЧОМ ПРИ ПРОХОЖДЕНИИ КУРСА
НЕЙРОРЕАБИЛИТАЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСПЕШНОСТИ
ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ИМИ ДВИЖЕНИЙ

© 2024 г. В. Б. Павленко^{1, *}, С. В. Власенко^{1, 2}, Е. Н. Чуян¹, А. И. Кайда¹,
Л. С. Орехова¹, Е. А. Бирюкова¹, Д. В. Павленко¹, Ш. Э. Татарис¹

¹Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь, Россия
²Научно-исследовательский институт детской курортологии, физиотерапии и медицинской
реабилитации, Евпатория, Россия

* E-mail: vpav55@gmail.com

Поступила в редакцию 10.04.2024 г.

После доработки 04.06.2024 г.

Принята к публикации 02.07.2024 г.

У 50 детей 7–15 лет обоего пола, страдающих детским церебральным параличом (ДЦП), проведен анализ изменений электроэнцефалограммы (ЭЭГ) в частотных диапазонах сенсомоторных мю- (8–13 Гц) и бета- (15–25 Гц) ритмов и особенностей восстановления двигательных функций в процессе курса нейрореабилитации из 10 сеансов с применением неинвазивного интерфейса «мозг – компьютер – экзоскелет кисти». ЭЭГ регистрировали в 32 отведениях в условиях покоя и кинестетического воображения движений разгибания кистей рук. В зависимости от успешности определения программой-классификатором воображаемых состояний по паттерну ЭЭГ дети были разделены на две группы – с высокой и низкой успешностью представления движений. У детей исследованных групп при прохождении курса нейрореабилитации выявлены отличия в характере изменений амплитуды ЭЭГ в частотных диапазонах указанных ритмов. При представлении движений правой руки межгрупповые различия для мю-ритма достигали уровня статистической значимости в сагиттальных отведениях лобно-центральных и теменных областей неокортекса, для бета-ритма – в сагиттальном лобно-центральном отведении. У детей группы с низкой успешностью в указанных областях на последнем сеансе курса по сравнению с первым наблюдался рост амплитуды сенсомоторных ритмов, свидетельствующий о развитии торможения в лобно-теменной двигательной сети. У детей группы с высокой успешностью в этих областях амплитуды мю- и бета-ритма к последнему сеансу не менялись, т. е. степень синхронизации/десинхронизации сенсомоторных ритмов при представлении движений в процессе курса нейрореабилитации оставалась стабильной. Пациенты, состояния которых классификатор определял более точно, достигли более высоких показателей реабилитации двигательной сферы. Результаты исследования важны для уточнения мозговых механизмов восстановления двигательных функций у пациентов с ДЦП под влиянием курса нейрореабилитации.

Ключевые слова: детский церебральный паралич, электроэнцефалограмма, интерфейс мозг – компьютер, мю- и бета-ритм, нейрореабилитация

ВВЕДЕНИЕ

Детский церебральный паралич (ДЦП) является наиболее распространенной причиной инвалидности в детском возрасте. В настоящее время его встречаемость в разных странах составляет от 1.6 до 3.4 случаев на 1000 новорожденных [1]. Данное заболевание представляет гетерогенную группу нарушений движения и осанки, обусловленную непрогрессирующим повреждением головного мозга, возникшим на ранних этапах развития (внутриутробный период или первые два года жизни). Гетерогенность клинической картины связана со сложным взаимодействием между поражением головного мозга (которое варьирует от случая к случаю в зависимости от локализации, степени и времени возникновения), индивидуальным генетическим фоном конкретного ребенка и последующими эпигенетическими и экологическими факторами [2]. Повреждения головного мозга сопровождаются аберрантным формированием нейронных связей. Все это приводит к стойкому нарушению тонуса мышц конечностей, запуску и координации движений, сенсорному дефициту, когнитивным нарушениям (см. обзор [3]). Наиболее частым симптомом у детей с ДЦП является спастичность, то есть состояние повышенного мышечного напряжения, которое ограничивает объем пассивных и активных движений в суставах. Спастичность отрицательно влияет на дальнейшее развитие двигательных функций и вызывает вторичные нарушения опорно-двигательного аппарата [4]. Причиной спастических нарушений являются поражения как моторных кортикоспинальных, так и таламокортикальных путей. В большинстве случаев они возникают вследствие внутриутробного или перинатального инсульта [5].

Существующие медикаментозные и физиотерапевтические методы помощи больным с ДЦП не всегда оказываются эффективными. В связи с этим активно развиваются методы нейрореабилитации, основанные на феномене пластичности мозга в условиях интенсивных упражнений пациента. К числу таких методов относятся: роботизированная механотерапия [6]; терапия с использованием наблюдения за действиями с последующей их имитацией [7]; применение комплексов, включающих неинвазивные интерфейсы мозг – компьютер (ИМК) с биологической обратной связью на основе виртуальной реальности [8, 9] или на основе кинестетической обратной связи с использованием экзоскелета кисти руки (см. обзор [10]). Получены доказательства эффективности последнего подхода в улучшении двигательных функций верхних конечностей [11, 12] и показателей моторной реализации речи [13] у детей со спастическими формами ДЦП.

У больных с ДЦП степень поражения структур мозга и связей между ними, а также пластичность нервной ткани в процессе лечения можно оценить посредством анализа характеристик электроэнцефалограммы (ЭЭГ), которые отражают активность распределенных нейронных сетей [2]. При анализе фоновой ЭЭГ у детей с ДЦП в возрасте 6–14 лет отмечено снижение мощности альфа-ритма в затылочных областях неокортекса и увеличение мощности в тета- и дельта-диапазонах почти во всех отведениях по сравнению с контрольной группой здоровых сверстников [14].

Особое внимание в последнее десятилетие уделяется динамике сенсомоторных ритмов ЭЭГ при выполнении пациентами различных функциональных проб. Сенсомоторный мю-ритм, регистрируемый над центральными областями неокортекса, включает как минимум две негармонические составляющие – в альфа- (8–13 Гц) и бета- (15–25 Гц) диапазонах частот, иногда называемые мю-альфа- и мю-бета-ритмами [15]. Однако большинство исследователей обозначают эти компоненты как мю- и бета-ритмы соответственно. В настоящей работе мы также будем придерживаться этих названий. Мю-ритм генерируется в сенсомоторной постцентральной коре, а бета-активность – в прецентральной моторной области неокортекса [16, 17]. Считают [18], что мю-ритм в основном отражает сенсомоторные функции, в то время как бета-компонент более тесно связан с моторным кортикальным контролем. Поскольку подавление амплитуды (десинхронизация) сенсомоторных ритмов вызывается как реальным движением, так и его вообра-

жением, модуляции сенсомоторных ритмов предложено использовать в качестве электрофизиологических маркеров состояния кортикальной сенсомоторной системы и ее пластичности в процессе реабилитации у пациентов с ДЦП [2, 19].

Исследования динамики сенсомоторных ритмов ЭЭГ при выполнении движений пациентами с ДЦП указывают на ее зависимость от формы заболевания. У детей и взрослых с гемипарезом (односторонней формой ДЦП) движения паретичной руки сопровождаются меньшей десинхронизацией мио-ритма в центральных отведениях пораженного контралатерального полушария, чем у здоровых людей. Чем меньше падала амплитуда мио-ритма и, следовательно, меньше активировалось полушарие, тем выше была степень нарушений движений пораженной руки [20]. У детей и подростков с двусторонней формой ДЦП десинхронизация мио-ритма при выполнении движений была больше, чем у здоровых сверстников, причем, чем сильнее были выражены нарушения, тем больше десинхронизация. Предполагают, что дети с билатеральной формой ДЦП нуждаются в большей степени активации неокортекса, чем пациенты с односторонней формой заболевания [21]. Также у таких пациентов была больше выражена десинхронизация бета-ритма. При этом более высокая степень подавления данного ритма в большинстве отведений была связана с лучшими показателями исполнения двигательных задач [22].

В последние годы было выполнено несколько работ, в которых для восстановления двигательных функций у детей с ДЦП применялись тренировки с использованием ИМК. В процессе лечебных сеансов ИМК контролируют паттерны ЭЭГ с помощью программы-классификатора и генерируют сигналы биологической обратной связи при воображении пациентами собственных движений. Обоснованием для применения таких тренировок является тот факт, что в реальном выполнении и кинестетическом представлении одних и тех же движений участвуют одни и те же нейронные структуры за исключением лишь моторного выхода, который в последнем случае тормозится [10, 23]. Основываясь на обратной связи в реальном времени, дети могут корректировать свои ментальные стратегии. В одной из работ для проведения тренировок у детей с ДЦП 8–12 лет применяли визуальную обратную связь (изменение цвета объектов и их движения в период воображения движений левой и правой руки) [8]. На протяжении серии сеансов было обнаружено увеличение мощности ЭЭГ в диапазоне 8–15 Гц, усредненной для центральных, теменных и височных областей. По мнению авторов, рост мощности ЭЭГ в этом диапазоне отражает торможение реального движения при его воображении. Такое изменение паттерна ЭЭГ считали индикатором улучшения обработки сенсомоторной информации.

В двух работах с использованием для нейрореабилитации комплекса «Экзоскелет-2» в качестве сигналов обратной связи выступали движения экзоскелета кисти. В одной из них показано, что при воображении движений в виде разгибания пальцев кисти во время первого сеанса у детей и подростков с ДЦП в большинстве отведений наблюдалась синхронизация ЭЭГ в диапазоне альфа-ритма (8–13 Гц). К концу серии тренировок из десяти сеансов происходило замещение реакций синхронизации на десинхронизацию, что свидетельствовало об увеличении активации неокортекса [24]. Также в процессе тренировок уменьшились различия в степени реактивности альфа-ритма у пациентов с левополушарным и правополушарным поражением. Выявленные перестройки паттерна ЭЭГ в частотной полосе альфа-ритма рассматривались авторами как проявление процессов благоприятной реорганизации нейронных цепей, контролирующих планирование и выполнение сложных движений рук.

В другой работе [12] анализировали свойства источников мио-ритма ЭЭГ детей и подростков при воображении движений во время управления ИМК. Средняя вероятность успешного распознавания воображаемых движений и состояния покоя во время сессий составила 0.51, но у отдельных детей доходила до 0.70. Участников, наиболее эффективно управлявших ИМК, характеризовала высокая доля сеансов, в которых уда-

лось идентифицировать источники мю-ритма. Показано, что чем больше десинхронизация ритма при воображении движения как сохранной, так и паретичной руки, тем выше точность управления ИМК.

Однако в исследованиях с применением ИМК не анализировались особенности двигательных или иных функций до и после комплексного лечения у тех детей, состояния которых определяли по паттерну ЭЭГ с разной, низкой или высокой степенью успешности. Также в указанных работах в процессе тренингов оценивалась динамика либо лишь альфа-диапазона мю-ритма [24], либо всего частотного диапазона сенсомоторных ритмов [12], а особенности изменений бета-активности в центральных и прилегающих к ним регионах не анализировалась. В связи с этим целью настоящего исследования явился анализ изменений сенсомоторных ритмов в процессе нейрореабилитации в мю- (8–13 Гц) и бета- (15–25 Гц) диапазонах частот, а также выявление особенностей восстановления двигательных функций у детей, процессы кинестетического представления движений или расслабления которых распознавались программной-классификатором с высокой и низкой степенью успешности.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика выборки. Исследования проводили в 2022–2023 гг. на базе центра «Технологии здоровья и реабилитации» Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского и Государственного бюджетного учреждения Республики Крым «Санаторий для детей и детей с родителями «Чайка» им. Гелимовичей». В исследованиях приняли участие 50 детей в возрасте от 7 до 15 лет (35 мальчиков и 15 девочек) с установленным диагнозом ДЦП и основной формой нарушений в виде спастической диплегии. У 36 из них преобладали нарушения двигательных функций правой, а у 14 – левой руки. Среди указанных пациентов отсутствовали дети с умственной отсталостью умеренной, тяжелой и глубокой степеней. Средний возраст испытуемых составил 10.0 ± 3.3 лет.

Дети проходили комплексное санаторно-курортное лечение с курсом нейрореабилитации из 10 сеансов с применением комплекса, включающего неинвазивный ИМК и экзоскелет кисти «Экзоскисть-2» (производства ООО «Экзопласт», Москва). Комплекс обеспечивает генерацию визуальных сигналов и формирование команд управления экзоскелетом кисти руки. В состав ИМК входил электроэнцефалограф Нейровизор БММ-52 («Медицинские Компьютерные Системы», Россия). Регистрацию ЭЭГ проводили монополярно с помощью хлорсеребряных датчиков в 32 отведениях, которые были расположены по неполной международной схеме 10–10. В процессе записи частота оцифровки ЭЭГ-сигналов составляла 500 Гц, а частоты среза фильтров высоких и низких частот – 5 и 30 Гц соответственно. Сопротивление электродов составляло менее 20 кОм. В качестве референтного использовался усредненный электрод.

Сеансы проводились через день по одинаковой схеме: три сессии по 8 мин с перерывом на отдых не менее 5 мин. Во время сеанса пациенты сидели в кресле перед компьютерным монитором, на котором им предъявляли визуальные инструкции. Кисти рук размещались внутри «рукавиц» экзоскелета. В центре экрана находилась круглая метка белого цвета, служившая для фиксации взгляда, и расположенные вокруг нее три стрелки, менявшие цвет для обозначения инструкций. Продолжительность активации каждой стрелки составляла 10 с. Пациент выполнял следующие команды: расслабиться, кинестетически воображать движение разгибания кисти левой или правой руки, воздерживаясь от их реального выполнения. В течение сеанса ситуации расслабления и воображения движений каждой руки повторяли 24 раза. Для создания конкретного кинестетического образа при воображении движений детям давали инструкцию: «Представь, что у тебя в руке маленький мячик, ты раскрываешь кисть и роняешь его. Почувствуй это движение». При успешном выполнении пациентом задания на пред-

ставление движения фиксирующая взор метка окрашивалась в зеленый цвет, экзоскелет выполнял соответствующее движение, и кисть руки пассивно разгибалась. Таким образом, генерировался комбинированный зрительный и кинестетический сигнал обратной связи (подробнее [13]).

Работа ИМК была основана на анализе в реальном режиме времени паттернов ЭЭГ, возникающих при кинестетическом воображении разгибания кисти. Для классификации состояний (воображаемых движений рук и расслабления) использовали различия ковариационных матриц ЭЭГ в терминах римановой метрики [25]. По окончании каждого сеанса отображалось соотношение правильно распознанных классификатором состояний к общему числу заданий. Поскольку, как мы предполагаем, это соотношение зависело от способности ребенка успешно представить себе движение, все пациенты были разделены на две группы – с низкой и высокой успешностью представления движения. Чтобы исключить эффекты новизны обстановки и сложности понимания задания, за основу для такого деления были взяты показатели последнего сеанса нейрореабилитации.

Для оценки изменений биоэлектрической активности головного мозга пациентов при прохождении курса комплексной терапии с применением нейрореабилитации использовали записи ЭЭГ, зарегистрированной над моторной и сенсомоторной областями коры и прилегающих к ним регионах в следующих отведениях: $F_3, F_2, F_4, FC_3, FC_2, FC_4, C_3, C_2, C_4, CP_3, CP_2, CP_4, P_3, P_2, P_4$. Анализировали изменения амплитуды мю- и бета-ритмов ЭЭГ в частотных диапазонах 8–13 и 15–25 Гц соответственно. Временные отрезки ЭЭГ, использованные для анализа, соответствовали времени предъявления пациенту визуальной инструкции о представлении движения и составляли 10 с. Участки записей ЭЭГ с амплитудой более 250 мкВ, а также отрезки, содержащие большое количество артефактов, исключались из обработки на основании визуального анализа. Безартефактные отрезки ЭЭГ разбивали на эпохи по 5 с с перекрытием 30% и подвергали быстрому преобразованию Фурье. Анализировали не менее 10 безартефактных эпох (общая продолжительность ЭЭГ не менее 50 с). При этом использовали программное обеспечение фирмы «Нейрософт» (Россия), входящее в комплект электроэнцефалографа «Нейрон-Спектр-5».

Для выявления изменений амплитуды мю- и бета-ритмов ЭЭГ у детей с ДЦП при прохождении курса нейрореабилитации рассчитывали индексы реактивности (ИР) в соответствии с формулой $ИР = \ln (B/A)$ [26], где B – амплитуда ритма на последнем сеансе, A – амплитуда ритма на первом сеансе. Для нормализации распределения применяли логарифмирование. Значения $ИР > 0$ свидетельствуют об увеличении амплитуды ритма на последнем сеансе по сравнению с первым (синхронизация), а $ИР < 0$ – о снижении амплитуды ритма (десинхронизация).

Для оценки двигательных функций были использованы:

1. Индекс Бартел, характеризующий возможности самостоятельного передвижения или самообслуживания пациента на основе результатов заполнения соответствующего опросника [27]. Чем выше возможности, тем выше балл (диапазон от 0 до 100 баллов).
2. Модифицированная шкала для определения двигательной функции верхних конечностей ребенка в быту (ABILHANDKids, «Возможности кисти –дети») [11]. Чем выше суммарный показатель (диапазон от 0 до 42 баллов), тем легче выполняет ребенок действия с предметами без посторонней помощи.
3. Модифицированная шкала Эшворта, отражающая степень сопротивления, встреченного при равномерном пассивном движении верхней конечности [28]. Оценке подвергались сгибатели локтевого сустава, сгибатели лучезапястного

сустава, поверхностный сгибатель пальцев. Чем выше суммарный показатель (диапазон от 0 до 18 баллов), тем выше спастичность мышц руки.

4. Шкала функционирования верхних конечностей (The Manual Ability Classification System, MACS) для определения уровня владения левой и правой рукой при манипулировании предметами [29]. Включает пять уровней, где самый высокий из них указывает на наиболее тяжелые нарушения.

Статистический анализ данных проводили с использованием программы STATISTICA v.12. Различия в ИР ритмов оценивали с помощью дисперсионного анализа с повторными измерениями (repeated measures ANOVA). Определяли влияние межсубъектного фактора – ГРУППА (2 уровня: группы детей с высокой и низкой успешностью) и внутрисубъектного фактора ЛОКУС (15 отведений ЭЭГ) по схеме 2×15 . Для оценки значимости изменений ИР в каждом из отведений ЭЭГ применяли метод априорных контрастов на основе сравнения средних значений наименьших квадратов.

Распределение иных показателей оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Если распределение не отличалось от нормального, статистические данные представляли в виде среднего и стандартного отклонения, а для сравнений применяли *t*-критерий Стьюдента. При отличии распределения от нормального статистические данные представляли в виде медианы и интерквартильного размаха $Me [Q1; Q3]$, а для оценки межгрупповых различий использовали *U*-критерий Манна-Уитни, внутригрупповых – *T*-критерий Вилкоксона. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для всех детей с ДЦП, принявших участие в исследовании, в заключительном сеансе нейрореабилитации точность классификации ЭЭГ паттернов правильно распознанных состояний (т.е. соответствующих предъявленной инструкции) для трех классов задач (воображаемых движений левой и правой руки, расслабления) получена в пределах от 0.30 до 0.68 при пороге случайных распознаваний 0.33. Значение медианы составило 0.395 [0.350; 0.480]. В группу с низкой успешностью были включены дети, вероятность правильно распознанных состояний которых не превышала 0.39. В эту группу вошло 25 детей (19 мальчиков и 6 девочек), средний возраст составил 9.0 ± 3.6 лет. В группу с высокой успешностью, для которой соотношение правильно распознанных состояний составило не менее 0.40, вошли 25 детей (16 мальчиков и 9 девочек, средний возраст 10.3 ± 2.9 лет). Различия между группами по возрасту не были статистически значимы ($p = 0.22$). В обеих группах преобладали пациенты с нарушением двигательных функций правой руки. Значения медиан и интерквартильного размаха показателя успешности заключительного сеанса для первой и второй групп составили 0.37 [0.31; 0.37] и 0.52 [0.43; 0.60] соответственно (различия статистически значимы при $p < 0.001$). Нужно отметить, что для группы с низкой успешностью этот показатель был статистически значимо ниже, чем у детей с высокой успешностью, уже на первом сеансе нейрореабилитации (0.37 [0.30; 0.41] и 0.46 [0.36; 0.56], $p < 0.05$). В результате прохождения комплексного лечения у детей группы с высокой успешностью показатель распознавания состояний статистически значимо ($p < 0.05$) вырос, а у детей из группы с низкой успешностью – изменился незначительно.

Дисперсионный анализ изменений амплитуды мю-ритма ЭЭГ при прохождении комплексного санаторно-курортного лечения с курсом нейрореабилитации выявил значимое влияние фактора ГРУППА ($F_{1,2} = 61.2$; $p = 0.02$) при представлении пациентами движений правой рукой. Так, у детей группы с высокой успешностью в данной ситуации амплитуды мю-ритма на последнем сеансе по сравнению с первым не изменилась, а у группы с низкой успешностью наблюдался рост амплитуды указанного ритма (рис. 1а).

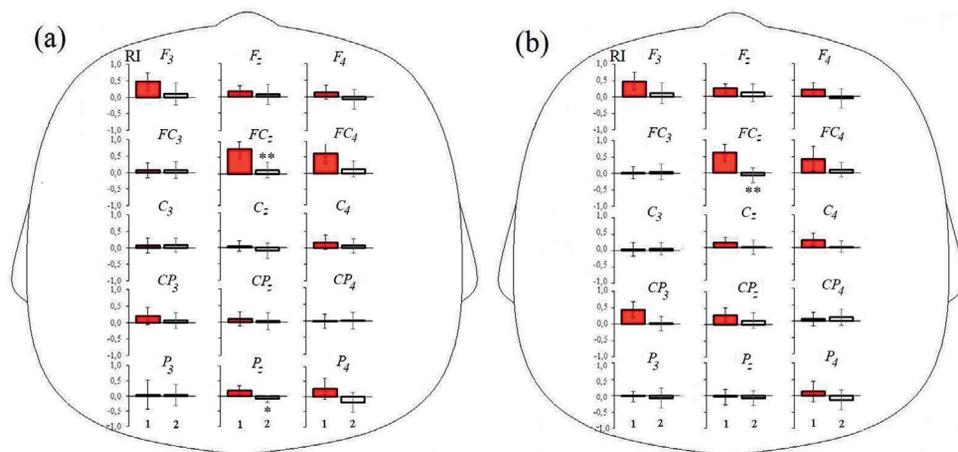


Рис. 1. Индексы реактивности (RI), отражающие изменение мю- (а) и бета-ритмов (б) ЭЭГ при прохождении курса реабилитации с использованием роботизированного комплекса в ситуации представления движений правой рукой у детей групп с низкой (красные столбцы) и высокой (белые столбцы) успешностью. Приведены средние значения и ошибки средних. Различия индексов реактивности у детей двух групп: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

В диапазоне бета-ритма ЭЭГ при представлении движений правой руки также обнаружено значимое влияние фактора ГРУППА ($F_{1,2} = 29.1$; $p = 0.03$) (рис. 1б).

Анализ различий в изменении амплитуды ЭЭГ при прохождении первого и заключительного сеанса комплексной реабилитации в ситуации представления движений левой рукой не выявил значимого влияния фактора ГРУППА на динамику мю- ($F_{1,2} = 0.19$; $p = 0.70$) и бета-ритмов ($F_{1,2} = 16.3$; $p = 0.06$). Также не выявлено значимого влияния данного фактора при выполнении испытуемыми команды, предписывающей расслабиться.

Показатели двигательных функций участников исследования до и после комплексной терапии приведены в табл. 1. Представленные данные свидетельствуют о том, что прохождение курса комплексной терапии с применением нейрореабилитации привело к статистически значимым улучшениям состояния детей обеих групп: росту способности к самообслуживанию по шкале Бартел и суммарному показателю «Возможности кисти – дети». При этом отметим, что значимое снижение спастичности мышц правой руки по шкале Эшворт и рост способности манипулировать предметами левой и правой рукой по шкале MACS выявлены лишь у группы с высокой успешностью представления движений.

Как видно из представленных в табл. 1 показателей, двигательные функции двух исследованных групп имели заметные особенности. Так, индекс Бартел и суммарный показатель «Возможности кисти – дети» у пациентов группы с высокой успешностью были статистически значимо выше еще до начала комплексной терапии, и эти различия сохранились после ее завершения. После завершения курса дети группы с высокой успешностью, в отличие от пациентов другой группы, достигли статистически значимо более высокого уровня владения левой рукой при манипулировании предметами (шкала MACS).

Таблица 1. Показатели двигательных функций у детей исследуемых групп до и после прохождения комплексного санаторно-курортного лечения с курсом нейрореабилитации

Показатель	Группа с низкой успешностью	Группа с высокой успешностью		
	До	После	До	После
Индекс Бартел	45 [5; 55]	60** [15; 80]	80** [65; 90]	90**** [75; 100]
Суммарный показатель «Возможности кисти – дети»	14 [0; 28]	17** [2; 32]	27* [22; 36]	35**** [25; 38]
Шкала Эшворт, левая рука	3.0 [3; 6]	3.0 [3; 6]	3.0 [3; 3]	3.0 [0; 3]
Шкала Эшворт, правая рука	5.5 [3; 6]	3.5 [1; 6]	5.0 [3; 6]	4.0*** [3; 5]
Шкала MACS, левая рука	2 [2; 3]	2 [1; 2]	2 [1; 2]	1**** [1; 1]
Шкала MACS, правая рука	2 [2; 3]	2 [1; 3]	2 [2; 3]	2** [1; 2]

Приведены медианы, в скобках – верхний и нижний квартили. Указаны статистически значимые изменения показателя относительно исходного значения соответствующей группы: ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, а также различия между показателями групп: * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$. Значения показателей шкал, где есть клинические улучшения, выделены жирным шрифтом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты настоящего исследования показали, что вероятность распознавания программой классификатором состояний кинестетического представления движений у разных детей с ДЦП и в первом, и в завершающем сеансе курса нейрореабилитации значительно отличается. Одной из причин таких различий может быть неодинаковая способность участников исследования к воображению движений руки. Можно предположить, что при недостаточной способности к представлению движений паттерн ковариационных матриц ЭЭГ детей группы с низкой успешностью при выполнении команд на кинестетическое воображение движений разгибания кисти левой или правой руки менялся меньше, что не позволяло классификатору правильно определить состояние, заданное пациенту инструкцией. Как отмечалось выше, доля правильно определенных классификатором состояний для этой группы в завершающем сеансе не превышала 0.39, что незначительно отличается от случайного показателя 0.33 для выполнения трех команд. Затруднять распознавание классификатором паттернов ЭЭГ могли также недостаточная мотивация и, как следствие, низкая способность ребенка к поддержанию внимания на воображаемых двигательных образах в течение временного периода предъявления команды, а также неспособность избежать произвольных движений тела, что приводило к росту мышечных артефактов и нарушало работу нейронтер-

фейса. На неравноценные, в том числе пониженные способности к выполнению задач на воображение движений у детей с ДЦП, указывают и другие авторы [10, 23, 30].

Для группы с высокой успешностью нами отмечен статистически значимый рост выявления состояний программой классификатором в завершающем сеансе курса по сравнению с первым сеансом. Можно предположить, что дети этой группы, пользуясь сигналом обратной связи (движение рукавицы экзоскелета, изменение цвета метки, фиксирующей взор), более эффективно обучались управлению своим состоянием, поддерживали и даже улучшали способность к генерации соответствующих кинестетических образов.

Величины ИР, отражающие изменение мю- и бета-ритмов ЭЭГ при проведении завершающего сеанса по отношению к первому, у детей группы с высокой успешностью были близки к единице (см. рис. 1), т.е. степень синхронизации/десинхронизации сенсомоторных ритмов в процессе нейрореабилитации оставалась стабильной. Если учесть, что активация моторных областей коры отражает не только выполнение, но и внутреннее моделирование движений [7, 31], особенности динамики паттерна ЭЭГ еще раз указывают – дети этой группы на протяжении курса нейрореабилитации поддерживали необходимый уровень представления двигательных образов.

Показатели ИР сенсомоторных ритмов у детей исследованных групп достигали статистически значимых различий в сагиттальных отведениях лобно-центральных, а также теменных областей неокортекса: для мю-ритма в локусах FC_z и P_z , для бета-ритма – в FC_z . Отведение FC_z отражает активность верхней лобной извилины, являющейся частью премоторной коры, а локус P_z – активность предклинья (precuneus), части теменной доли [32]. Ранее у детей с ДЦП показана особая роль премоторной коры при выполнении задач на кинестетическое воображение движений – ее активация у таких детей была выше, чем у здоровых сверстников [33]. Предклинье, в свою очередь, является важным корковым центром эгоцентрического представления окружающего пространства и собственных движений в нем [34]. Рост десинхронизации альфа-ритма в области предклинья у другой группы детей с ДЦП в процессе нейрореабилитации уже отмечался нами в предыдущем исследовании [24]. Нейроны лобно-центральных и теменных регионов образуют так называемую лобно-теменную двигательную сеть, которая активна при представлении и планировании движений [23, 35]. Работа с применением функциональной томографии показала повышенную активацию этих областей у детей с ДЦП при проведении интенсивного обучения выполнению действий пораженной конечностью [36]. Можно предположить, что обнаруженные нами различия в ИР сенсомоторных ритмов ЭЭГ в процессе курса нейрореабилитации связаны с особенностями перестройки активации лобно-теменных двигательных сетей у детей сравниваемых групп.

В нашем исследовании степень синхронизации/десинхронизации сенсомоторных ритмов ЭЭГ у детей успешной группы сохранялась, указывая на стабильный уровень активности лобно-теменной сети. Такая активность благоприятствует нейропластичности, то есть появлению стойких структурных и функциональных изменений нервной системы в ответ на внутренние и внешние раздражители [4]. Нейропластичность связывают с ультраструктурными изменениями нервной ткани, включающими модификацию дендритной архитектуры или силы синапсов.

Как видно из рис. 1, характер изменений ИР мю- и бета-ритмов при прохождении комплексной реабилитации у детей с ДЦП демонстрировал значительное сходство. Считают [18, 19], что мю-ритм в основном отражает сенсомоторные функции, в то время как бета-компонент более тесно связан с моторным кортикальным контролем. Причиной обнаруженного в нашем исследовании сходства паттерна изменений мю- и бета-ритмов может быть сопряженность их динамики в процессе кинестетического представления движений. Параллельные изменения мощности в альфа- и бета-диапазонах при реализации задач на воображение движений при ходьбе выявлены у здоровых испытуемых. При этом степень десинхронизации ЭЭГ в указанных диапазонах росла по мере усложнения

двигательных задач [37] и зависела от способности к зрительному воображению движений, определяемой с помощью психологических тестов [38].

Ранее было установлено, что применение в реабилитационном процессе интерфейса «мозг – компьютер – экзоскелет кисти» приводит у пациентов с ДЦП к снижению спастичности верхних конечностей и улучшению их двигательных функций [11, 12]. В случае, если в исследованиях присутствовала контрольная группа пациентов, получавшая традиционное санаторно-курортное лечение, статистически значимые положительные изменения показателей отмечены только у группы пациентов, прошедших комплексную терапию с курсом нейрореабилитации [11, 13]. Настоящее исследование подтверждает результаты предыдущих работ и впервые показывает, что группа пациентов, состояния которых классификатор определяет более эффективно, благодаря успешному представлению ими движений, достигает более высоких показателей реабилитации двигательной сферы.

У детей менее успешной группы амплитуда сенсомоторных ритмов в лобно-центральных, а также теменных областях неокортекса в завершающем сеансе значительно увеличилась. Рост синхронизации сенсомоторных мио- и бета-ритмов рассматривают как отражение процессов торможения в областях неокортекса, контролирующих моторные функции [2, 19]. Возможными причинами повышения амплитуды таких ритмов и усиления тормозных реакций в указанных областях коры на протяжении завершающего сеанса может быть снижение мотивации пациентов в процессе курса реабилитации и, как следствие, снижение внимания к выполнению задачи на воображение движения. Как указано выше, программа-классификатор распознает состояния пациентов на основании различий ковариационных матриц ЭЭГ. Мы предполагаем, что развитие торможения в ряде корковых областей, участвующих в кинестетическом представлении движений, приводит к снижению взаимодействия нейронов лобно-теменных сетей, что в свою очередь приводит к уменьшению различий ковариационных матриц состояний покоя и воображения движений.

У группы детей с низкой успешностью под влиянием комплексного лечения развивались благоприятные изменения двигательных функций, но в меньшей степени, чем у детей, чьи состояния программа-классификатор различала эффективнее. У пациентов данной группы не было выявлено статистически значимых изменений показателей по шкалам Эшворт и MACS (см. табл. 1). Нужно отметить, что еще до начала курса реабилитации участники исследования с низкой успешностью отличались более низкими показателями способностей к самообслуживанию и манипулированию предметами, т.е. у них в большей степени была нарушена координация движений. Возможно, таким детям приходилось прилагать больше усилий, чтобы не допустить произвольных движений во время их мысленного представления, что и вело к синхронизации сенсомоторных ритмов. Мы считаем, что для повышения успешности комплексного санаторно-курортного лечения необходимо особое внимание обращать на тех детей с ДЦП, которые имеют следующие особенности: более высокие баллы по шкалам Эшворт и MACS и, судя по результатам работы программы-классификатора во время первого сеанса нейрореабилитации, наименьшую степень способности к кинестетическому воображению движений. В дальнейшем необходимо разработать дополнительные меры по повышению мотивации таких детей к достижению успеха при выполнении задач на воображение движений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование подтверждает результаты предыдущих работ об эффективности комплексного санаторно-курортного лечения ДЦП с курсом нейрореабилитации на основе применения неинвазивного интерфейса «мозг – компьютер – экзоскелет кисти». Разделение пациентов на две группы – с низкой и высокой успешностью

представления движения по соотношению правильно распознанных классификатором состояний показало, что реактивность сенсомоторных ритмов у детей исследованных групп достигала статистически значимых различий в сагиттальных отведениях лобно-центральных и теменных областей неокортекса. Эти области относятся к так называемой лобно-теменной двигательной сети, которая активна при представлении и планировании движений. У детей группы с низкой успешностью в указанных областях на последнем сеансе курса по сравнению с первым наблюдался рост амплитуды сенсомоторных ритмов, свидетельствующий о развитии торможения в лобно-теменной двигательной сети. У детей группы с высокой успешностью в этих областях амплитуды мю- и бета-ритма к последнему сеансу не менялись, т.е. степень синхронизации/десинхронизации сенсомоторных ритмов при представлении движений в процессе курса нейрореабилитации оставалась стабильной. Программа-классификатор, чья работа основана на анализе ковариационных матриц, с большей вероятностью распознавала состояния детей этой группы в процессе представления движений в завершающем сеансе курса по сравнению с первым сеансом, благодаря чему такие пациенты лучше управляли ИМК. Мы предполагаем, что дети этой группы не только способны лучше кинестетически вообразить движения на протяжении всего курса нейрореабилитации, но и, основываясь на сигналах обратной связи, обучаются эффективно корректировать свои стратегии представления движений.

Пациенты, состояния которых классификатор определяет более точно, достигают более высоких показателей реабилитации двигательной сферы. Это указывает на необходимость принятия дополнительных мер с целью повышения мотивации детей той группы, чьи состояния определяются менее успешно. Например, для них можно попытаться дополнительно создавать игровые ситуации, стимулировать небольшими подарками успешность выполнения задач. Для уменьшения числа произвольных движений, создающих артефакты и мешающих работе классификатора, целесообразно уделить особое внимание снижению тревожности детей этой группы.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

В. Б. П., С. В. В., Е. Н. Ч.– идея работы, планирование исследования, написание статьи. А. И. К., Л. С. О., Е. А. Б., Д. В. П.– набор и обработка данных, написание статьи. Ш. Э. Т.– набор и обработка данных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств гранта Российского научного фонда и Республики Крым № 22–15–20035, <https://rscf.ru/project/22-15-20035/>. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Комитетом по этике Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского (г. Симферополь), протокол № 1 от 25 января 2022 г.

Родители каждого участника исследования дали добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McIntyre S, Goldsmith S, Webb A, Ehlinger V, Hollung SJ, McConnell K, Arnaud C, Smithers-Sheedy H, Oskoui M, Khandaker G, Himmelmann K* (2022) Global prevalence of cerebral palsy: A systematic analysis. *Dev Med Child Neurol* 64(12): 1494–1506.
<http://doi.org/10.1111/dmcn.15346>
2. *Démas J, Bourguignon M, Périvier M, De Tiège X, Dinomais M, Van Bogaert P* (2020) Mu rhythm: State of the art with special focus on cerebral palsy. *Ann Phys Rehabil Med* 63(5): 439–446.
<https://doi.org/10.1016/j.rehab.2019.06.007>
3. *Aisen ML, Kerkovich D, Mast J, Mulroy S, Wren TA, Kay RM, Rethlefsen SA* (2011) Cerebral palsy: clinical care and neurological rehabilitation. *Lancet Neurol* 10(9): 844–852.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70176-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70176-4)
4. *Sadowska M, Sarecka-Hujar B, Kopyta I* (2020) Cerebral Palsy: Current Opinions on Definition, Epidemiology, Risk Factors, Classification and Treatment Options. *Neuropsychiatr Dis Treat* 16: 1505–1518.
<https://doi.org/10.2147/NDT.S235165>
5. *Patel DR, Neelakantan M, Pandher K, Merrick J* (2020) Cerebral palsy in children: a clinical overview. *Transl Pediatr* 9(1): 125–135.
<https://doi.org/10.21037/tp.2020.01.01>
6. *Аурафова УШ, Куприянова ОС, Кармазина ЕК, Клочкова ОА, Мамедьяров АМ, Комарова ЕВ, Иварова МИ, Каркашадзе ГА* (2023) Персонализированный подход к применению методов роботизированной механотерапии у детей с церебральным параличом разных возрастных групп: обзор литературы. *Педиатр фармакол* 20(6): 588–596. [*Ashraphova USh, Kupriianova OS, Karmazina EK, Klochkova OA, Mamedieiarov AM, Komarova EV, Ivardava MI, Karkashadze GA* (2023) A personalized approach to application of robotic mechanotherapy methods in children with cerebral palsy of different age groups (review). *Pediatr farmakol* 20(6): 588–596. (In Russ)].
<https://doi.org/10.15690/pf.v20i6.2668>
7. *Errante A, Di Cesare G, Pinardi C, Fasano F, Sghedoni S, Costi S, Ferrari A, Fogassi L* (2019) Mirror Neuron System Activation in Children With Unilateral Cerebral Palsy During Observation of Actions Performed by a Pathological Model. *Neurorehabil Neural Repair* 33(6): 419–431.
<https://doi.org/10.1177/1545968319847964>
8. *Xie J, Jiang L, Li Y, Chen B, Li F, Jiang Y, Gao D, Deng L, Lv X, Ma X, Yin G, Yao D, Xu P* (2021) Rehabilitation of motor function in children with cerebral palsy based on motor imagery. *Cogn Neurodyn* 15(6): 939–948.
<https://doi.org/10.1007/s11571-021-09672-3>
9. *Xie YL, Yang YX, Jiang H, Duan XY, Gu LJ, Qing W, Zhang B, Wang YX* (2022) Brain-machine interface-based training for improving upper extremity function after stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Neurosci* 16: 949575.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2022.949575>
10. *Fedotova IR, Bobrov PD* (2022) Foundation and aspects of using motor imagery and brain computer interfaces in rehabilitation of children with cerebral palsy. *IP Pavlov J Higher Nerv Activity* 72(1): 87–99.
<https://doi.org/10.31857/S004446772201004X>.
11. *Ларина НВ, Корсунская ЛЛ, Власенко СВ* (2019) Комплекс «Экзокисть-2» в реабилитации верхней конечности при детском церебральном параличе с использованием неинвазивного интерфейса «мозг-компьютер». *Нервно-мышечн болезни* 11(4): 12–20. [*Larina NV, Korsunskaya LL, Vlasenko SV* (2019) The “Exo hand-2” complex in the rehabilitation of the upper limb in cerebral palsy using the non-invasive interface “brain-computer”. *Nervno-myshechn bolezni* 11(4): 12–20. (In Russ)].
<https://doi.org/10.17650/2222-8721-2019-9-4-44-50>
12. *Bobrov PD, Biryukova EV, Polyayev BA, Lajsheva OA, Usachjova EL, Sokolova AV, Mikhailova DI, Dement'eva KN, Fedotova IR* (2020) Rehabilitation of patients with cerebral palsy using hand exoskeleton controlled by brain-computer interface. *Bull RSMU4*: 33–40.
<https://doi.org/10.24075/brsmu.2020.047>
13. *Pavlenko VB, Vlasenko SV, Orekhova LS, Biryukova EA* (2023) Speech improvement in children with cerebral palsy by "brain-computer-hand exoskeleton" neurointerface rehabilitation. *Bull RSMU* (4): 62–67.
<https://doi.org/10.24075/brsmu.2023.026>
14. *Kulak W, Sobaniec W, Kuzia JS, Boćkowski L* (2006) Neurophysiologic and neuroimaging studies of brain plasticity in children with spastic cerebral palsy. *Exp Neurol* 198(1): 4–11.
<http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.11.014>

15. *Jenson D, Bowers AL, Hudock D, Saltuklaroglu T* (2020) The Application of EEG Mu Rhythm Measures to Neurophysiological Research in Stuttering. *Front Hum Neurosci* 10(13): 458. <http://doi.org/10.3389/fnhum.2019.00458>
16. *Hari R, Salmelin R* (1997) Human cortical oscillations: a neuromagnetic view through the skull. *Trends Neurosci* 20: 44–49. [http://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)10065-5](http://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)10065-5)
17. *Stolk A, Brinkman L, Vansteensel MJ, Aarnouse E, Leijten FS, Dijkerman CH, Knight RT, de Lange FP, Toni I* (2019) Electrocoricographic dissociation of alpha and beta rhythmic activity in the human sensorimotor system. *Elife* 8: e48065. <https://doi.org/10.7554/eLife.48065>
18. *Angelini M, Fabbri-Destro M, Lopomo NF, Gobbo M, Rizzolatti G, Avanzini P* (2018) Perspective-dependent reactivity of sensorimotor mu rhythm in alpha and beta ranges during action observation: an EEG study. *Scient Rep* 8(1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30912-w>
19. *Larionova EV, Garakh ZhV, Zaytseva YS* (2022) Mu-rhythm in contemporary research: theoretical and methodological aspects. *IP Pavlov J Higher Nerv Activity* 72(1): 11–35. <https://doi.org/10.31857/S0044467722010051>
20. *Kukke SN, de Campos AC, Damiano D, Alter KE, Patronas N, Hallett M* (2015) Cortical activation and inter-hemispheric sensorimotor coherence in individuals with arm dystonia due to childhood stroke. *Clin Neurophysiol* 126(8): 1589–98. <http://doi.org/10.1016/j.clinph.2014.11.002>
21. *Hinchberger V, Kang SH, Kline J, Stanley CJ, Bulea TC, Damiano DL* (2023) Investigation of brain mechanisms underlying upper limb function in bilateral cerebral palsy using EEG. *Clin Neurophysiol* 151: 116–127. <http://doi.org/10.1016/j.clinph.2023.04.006>
22. *Phillips C, Kline J, Stanley CJ, Bulea TC, Damiano DL* (2023) Children With Bilateral Cerebral Palsy Exhibit Bimanual Asymmetric Motor Deficits and EEG Evidence of Dominant Sensorimotor Hemisphere Overreliance During Reaching. *Neurorehabil Neural Repair* 37(9): 617–627. <https://doi.org/10.1177/15459683231195044>
23. *Galli J, Garofalo G, Brunetti S, Loi E, Portesi M, Pelizzari G, Rossi A, Fazzi E, Buccino G* (2022) Children with Cerebral Palsy can imagine actions like their normally developed peers. *Front Neurol* 6(13): 951152. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.951152>
24. *Larina NV, Nacharova MA, Korsunskaya LL, Vlasenko SV, Pavlenko VB* (2020) Changes in EEG patterns in the α -frequency band following BCI-based therapy in children with cerebral palsy. *Bull RSMU* (4): 41–46. <http://doi.org/10.24075/brsmu.2020.043>
25. *Congedo M, Barachant A, Bhatia R* (2017) Riemannian geometry for EEG-based brain-computer interfaces: a primer and a review. *Brain-Comput Interfac* 4(3): 155–174. <https://doi.org/10.1080/2326263X.2017.1297192>
26. *Raymaekers R, Wiersema JR, Roeyers H* (2009) EEG study of the mirror neuron system in children with high functioning autism. *Brain Res* 1304: 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.068>
27. *Mahoney FI, Barthel DW* (1965) Functional evaluation: The Barthel index. *Md State Med J* 14: 61–65.
28. *Супонева НА, Юсупова ДГ, Ильина КА, Мельченко ДА, Бутковская АА, Жирова ЕС, Таратухина АС, Зимин АА, Зайцев АБ, Клочков АС, Люкманов РХ, Котов-смоленский АМ, Хижникова АЕ, Гатина ГА, Кутлубаев МА, Пирадов МА* (2020) Валидация Модифицированной шкалы Эшворта (Modified Ashworth Scale) в России. *Анналы клин эксперим неврол* 14(1): 89–96. [*Suponeva NA, Yusupova DG, Ilyina KA, Melchenko DA, Butkovskaya AA, Zhirova ES, Taratukhina AS, Zimin AA, Zaitsev AB, Klochkov AS, Lyukmanov RKH, Kotov-Smolensky AM, Khizhnikova AE, Gatina GA, Kutlubayev MA, Piradov MA* (2020) Validation of the Modified Ashworth scale in Russia. *Ann klin eksper nevrolog* 14(1): 89–96. (In Russ)]. <https://doi.org/10.25692/acen.2020.1.10>
29. *Eliasson AC, Krumlind-Sundholm L, Rösblad B, Beckung E, Arner M, Ohrvall AM, Rosenbaum P* (2006) The Manual Ability Classification System (MACS) for children with cerebral palsy: scale development and evidence of validity and reliability. *Dev Med Child Neurol* 48(7): 549–554.
30. *Miziara IM, Lopes JBP, Lazzari RD, de Moura RCF, Albuquerque MB, Oliveira C, Navesa ELM* (2019) Comparison of MU rhythm desynchronisation between children with right-side and left-side hemiparetic cerebral palsy during a voluntary movement: case study. *Gait & Posture* 73(1): 306–307. <https://doi.org/10.1016/j.gaitpost.2019.07.176>

31. *Jongsma MLA, Steenbergen B, Baas CM, Aarts PB, van Rijn CM* (2020) Lateralized EEG mu power during action observation and motor imagery in typically developing children and children with unilateral Cerebral Palsy. *Clin Neurophysiol* 131(12): 2829–2840.
<http://doi.org/10.1016/j.clinph.2020.08.022>
32. *Koessler L, Maillard L, Benhadid A, Vignal JP, Felblinger J, Vespignani H, Braun M* (2009) Automated cortical projection of EEG sensors: anatomical correlation via the international 10–10 system. *Neuroimage* 46(1): 64–72.
<http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.02.006>
33. *Shin YK, Lee DR, Hwang HJ, You SJ, Im CH* (2012) A novel EEG-based brain mapping to determine cortical activation patterns in normal children and children with cerebral palsy during motor imagery tasks. *NeuroRehabil* 31(4): 349–355.
<https://doi.org/10.3233/NRE-2012-00803>
34. *Dordevic M, Hoelzer S, Russo A, Garcia Alanis JC, Müller NG* (2022) The Role of the Precuneus in Human Spatial Updating in a Real Environment Setting – A cTBS Study. *Life* 12(8): 1239.
<https://doi.org/10.3390/life12081239>
35. *Ogawa T, Shimobayashi H, Hirayama JI, Kawanabe M* (2022) Asymmetric directed functional connectivity within the frontoparietal motor network during motor imagery and execution. *Neuroimage* 247: 118794.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.118794>
36. *Araneda R, Dricot L, Ebner-Karestinis D, Paradis J, Gordon AM, Friel KM, Bleyenheuft Y* (2021) Brain activation changes following motor training in children with unilateral cerebral palsy: An fMRI study. *Ann Phys Rehabil Med* 64(3): 101502.
<https://doi.org/10.1016/j.rehab.2021.101502>
37. *Putzolu M, Samogin J, Cosentino C, Mezzarobba S, Bonassi G, Lagravinese G, Vato A, Mantini D, Avanzino L, Pelosin E* (2022) Neural oscillations during motor imagery of complex gait: an HdEEG study. *Sci Rep* 12(1): 4314.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-07511-x>
38. *Putzolu M, Samogin J, Bonassi G, Cosentino C, Mezzarobba S, Botta A, Avanzino L, Mantini D, Vato A, Pelosin E* (2024) Motor imagery ability scores are related to cortical activation during gait imagery. *Sci Rep* 14(1): 5207.
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-54966-1>

EEG Sensorimotor Rhythms Dynamics in Children with Cerebral Palsy During the Course of Neurorehabilitation, Depending in the Success of Their Imagination of Movements

V. B. Pavlenko^{a, *}, S. V. Vlasenko^{a, b}, E. N. Chuyan^a, A. I. Kaida^a, L. S. Orekhova^a,
E. A. Birukova^a, D. V. Pavlenko^a and S. E. Tataris^a

^aVernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

^bResearch institute of children's balneology, physiotherapy and medical rehabilitation, Evpatoria, Russia

*e-mail: vpav55@gmail.com

An analysis of changes in sensorimotor rhythms of the electroencephalogram (EEG) and features of the restoration of motor functions during a course of neurorehabilitation using a non-invasive brain-computer-hand exoskeleton interface was carried out in 50 children aged 7–15 years of both sexes suffering from cerebral palsy (CP). EEG was recorded in 32 leads under conditions of rest and kinesthetic imagination of hand extension movements. Depending on the success of the classifier program in determining imaginary states based on the EEG pattern, the children were divided into two groups – with high and low success when imagining movements. In children of the studied groups, when undergoing a course of neurorehabilitation, differences were revealed in the nature of changes in EEG amplitude in the sensorimotor mu (8–13 Hz) and beta (15–25 Hz) rhythms frequency ranges. When imagining movements of the right hand, intergroup differences for the mu rhythm reached the level of statistical significance in the medial electrodes of the fronto-central and parietal areas of the neocortex, for the beta rhythm – in the medial lead of the parietal region. Children in the group with high success showed a decrease or slight increase in the amplitude of the mu- and beta rhythm in these brain areas at the last session of the course compared to the first. We hypothesize that children in this group are not only better able to kinesthetically imagine movements throughout the course of neurorehabilitation, but also, based on feedback signals, learn to effectively adjust their strategies for movement imagination. Children in the group with low success showed an increase in the amplitude of sensorimotor rhythms in these brain areas, indicating the development of inhibition in the frontoparietal motor network. Patients, whose conditions were determined more accurately by the classifier, achieved higher rates of motor rehabilitation. The results of the study are important for clarifying the brain mechanisms of motor functions restoration in patients with cerebral palsy under the influence of a course of neurorehabilitation.

Keywords: cerebral palsy, electroencephalogram, brain-computer interface, mu- and beta rhythm, neurorehabilitation

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

© 2024 г. М. Б. Пази^{1, *}, И. В. Екимова¹

¹*Институт 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 Aβeta 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 апирогенном 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 интактным животным, не подвергавшимся ОС (рис. 1).

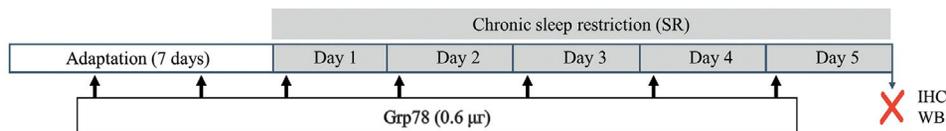


Рис. 1. Схема эксперимента. Adaptation (7 days) – адаптация животных в течение 7 дней. Chronic sleep restriction (SR) – хроническое ограничение сна. Day 1–5 – 1–5 сутки ограничения сна. IHC – immunohistochemistry, взятие биоматериала головного мозга для иммуногистохимического анализа. WB – western-blotting,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

Иммуногистохимическое исследование

Сразу после окончания процедуры депривации сна крыс наркотизировали (Zoletil®; внутримышечно, 75 мг/кг) и декапитуировали. 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% H₂O₂ 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 мМ Трис–HCl, pH 7.5; 150 мМ NaCl; 0.5% Triton X-100; 2 мМ 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 М Трис–HCl, pH 6.8; 10% глицерина; 2% SDS; 0.1 мМ 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 сывороточный 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 неспецифического 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 хемиллюминесцентного 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, НИИ, 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 (кЧС), 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

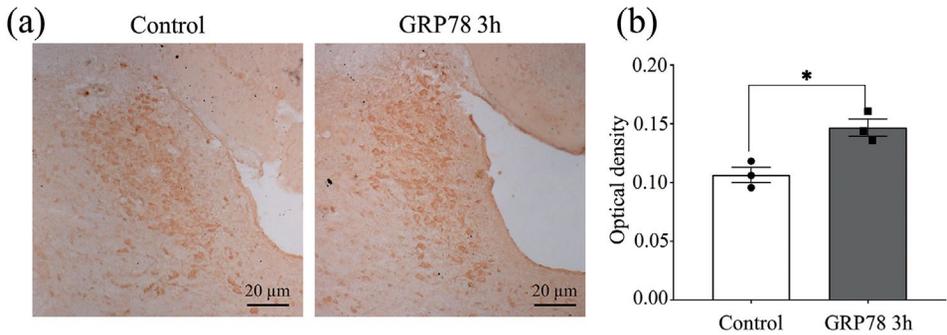


Рис. 2. Экзогенный GRP78, введенный интраназально, накапливается в нейронах голубого пятна у крыс в контрольных условиях. (a) – репрезентативные микрофотографии голубого пятна. (b) – оптическая плотность нейронов голубого пятна. Данные представлены как среднее ± ошибка среднего. Control – контрольные 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.

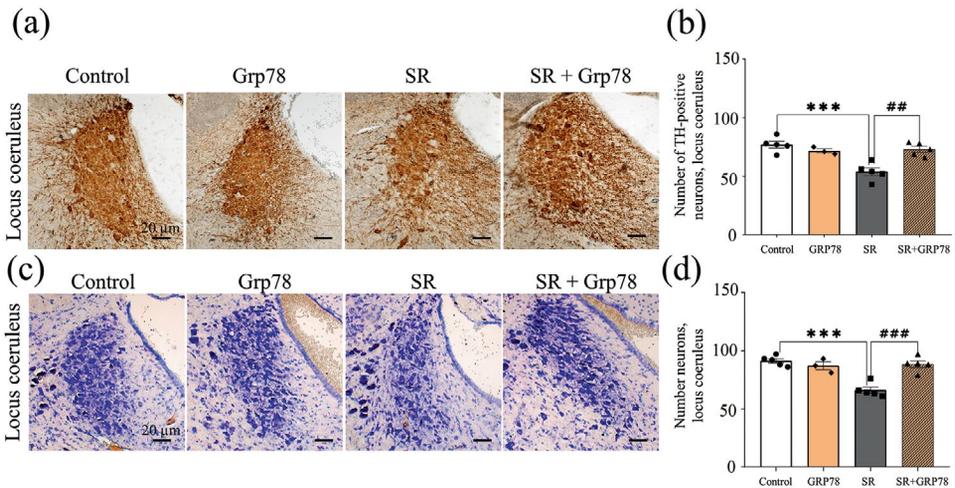


Рис. 3. Интраназальное введение экзогенного GRP78 препятствует дегенерации норадренергических нейронов голубого пятна в модели хронического ограничения сна. (a, c) – репрезентативные микрофотографии голубого пятна, (b) – количество ТГ-позитивных нейронов в голубом пятне, (d) – количество нейронов, окрашенных по методу Ниссля в голубом пятне. Данные представлены как среднее ± 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-эргических 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 Нисслию.

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 Нисслию (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.

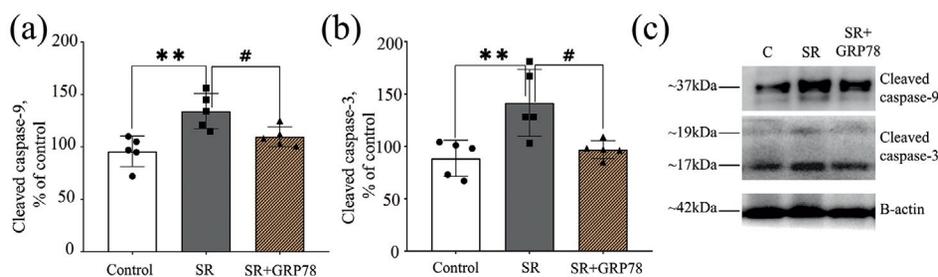


Рис. 4. Интраназальное введение экзогенного GRP78 предотвращает развитие апоптоза в модели хронического ограничения сна. (a) – содержание расщепленной каспазы-9, (b) – содержание расщепленной каспазы-3, (c) – репрезентативные иммуноблоты. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего. Control – 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-hoc 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.

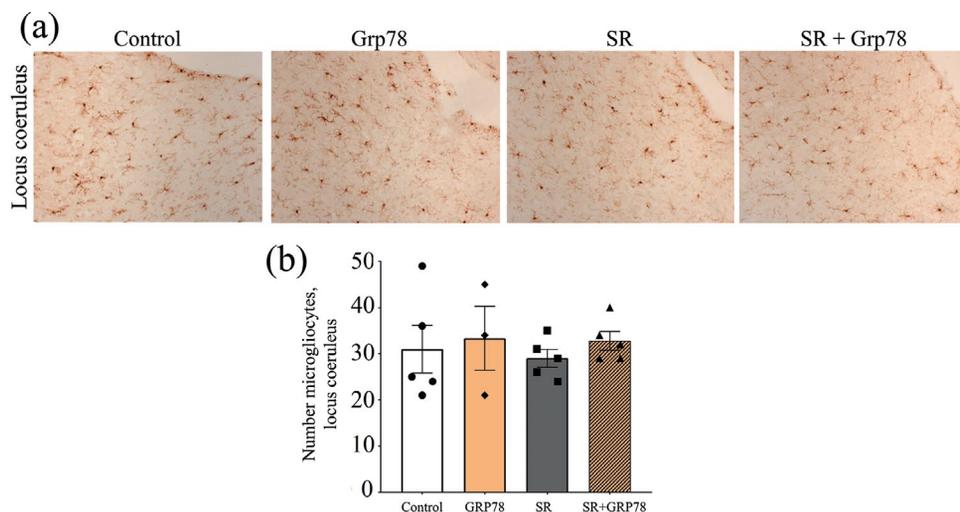


Рис. 5. Ограничение сна и интраназальное введение GRP78 не оказывают влияния на состояние микроглии в голубом пятне. (a) – репрезентативные микрофотографии голубого пятна, (b) – количество Iba-1-позитивных микроглиоцитов в голубом пятне. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего. Control – 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 миелоидных 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 тегментальной 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 глимфатического 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 глимфатической 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 глимфатический 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, Gimoty 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 pathophysiology. *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 in 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. *Somarajan 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-Guitar 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): zsa108.
<https://doi.org/10.1093/sleep/zsaa108>
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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАКТОФЕРРИНА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ
И ВОССТАНОВЛЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ КОСТНОЙ ТКАНИ У КРЫС
WISTAR В УСЛОВИЯХ ОПОРНОЙ РАЗГРУЗКИ

© 2024 г. К. В. Гордиенко^{1,*}, Н. А. Лукичёва¹, А. И. Ахметзянова², А. К. Колупаев³,
О. А. Саченков², Т. В. Балтина², Е. Р. Садчикова³, Г. Ю. Васильева¹

¹Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

*E-mail: k.vl.gordienko@gmail.com

Поступила в редакцию 15.04.2024 г.

После доработки 02.07.2024 г.

Принята к публикации 18.07.2024 г.

Изучено влияние гравитационной разгрузки (антиортостатического вывешивания) и последующего восстановления на минеральную плотность и механические свойства бедренной и большеберцовой костей крыс Wistar при пероральном приеме биотехнологического аналога лактоферрина человека (200 мг/кг), выделенного из молока коз-производителей. Минеральную плотность костей определяли методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии, прочность и жесткость – исследованиями костей на трехточечный изгиб. Показано, что гравитационная разгрузка в течение 21 суток приводила к снижению минеральной плотности большеберцовой и бедренной костей. Применение лактоферрина значимо не повлияло на минеральную плотность и проекционную площадь исследуемых костей. Статистически значимых различий между экспериментальными группами по значению механической жесткости обнаружено не было, но при этом у животных после реадaptации предел прочности был значимо выше в группах, получавших лактоферрин. Полученные результаты могут свидетельствовать о перспективности применения препаратов лактоферрина в качестве средств профилактики для поддержания прочностных свойств. В то же время сохранение минеральной плотности костной ткани в дефицит-стимулирующих условиях требует рассмотрения альтернативных дозировок и способов доставки препарата.

Ключевые слова: крыса, опорная разгрузка, лактоферрин, бедренная кость, большеберцовая кость, остеоденситометрия, трехточечный изгиб

DOI: 10.31857/S0869813924080035, EDN: BCOGVV

ВВЕДЕНИЕ

На данный момент известно, что костная ткань адаптируется в ответ на изменение механической нагрузки. Частичное или полное отсутствие опорной нагрузки приводит к негативным изменениям структурных и прочностных свойств костей – преимущественно в отделах скелета, участвующих в поддержании позы (пояс нижних конечностей, поясничный отдел позвоночника), что наблюдается у пациентов, нахо-

дящихся длительное время в условиях постельного режима [1, 2], участников космических полетов разной продолжительности [3–6], а также в наземных экспериментах, моделирующих факторы космических полетов [7]. Аналогичные изменения отмечены у животных после космических полетов [8–10] и после экспериментов с опорной разгрузкой [11–13].

Механизм адаптации костной ткани к опорной разгрузке до конца не изучен, что затрудняет поиск средств профилактики. Но известно, что происходит дисбаланс между костеобразованием и резорбцией [3, 13, 14].

В настоящее время ведется активный поиск профилактических немедикаментозных методов и лекарственных средств, которые позволят приостановить изменения микроархитектоники кости и потерю минеральной плотности в отдельных участках скелета при действии факторов космических полетов. Также актуальным вопросом является разработка персонализированных схем восстановления костной ткани после завершения космических полетов и возвращения космонавтов на Землю [15].

В качестве одного из потенциальных средств профилактики рассматривается полифункциональный белок лактоферрин (ЛФ). ЛФ представляет собой железосвязывающий гликопротеин семейства трансферринов, обладающий выраженными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами [16–18]. Вероятно, ЛФ воздействует на кость через систему рецептора активатора ядерного транскрипционного фактора каппа В (RANK), его лиганда (RANKL) и остеопротегерина (OPG), повышая выработку OPG, препятствуя тем самым созреванию остеокластов и замедляя скорость резорбции костной ткани [19–21], одновременно с этим повышая скорость костеобразования посредством увеличения популяции преостеобластов и способствуя их выживанию и пролиферации [22–24]. Система RANK/RANKL/OPG – ключевое звено костного гомеостаза. В экспериментах с опорной разгрузкой отмечается локальное повышение секреции RANKL и снижается продукция OPG, что, вероятно, приводит к дисбалансу ремоделирования [13, 25, 26]. Аналогичные результаты показаны для условий космических полетов [27, 28].

Ранее было продемонстрировано, что ЛФ эффективен при эстроген-зависимой потере костной ткани у мышей и крыс после овариоэктомии [29, 30]. Также местное применение ЛФ способствует повышению скорости регенерации костной ткани после травм [31]. Однако в условиях опорной разгрузки действие ЛФ ранее не изучалось.

Целью данного исследования было определение способности ЛФ предотвращать снижение минеральной плотности костной ткани и ее механической прочности, вызванные 21-суточным антиортостатическим вывешиванием, а также оценка влияния его применения на восстановление кости после опорной разгрузки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и условия содержания

Исследования были выполнены на 48 самцах крыс линии Wistar. Масса животных до начала эксперимента составляла 226.0 ± 20.5 г. Экспериментальные группы животных содержались при температуре 18–22 °С и относительной влажности воздуха 30–70%. Освещение соответствовало сезонной продолжительности светового дня. Ограничений доступа к еде и воде не было. Эвтаназия животных проходила посредством цервикальной дислокации под ингаляционным наркозом (Изофлуран «Laboratories Karizoo, S.A.», Испания).

Экспериментальные группы и действующее вещество

Моделирование опорной разгрузки задних конечностей проводили с помощью метода антиортостатического вывешивания (АОВ) по Новикову–Ильину в модификации

Морри–Холтон [32, 33]. Длительность АОВ составила 21 день. Реадаптация двух групп животных после АОВ составила также 21 день. Помимо групп с АОВ были группы виварийного контроля, содержащиеся в тех же лабораторных условиях.

Животные были разделены на 6 экспериментальных групп путем простой рандомизации (по 8 крыс в каждой группе):

Группа 1. CP ($n = 8$, виварийный контроль, получавший плацебо),

Группа 2. CL ($n = 8$, виварийный контроль, получавший ЛФ),

Группа 3. HSP ($n = 8$, животные в условиях АОВ, получавшие плацебо),

Группа 4. HSL ($n = 8$, животные в условиях АОВ, получавшие ЛФ),

Группа 5. HSPR ($n = 8$, группа с реадaptацией после АОВ, которая получала плацебо во время и после АОВ),

Группа 6. HSLR ($n = 8$, группа с реадaptацией после АОВ, получавшая ЛФ во время и после АОВ).

Биотехнологический аналог лактоферрина человека (чистота 96%, насыщение железом 14%, далее ЛФ) был предоставлен Институтом биологии гена РАН [16]. Препарат применяли в дозе 200 мг/кг. Непосредственно перед введением сухой порошок ЛФ разводили в воде комнатной температуры (250 мг ЛФ на 5.0 мл раствора). Раствор стабилен в течение часа при температуре 15–45 °С. Для упрощения перорального введения препарата до его разведения в воду добавляли пюре (1.4 г на 5.0 мл раствора) из мяса индейки (производитель «ФрутоНяня»). Смесь вводили ежедневно в одно и то же время перорально с помощью одноразового трехкомпонентного шприца (объем шприца 1.0 мл) без иглы. Плацебо – пюре из мяса индейки, разведенное в объеме воды в том же соотношении.

Введение препарата/плацебо и АОВ продолжались в течение трех недель. Далее животные из групп CP, CL, HUP и HUL подвергались эвтаназии, а животных из групп HUPR и HULR переводили в стандартные клетки, где содержали еще три недели с использованием препарата/плацебо.

Вывешенные животные содержались индивидуально, другие группы – в одной клетке на группу.

Остеоденситометрия

Забор костного материала для дальнейшего исследования проводили сразу после эвтаназии. С помощью ножниц выделяли большеберцовые и бедренные кости. Ножницами и медицинской марлей кости очищали от фрагментов мышечной ткани, после чего помещали в 10%-ный раствор нейтрального формалина. Остеоденситометрию левых бедренных костей (L. femur) и правых большеберцовых (R. tibia) проводили на двухэнергетическом рентгеновском денситометре (Hologic, США) в режиме Small Animal (High Resolution).

Кость размещали поперек хода рентгеновской трубки: большеберцовую – задней поверхностью к столу денситометра, бедренную – шероховатой линией. С целью уменьшения случайной погрешности проведена серия повторных измерений без изменения положения кости. Определение границ кости происходило автоматически.

Оценивали площадь ортогонально-косоугольной проекции кости (ПП, см²) и ее проекционную минеральную плотность (МПК, г/см²).

Дополнительно изображения бедренной кости были разделены в продольном направлении на три равные области. Средняя треть, представленная исключительно кортикальной костной тканью, использовалась для определения тех же показателей. Этот же участок кости подвергался механическим испытаниям.

Проведение испытаний на трехточечный изгиб

Для оценки механических свойств кортикальной кости правая бедренная кость была испытана на трехточечный изгиб, согласно описанной методике [34, 35]. Кость располагалась горизонтально передней стороной вниз, эпифизы фиксировали сплавом Вуда в стаканах экспериментальной установки УТС 110М-100 (Россия, г. Иваново). Стаканы крепились к неподвижной траверсе пресса через переходник. Нагрузка прикладывалась перпендикулярно бедренной кости по середине диафиза. Экспериментальная установка работала в режиме управления ходом с постоянной скоростью 1 мм/мин, нагружение проводилось до перелома. На основе полученных данных были рассчитаны предел прочности (МПа) и модуль Юнга (МПа).

Статистическая обработка результатов

Данные представлены как среднее значение (M) со стандартным отклонением (SD). Для расчета статистических различий между группами использовался двухфакторный дисперсионный анализ (первый фактор – прием ЛФ, второй фактор – АОВ/реадаптация). Для множественных сравнений был проведен апостериорный тест Тьюки. Для выявления взаимосвязи между показателями остеоденситометрии и исследований на трехточечный изгиб оценивали коэффициент корреляции Пирсона. Значение $p < 0.05$ считалось значимым. Все статистические тесты проводились с использованием программного обеспечения GraphPAD Prism 9 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Коэффициент вариации значений ПП и МПК, полученных в 10 измерениях каждой кости, составил $3.13 \pm 1.00\%$ и $1.03 \pm 0.26\%$ для большеберцовой, $2.43 \pm 0.74\%$ и $0.89 \pm 0.26\%$ для бедренной кости соответственно. Это указывает на относительно высокую изменчивость измерений для каждой отдельной кости, но допустимую для объединения измерений одним средним/медианой. Таким образом, влияние факторов (АОВ, прием препарата, восстановление) на показатели денситометрии определялось по средним значениям десяти измерений.

Значения МПК и ПП обеих костей в группах с вывешиванием без реадаптации достоверно ниже значений этих показателей для соответствующих групп контроля и реадаптации (табл. 1). Значимых отличий по факту приема ЛФ между группами обнаружено не было.

Таблица 1. Результаты остеоденситометрии бедренной и большеберцовой кости

Группы	Большеберцовая кость		Бедренная кость	
	МПК, г/см ²	ПП, см ²	МПК, г/см ²	ПП, см ²
CP	0.20 ± 0.01	1.08 ± 0.10	0.22 ± 0.01	1.32 ± 0.10
CL	0.20 ± 0.01 ^{ns}	1.09 ± 0.07 ^{ns}	0.22 ± 0.01 ^{ns}	1.36 ± 0.08 ^{ns}
CP	0.20 ± 0.01	1.08 ± 0.10	0.22 ± 0.01	1.32 ± 0.10
HSP	0.17 ± 0.01 ^{***}	0.94 ± 0.04 ^{**}	0.19 ± 0.01 ^{***}	1.15 ± 0.07 ^{***}
CL	0.20 ± 0.01	1.09 ± 0.07	0.22 ± 0.01	1.36 ± 0.08
HSL	0.17 ± 0.01 ^{***}	0.98 ± 0.04 [*]	0.19 ± 0.01 ^{***}	1.21 ± 0.03 ^{**}
HSP	0.17 ± 0.01	0.94 ± 0.04	0.19 ± 0.01	1.15 ± 0.07

Окончание таблицы 1.

Группы	Большеберцовая кость		Бедренная кость	
	МПК, г/см ²	ПП, см ²	МПК, г/см ²	ПП, см ²
HSL	0.17 ± 0.01 ^{ns}	0.98 ± 0.04 ^{ns}	0.19 ± 0.01 ^{ns}	1.21 ± 0.03 ^{ns}
HSP	0.17 ± 0.01	0.94 ± 0.04	0.19 ± 0.01	1.15 ± 0.07
HSPR	0.20 ± 0.01 ^{***}	1.28 ± 0.14 ^{***}	0.23 ± 0.01 ^{***}	1.44 ± 0.16 ^{***}
HSL	0.17 ± 0.01	0.98 ± 0.04	0.19 ± 0.01	1.21 ± 0.03
HSLR	0.21 ± 0.01 ^{***}	1.23 ± 0.13 ^{***}	0.23 ± 0.01 ^{***}	1.49 ± 0.15 ^{***}
HSPR	0.20 ± 0.01	1.28 ± 0.14	0.23 ± 0.01	1.44 ± 0.16
HSLR	0.21 ± 0.01 ^{ns}	1.23 ± 0.13 ^{ns}	0.23 ± 0.01 ^{ns}	1.49 ± 0.15 ^{ns}

* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$, ns – статистически не значимо.

Направление изменений МПК средней трети кости (кортикальная кость) соответствовало изменениям МПК всего органа: отношение первых ко вторым было постоянным для всех групп (0.97 ± 0.03).

Значения модуля Юнга, полученные при трехточечном изгибе бедренной кости, не отличались между сравниваемыми группами ($p > 0.05$, рис. 1).

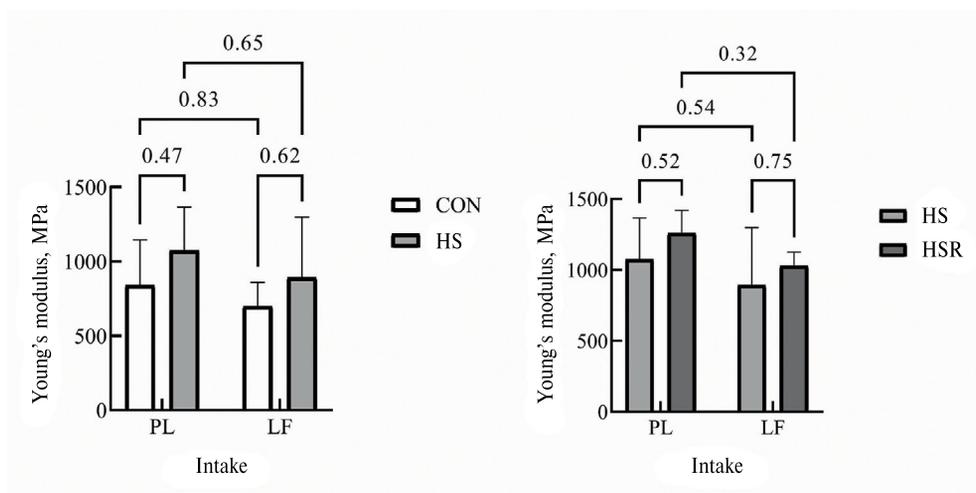


Рис. 1. Модуль Юнга. CON – контрольные группы, HS – вывешенные группы, HSR – вывешенные группы с последующей реадaptацией, PL – группы, принимающие плацебо, LF – группы, принимающие лактоферрин.

В то же время предел прочности был достоверно выше для групп CL и HSLR по отношению к группе HSL, а также для группы HSLR по отношению к HSPR (рис. 2). Различия между другими парами были незначимы.

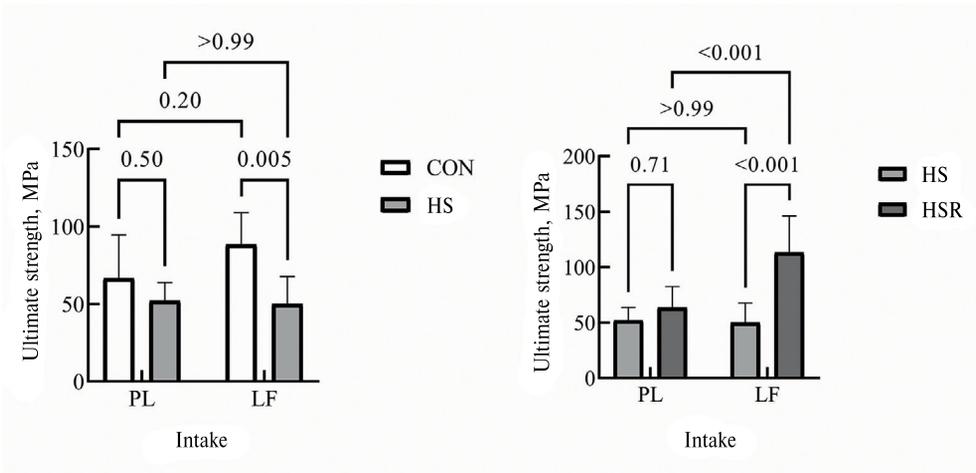


Рис. 2. Предел прочности. CON – контрольные группы, HS – вывешенные группы, HSR – вывешенные группы с последующей реадaptацией, PL – группы, принимающие плацебо, LF – группы, принимающие лактоферрин.

Статистическую связь между пределом прочности и параметрами остеоденситометрии центральной части кости можно охарактеризовать как умеренную: $r = 0.49$, 0.55 для ПП и МПК соответственно ($p < 0.001$) [36]. Связь с модулем Юнга не была обнаружена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы провели оценку ЛФ в качестве средства профилактики костных изменений в условиях опорной разгрузки. Будучи чувствительной к механическим нагрузкам, костная ткань реагирует выраженным зонспецифичным изменением минеральной составляющей. Предыдущие исследования влияния опорной разгрузки без применения профилактических средств показали, что снижение МПК происходит преимущественно в губчатом веществе кости. Это было продемонстрировано в исследованиях на грызунах в условиях АОВ разной продолжительности. Снижение трабекулярного объема костной ткани наблюдается уже на 14-е сутки воздействия [37]. За 3–4 недели АОВ потери МПК могут составлять 20–25% [11, 13]. Полученные нами результаты подтверждают, что 21-суточное АОВ приводит к значимому снижению МПК ($p < 0.05$) всей кости и кортикального вещества, в частности, что также было показано в других работах [38, 39].

Размер костей (выраженный ПП) вывешенных групп был меньше, чем у соответствующих контрольных групп ($p < 0.05$). Поскольку резорбция кортикальной кости наблюдается только со стороны эндоста, ПП с ростом организма способна только увеличиваться [40]. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают, что опорная разгрузка также способствует замедлению роста костей, что описывалось и в других исследованиях [11, 12]. В систематическом обзоре Globus, Morey–Holton, суммирующем результаты экспериментов с АОВ за 40 лет, предполагается, что у растущих животных изменение костной ткани связано в первую очередь с замедлением роста костей и костеобразования, а не с усилением резорбции [41].

В то же время ЛФ не оказал значимого профилактирующего эффекта на МПК и ПП, что, вероятно, обусловлено дозировкой и способом введения препарата.

Эффект перорального приема ЛФ может быть потенциально уменьшен желудочно-кишечным распадом его молекулы. Было показано, что более длительное время опорожнения желудка, а также низкий рН (1.5–2) приводят к более интенсивному перевариванию ЛФ в желудке [42]. Известно, что на опорожнение желудка оказывают влияние множество факторов: объем и плотность пищи, физическая нагрузка, температура, осмоляльность, висцеральный кровоток, положение тела и электролитный баланс. Эти факторы могут оказывать влияние на эффективность перорального приема препаратов в условиях измененного вектора гравитации и сниженной двигательной активности, характерных для опорной разгрузки [43]. Исследования на людях в условиях антиортостатической гипокинезии показывают, что длительная частичная опорная разгрузка приводит к повышенной секреции желудочного сока, утолщению стенок желудка и к замедлению его эвакуаторной функции [44]. Исходя из этого, можно предположить, что положение тела животного во время АОВ могло ограничивать моторно-эвакуаторную функцию желудка и приводить к повышенной кислотности.

Изменение минеральной составляющей кости сказывается и на ее прочности. Прочность кости поддерживается за счет изменений толщины ее кортикального слоя, площади поперечного сечения, качества минерализации и микроструктуры [45]. Исследования в космических полетах и АОВ показывают, что опорная разгрузка приводит к снижению прочности кости [10, 25, 45, 46].

Во время исследования на трехточечный изгиб был отмечен эффект взаимодействия между АОВ и приемом ЛФ: предел прочности для контрольной группы (CL) выше ($p < 0.05$), чем у вывешенной (HSL), но только на фоне приема препарата. Полученные нами при оценке прочностных свойств результаты не показали достоверных различий между группой контроля (CP) и группой АОВ, получавших плацебо (HSP), несмотря на различия при оценке МПК и ПП.

Помимо исследования эффективности ЛФ как средства профилактики для потери костной ткани, вызванной частичной разгрузкой, нами была предпринята попытка оценить, влияет ли он на скорость ее восстановления.

Ревадaptация вызвала анаболический эффект для МПК и ПП. Также при отсутствии значимого эффекта препарата на указанные параметры была установлена связь между показателями прочности кости (предел прочности) и приемом ЛФ: бедренная кость животных, получавших препарат, выдержала большую нагрузку, чем у животных, получавших плацебо ($p < 0.05$). Изменения жесткости костной ткани (модуль Юнга) не значимы ($p > 0.05$).

Таким образом, настоящее исследование подтверждает, что 21-суточная опорная разгрузка и ревадaptация после иммобилизации приводят к значительным изменениям показателей оценки состояния костной ткани. При этом отмечается перспективность применения ЛФ в качестве средства профилактики для поддержания прочностных свойств костей и, вероятно, скорости восстановления костной ткани. Однако полученные результаты свидетельствуют о том, что терапевтической дозировки ЛФ недостаточно для предотвращения снижения плотности и угнетения роста костей при данном экспериментальном воздействии, а способ доставки препарата неоптимален для условий антиортостатического вывешивания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят заведующего Лабораторией миологии Института медико-биологических проблем РАН д.б.н., профессора Бориса Стивовича Шенкмана и его сотрудников за помощь в организации эксперимента.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е. Р. С., Г. Ю. В., Н. А. Л., К. В. Г., А. К. К.), проведение эксперимента, сбор и подготовка биоматериала (Н. А. Л., К. В. Г.), выполнение денситометрии (К. В. Г.), проведение испытаний костей на трехточечный изгиб (А. И. А., О. А. С.), обработка экспериментальных данных и статистический анализ результатов (К. В. Г., А. И. А., Т. В. Б.), обсуждение результатов, написание и редактирование манускрипта – все авторы.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа выполнялась с использованием Уникальной научной установки «Трансген-банк» при финансировании за счет средств бюджета Минобрнауки России в рамках проекта (Соглашение № 075–15–2021–668 от 29.07.2021 г.). Проведение испытаний костей на трехточечный изгиб выполнялось при финансовой поддержке, выделенной Казанскому федеральному университету по государственному заданию в сфере научной деятельности, проект № FZSM–2023–0009. 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 биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН – Физиологической секцией Российского Комитета по биоэтике при Комиссии РФ по делам ЮНЕСКО (Протокол № 603 от 25.10.2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jiang S-D, Dai L-Y, Jiang L-S (2006) Osteoporosis after spinal cord injury. *Osteoporos Int* 17: 180–192.
<https://doi.org/10.1007/s00198-005-2028-8>
2. Aliprantis AO, Stolina M, Kostenuik PJ, Poliachik SL, Warner SE, Bain SD, Gross TS (2012) Transient muscle paralysis degrades bone via rapid osteoclastogenesis. *FASEB J* 26: 1110–1118.
<https://doi.org/10.1096/fj.11-196642>
3. Baran R, Wehland M, Schulz H, Heer M, Infanger M, Grimm D (2022) Microgravity-related changes in bone density and treatment options: a systematic review. *IJMS*23: 8650.
<https://doi.org/10.3390/ijms23158650>
4. Genah S, Monici M, Morbidelli L (2021) The Effect of Space Travel on Bone Metabolism: Considerations on Today's Major Challenges and Advances in Pharmacology. *IJMS*22: 4585.
<https://doi.org/10.3390/ijms22094585>
5. LeBlanc A, Schneider V, Shackelford L, West S, Oganov V, Bakulin A, Voronin L (2000) Bone mineral and lean tissue loss after long duration space flight. *J Musculoskelet Neuron Interact* 1: 157–160.
6. Оганов ВС, Бакулин АВ, Новиков ВЕ, Мурашко ЛМ, Кабицкая ОЕ, Моргунов ВВ, Воронин ЛИ, Шнайдер В, Шейклфорд Л, Лебланк А (2005) Реакции костной системы человека в космическом полете: Феноменология. *Авиакосм экол мед* 39: 3–9. [Oganov VS, Bakulin AV, Novikov VE, Murashko LM, Kabitskaya OE, Morgun VV, Voronin LI, Schneider V, Shackelford L, LeBlanc A (2005) Reactions of the human skeletal system in space flight: phenomenology. *Aviakosm Ekol Med* 39: 3–9. (In Russ)].
7. Leblanc AD, Schneider VS, Evans HJ, Engelbretson DA, Krebs JM (2009) Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. *J Bone Miner Res* 5: 843–850.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.5650050807>
8. Kaplansky AS, Durnova GN, Burkovskaya TE, Vorotnikova EV (1991) The effect of microgravity on bone fracture healing in rats flown on Cosmos-2044. *Physiologist* 34: S196–S199.

9. *Kaplanskiy AS, Durnova GN, Sakharova ZF, Il'ina-Kakueva EI* (1987) Гистоморфометрический анализ костей крыс, находившихся на борту биоспутника «Космос-1667». *Косм биол авиакосм мед* 21: 25–31. [*Kaplanskiy AS, Durnova GN, Sakharova ZF, Il'ina-Kakueva EI* (1987) Histomorphometric analysis of the bones of rats on board the Kosmos 1667 biosatellite. *Kosm Biol Aviakosm Med* 21: 25–31. (In Russ)].
10. *Hariom SK, Ravi A, Mohan GR, Pochiraju HD, Chattopadhyay S, Nelson EJ* (2021) Animal physiology across the gravity continuum. *Acta Astronautica* 178: 522–535. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2020.09.044>
11. *Дурнова ГН, Капланский АС, Логинов ВИ* (2006) Динамика восстановления структуры большеберцовых костей крыс после остеопении, вызванной вывешиванием. *Авиакосм экол мед* 40: 29–31. [*Durnova GN, Kaplanskiy AS, Loginov VI* (2006) [Dynamics of restoration of the structure of the tibia bones of rats after osteopenia caused by hindlimb suspension]. *Aviakosm Ekol Med* 40: 29–31. (In Russ)].
12. *Дурнова ГН, Капланский АС* (2003) Сравнительное гистоморфометрическое исследование большеберцовых костей у самцов и самок крыс при вывешивании за хвост в антиортогностическом положении. *Авиакосм экол мед* 37: 29–32. [*Durnova GN, Kaplanskiy AS* (2003) Comparative histomorphometric study of the tibia in male and female rats when suspended by the tail in an antiorthostatic position. *Aviakosm Ekol Med* 37: 29–32. (In Russ)].
13. *Metzger CE, Anand Narayanan S, Phan PH, Bloomfield SA* (2020) Hindlimb unloading causes regional loading-dependent changes in osteocyte inflammatory cytokines that are modulated by exogenous irisin treatment. *NPJ Microgravity* 6: 28. <https://doi.org/10.1038/s41526-020-00118-4>
14. *Grano M, Mori G, Minielli V, Barou O, Colucci S, Giannelli G, Alexandre C, Zallone AZ, Vico L* (2002) Rat hindlimb unloading by tail suspension reduces osteoblast differentiation, induces IL-6 secretion, and increases bone resorption in ex vivo cultures. *Calcified Tissue Int* 70: 176–185. <https://doi.org/10.1007/s00223-001-2034-6>
15. *Lang TF, Leblanc AD, Evans HJ, Lu Y* (2006) Adaptation of the proximal femur to skeletal reloading after long-duration spaceflight. *J Bone Mineral Res* 21: 1224–1230. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060509>
16. *Goldman IL, Georgieva SG, Gurskiy YaG, Krasnov AN, Deykin AV, Popov AN, Ermolkevich TG, Budzevich AI, Chernousov AD, Sadchikova ER* (2012) Production of human lactoferrin in animal milk. *Biochem Cell Biol* 90: 513–519. <https://doi.org/10.1139/o11-088>
17. *Chernousov AD, Nikonova MF, Sharova NI, Mitin AN, Litvina MM, Sadchikov PE, Goldman IL, Yarilin AA, Sadchikova ER* (2013) Neolactoferrin as a stimulator of innate and adaptive immunity. *Acta Naturae* 5: 71–76. <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-4-71-76>
18. *Naot D, Palmano K, Cornish J* (2012) Lactoferrin – A Potential Anabolic Intervention in Osteoporosis. In: Dionyssiotis Y (ed) *Osteoporosis*. In Tech.
19. *Sachenkov O, Kharislamova L, Shamsutdinova N, Kirillova E, Konoplev Y* (2015) Evaluation of the bone tissue mechanical parameters after induced alimentary Cu-deficiency followed by supplementary injection of Cu nanoparticles in rats. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* 98: 012015. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012015>
20. *Bastos AR, Da Silva LP, Maia FR, Pina S, Rodrigues T, Sousa F, Oliveira JM, Cornish J, Correló VM, Reis RL* (2019) Lactoferrin-hydroxyapatite containing spongy-like hydrogels for bone tissue engineering. *Materials* 12: 2074. <https://doi.org/10.3390/ma12132074>
21. *Trybek G, Jedliński M, Jaroń A, Preuss O, Mazur M, Grzywacz A* (2020) Impact of lactoferrin on bone regenerative processes and its possible implementation in oral surgery – a systematic review of novel studies with metanalysis and metaregression. *BMC Oral Health* 20: 232. <https://doi.org/10.1186/s12903-020-01211-6>
22. *Blais A, Malet A, Mikogami T, Martin-Rouas C, Tomé D* (2009) Oral bovine lactoferrin improves bone status of ovariectomized mice. *Am J Physiol Endocrinol Metabolism* 296: E1281–E1288. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90938.2008>
23. *Grey A, Banovic T, Zhu Q, Watson M, Callon K, Palmano K, Ross J, Naot D, Reid IR, Cornish J* (2004) The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is a mitogenic receptor for lactoferrin in osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 18: 2268–2278. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0456>
24. *Cornish J* (2004) Lactoferrin promotes bone growth. *Biometals* 17: 331–335. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000027713.18694.91>
25. *Jia B, Xie L, Zheng Q, Yang P, Zhang W, Ding C, Qian A, Shang P* (2014) A hypomagnetic field aggravates bone loss induced by hindlimb unloading in rat femurs. *PLoS One* 9: e105604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105604>

26. *He J, Feng X, Wang J, Shi W, Li H, Danilchenko S, Kalinkevich A, Zhovner M* (2018) Icarin prevents bone loss by inhibiting bone resorption and stabilizing bone biological apatite in a hindlimb suspension rodent model. *Acta Pharmacol Sin* 39: 1760–1767.
<https://doi.org/10.1038/s41401-018-0040-8>
27. *Smith JK* (2020) Osteoclasts and microgravity. *Life* 10: 207.
<https://doi.org/10.3390/life10090207>
28. *Lloyd SA, Morony SE, Ferguson VL, Simske SJ, Stodieck LS, Warmington KS, Livingston EW, Lacey DL, Kostenuik PJ, Bateman TA* (2015) Osteoprotegerin is an effective countermeasure for spaceflight-induced bone loss in mice. *Bone* 81: 562–572.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.08.021>
29. *Hou J, Xue Y, Lin Q* (2012) Bovine lactoferrin improves bone mass and microstructure in ovariectomized rats via OPG/RANKL/RANK pathway. *Acta Pharmacol Sin* 33: 1277–1284.
<https://doi.org/10.1038/aps.2012.83>
30. *Guo HY, Jiang L, Ibrahim SA, Zhang L, Zhang H, Zhang M, Ren FZ* (2009) Orally administered lactoferrin preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats. *J Nutrition* 139: 958–964.
<https://doi.org/10.3945/jn.108.100586>
31. *Gao R, Watson M, Callon KE, Tuari D, Dray M, Naot D, Amirapu S, Munro JT, Cornish J, Musson DS* (2018) Local application of lactoferrin promotes bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model as demonstrated by micro-CT and histological analysis: local lactoferrin promotes bone regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 12: e620–e626.
<https://doi.org/10.1002/term.2348>
32. *Ильин ЕА, Новиков ВЕ* (1980) Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных экспериментах с крысами. *Косм биол авиакосм мед* 14: 79–80. [*In* *EA, Novikov VE* (1980) Workbench for modelling the physiological effects of weightlessness in laboratory experiments with rats. *Kosm Biol Aviakosm Med* 14: 79–80. (In Russ)].
33. *Morey-Holton ER, Globus RK* (2002) Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol* 92: 1367–1377.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00969.2001>
34. *Akhmetzyanova AI, Sharafudinova KR, Sabirova DE, Baltin ME, Gerasimov OV, Baltina TV, Sachenkov OA* (2022) Assessing the effect of spinal cord injury severity on the mechanical properties of the hind limb bones of experimental rats. *Russ J Biomech* 26: 38–46.
<https://doi.org/10.15593/RZhBiomeh/2022.4.04>
35. *Sadchikov PE, Goldman IL, Razin SV, Chernousov AD, Alekseeva LI, Sadchikova ER* (2016) The molecular mechanism of lactoferrin influence on bone formation. *Osteopor Bone Dis* 19: 12–22.
<https://doi.org/10.14341/osteo2016312-22>
36. *Evans JD* (1996) *Straightforward statistics for the behavioral sciences*. Brooks/Cole Pub. Co, Pacific Grove.
37. *Cunningham HC, West DWD, Baehr LM, Tarke FD, Baar K, Bodine SC, Christiansen BA* (2018) Age-dependent bone loss and recovery during hindlimb unloading and subsequent reloading in rats. *BMC Musculoskelet Disord* 19: 223.
<https://doi.org/10.1186/s12891-018-2156-x>
38. *Krause AR, Speacht TA, Steiner JL, Lang CH, Donahue HJ* (2020) Mechanical loading recovers bone but not muscle lost during unloading. *NPJ Microgravity* 6: 36.
<https://doi.org/10.1038/s41526-020-00126-4>
39. *Lloyd SA, Bandstra ER, Willey JS, Riffle SE, Tirado-Lee L, Nelson GA, Pecaut MJ, Bateman TA* (2012) Effect of proton irradiation followed by hindlimb unloading on bone in mature mice: A model of long-duration spaceflight. *Bone* 51: 756–764.
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.07.001>
40. *Osterhoff G, Morgan EF, Shefelbine SJ, Karim L, McNamara LM, Augat P* (2016) Bone mechanical properties and changes with osteoporosis. *Injury* 47: S11–S20.
[https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(16\)47003-8](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(16)47003-8)
41. *Globus RK, Morey-Holton E* (2016) Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity. *J Appl Physiol* 120: 1196–1206.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00997.2015>
42. *Wang B, Timilsena YP, Blanch E, Adhikari B* (2019) Lactoferrin: structure, function, denaturation and digestion. *Critical reviews in food science and nutrition* 59: 580–596.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1381583>
43. *Amidon GL, DeBrincat GA, Najib N* (1991) Effects of Gravity on Gastric Emptying, Intestinal Transit, and Drug Absorption. *J Clin Pharm* 31: 968–973.
<https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1991.tb03658.x>

44. *Афонин БВ, Гончарова НП, Карамышев ЮА (2007) Функциональное состояние желудка человека в эксперименте с 4-месячной антиортостатической гипокinezией. Авиакосм экол мед 41: 37–43. [Afonin BV, Goncharova NP, Karamyshev YuA (2007) Functional state of the human stomach in an experiment with 4-month antiorthostatic hypokinesia. Aviakosm Ekol Med 41: 37–43. (In Russ)].*
45. *Shimano MM, Volpon JB (2009) Biomechanics and structural adaptations of the rat femur after hindlimb suspension and treadmill running. Braz J Med Biol Res 42: 330–338. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009000400004>*
46. *Ильин ЕА (1984) Исследование на биоспутниках «Космос». Косм биол авиакосм мед 18: 57–66. [Il'in EA (1984) Research on the Kosmos biosatellites. Kosm Biol Aviakosm Med 18: 57–66. (In Russ)].*

Application of Lactoferrin for the Prevention and Restoration of Bone Tissue in Wistar Rats under Conditions of Hindlimb Unloading

**K. V. Gordienko^{a,*}, N. A. Lukicheva^a, A. I. Akhmetzyanova^b, A. K. Kolupaev^c,
O. A. Sachenkov^b, T. V. Baltina^b, E. R. Sadchikova^c, and G. Yu. Vassilieva^a**

^a*Institute for Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences (IBMP RAS), Moscow, Russia*

^b*Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia*

^c*Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: k.vl.gordienko@gmail.com*

The influence of gravitational unloading (antiorthostatic suspension) and subsequent recovery on the mineral density and mechanical properties of the femoral and tibial bones of Wistar rats was studied with oral administration of a biotechnological analog of human lactoferrin (200 mg/kg) derived from the milk of producer goats. Bone mineral density was determined by dual-energy X-ray absorptiometry, and strength and stiffness were assessed through three-point bending tests.

It was shown that gravitational unloading for 21 days led to a decrease in the mineral density of the tibial and femoral bones. The administration of lactoferrin did not significantly affect the mineral density or projected area of the studied bones. No statistically significant differences in mechanical stiffness were found between the experimental groups, but after readaptation, the ultimate strength was significantly higher in the groups that received lactoferrin. Thus, the obtained results may indicate the potential of lactoferrin preparations as prophylactic agents for maintaining bone strength. At the same time, maintaining bone mineral density under deficit-stimulating conditions requires consideration of alternative dosages and delivery methods of the drug.

Keywords: rat, hindlimb unloading, lactoferrin, femur, tibia, DXA, three-point bending

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ КОНСЕРВАЦИИ НА ИЗМЕНЕНИЕ ОБЪЕМА КЛЕТОК
ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ В СРЕДЕ С ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ КАЛИЯ**

© 2024 г. Л. Е. Каткова¹, Г. С. Батурина^{1,2}, М. М. Тетерин³, А. И. Саханенко⁴,
И. Г. Пальчикова^{2,5}, И. А. Искаков⁶, Е. И. Соленов^{1,2,3,*}

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

³Новосибирский государственный технический университет, Новосибирск, Россия

⁴Институт математики им. С.Л. Соболева Сибирского отделения Российской Академии наук,
Новосибирск, Россия

⁵Конструкторско-технологический институт научного приборостроения Сибирского
отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁶Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад.
С. Н. Федорова Минздрава России, Новосибирский филиал, Новосибирск, Россия

*E-mail: eugsol@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.05.2024 г.

После доработки 22.07.2024 г.

Принята к публикации 26.07.2024 г.

Проведено экспериментальное исследование воздействия высокой (100 мМ) концентрации калия в среде на объем клеток эндотелия роговицы человека в зависимости от времени холодовой консервации донорского препарата. Приведены результаты исследования единичных образцов и значения, полученные на объединенном материале фрагментов донорских образцов после содержания препаратов в консервационной среде при 4 °С в течение 4 и 10 дней. Увеличение времени холодовой консервации препаратов привело к снижению процента клеток, способных набухать в среде с повышенным содержанием ионов калия (94.3% и 56.8% после 4 и 10 дней соответственно). Исследование клеток, способных к набуханию, показало, что увеличение времени их холодовой консервации привело к снижению средней величины ($M \pm SEM$) коэффициента набухания клеток в среде с высокой концентрацией калия с 1.055 ± 0.001 до 1.014 ± 0.001 после 4 и 10 дней соответственно. Высокую степень достоверности различия этих значений (p -value = 2E-76) показали с помощью t -критерия Стьюдента для независимых выборок.

По результатам исследования высказывается предположение, что величины набухания клеток эндотелия в калиевой среде могут служить показателями способности клеток к восстановлению электрогенного транспорта. Делается заключение, что исследование реакции клеток эндотелия роговицы на повышение концентрации ионов калия в среде может давать информацию для прогноза функциональности трансплантата.

Ключевые слова: эндотелий роговицы, трансплантация роговицы, холодовая консервация

ВВЕДЕНИЕ

Роговица – наружный преломляющий оптический элемент глаза – состоит из трех основных слоев: наружного слоя – эпителия, среднего стромального слоя и внутреннего слоя эндотелиальных клеток. Строма или матрикс образует основную часть структуры роговицы и составляет примерно 80–85% ее толщины. Она состоит из регулярно расположенных коллагеновых фибрилл и межфибрилярного пространства, содержащего гликозаминогликаны. Нарушение содержания воды в строме (в норме ~78%) изменяет степень гидратации коллагеновых волокон, что является критическим для прозрачности роговицы [1, 2]. При нарушении прозрачности роговицы наиболее распространенным методом восстановления зрения является кератопластика. Использование этого метода осложняет проблема дисфункции трансплантата, связанной с эндотелиальной недостаточностью в ближайшем и позднем послеоперационном периодах. Для преодоления этой проблемы совершенствуют технологии консервации ткани, что в свою очередь делает актуальным развитие методов диагностики активности транспортных механизмов клеток эндотелия роговицы. Осмотический баланс матрикса роговицы определяется равновесием процессов выведения и поступления воды и осмолитов в строму. Эти процессы часто описывают с помощью механизма Pump-Leak транспорта осмолитов и воды [2, 3]. Поступление воды в матрикс (leak) происходит пассивно согласно проницаемости эндотелия для воды, осмолитов и градиенту осмотического давления между матриксом и жидкостью в передней камере глаза. Удаление воды из матрикса (pump) является активным процессом, который осуществляется клетками эндотелия. Эндотелий роговицы представляет собой монослой клеток на внутренней поверхности роговицы и является одной из наиболее метаболически активных тканей организма. Апоикальная и базолатеральная плазматические мембраны клеток эндотелия различаются по составу экспрессируемых молекулярных транспортеров [4]. Апоикальная поверхность обращена в переднюю камеру глаза, содержит хлоридные каналы и водный канал аквапорин 1 [5]. Базолатеральная поверхность обращена к десцеметовой мембране и содержит Na/K-АТФазу как часть механизма активного энергозависимого электрогенного транспорта [2]. Насосная функция эндотелия роговицы определяется интенсивностью энергозависимого транспорта в этих клетках [6, 7]. Активность натрий-калиевого насоса (Na/K-АТФазы) создает низкую, относительно наружной среды, внутриклеточную концентрацию ионов натрия, повышенную концентрацию ионов калия и градиент отрицательного электрического потенциала на плазматической мембране. Поскольку плазматическая мембрана обладает высокой проницаемостью для ионов калия [8], повышенная внутриклеточная концентрация этих ионов существует благодаря тому, что разность электрохимических потенциалов ионов калия внутри и снаружи клетки мала, и в норме их выход компенсируется активностью Na/K-АТФазы.

В качестве материала для трансплантации используют препараты донорской роговицы из глазных банков, где они хранятся в консервационной среде при температуре 4 °С (холодовая консервация) [9]. Водно-электролитный обмен в клетках эндотелия при пониженной температуре нарушен, поскольку транспортные механизмы клеток подавлены, что приводит к деполяризации плазматической мембраны. Способность клеток эндотелия к восстановлению электрогенного транспорта может служить критерием функциональной сохранности трансплантата.

Замещение части ионов натрия на ионы калия в наружной среде вызывает поток ионов калия в клетку и ведет к набуханию клетки и деполяризации ее плазматической мембраны. В клетках с ослабленной функцией Na/K-АТФазы эффект повышения концентрации ионов калия в среде на клеточный объем ослаблен, поскольку клетки содержат повышенную концентрацию ионов натрия и в значительной мере деполяризованы.

Попытки теоретически моделировать такой эффект не дают конкретных результатов из-за отсутствия точных значений параметров транспортных механизмов клетки [10].

В настоящей работе исследовали влияние длительности холодовой консервации донорского препарата роговицы человека на динамику изменения объема клеток эндотелия в среде с повышенным содержанием калия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фрагменты роговицы человека в виде трепанированных дисков получали в процессе выполнения сквозной фемтокератоластики. Препараты роговицы находились в консервационной среде Eusol-C (Alchimia, Италия) 4 и 10 суток при температуре около 4 °С. Фрагменты десцеметовой мембраны с сохраненным эндотелием переносили на покровное стекло и помещали в проточную камеру микроскопа. Таким методом получали препарат клеток эндотелия, обращенных апикальной стороной в сторону омывающего раствора. Затем загружали клетки флуоресцентным красителем кальцеином (Calcein AM, 10^{-5} М, 20 мин, 37 °С). Для определения изменений клеточного объема использовали методический подход, основанный на эффекте гашения флуоресценции кальцеина белками цитоплазмы. Принцип метода описан нами ранее [11, 12]. В процессе эксперимента клетки помещали в буферный фосфатный солевой раствор (PBS) следующего состава (мМ): NaCl 125, Na_2HPO_4 4.7, KCl 2.7, KH_2PO_4 1.5, MgCl_2 0.5, глюкоза 5.5, CaCl_2 1, pH 7.4. Среду с повышенным содержанием калия создавали раствором PBS, в котором 100 мМ NaCl было заменено на 100 мМ KCl.

Экспериментальная установка представляла собой проточную камеру, разработанную для использования с флуоресцентным микроскопом Observer-Z1 (объектив LD LCI "Plan-Apochromat" 25x/0.8 Imm Corr DIC M27, Zeiss, Германия). Объем камеры составлял около 50 мкл, скорость протекания раствора – 25 мл/мин, смена омывающего раствора происходила в течение 100 мс, поддерживаемая температура: $36,8 \pm 0,2$ °С. Флуоресцентное изображение клеток записывали с помощью монохромной цифровой камеры, используя набор фильтров и дихроическое зеркало #009 (AxioCam HSm, 660 x 490 пикселей, Zeiss, Германия). Регистрацию флуоресцентного изображения проводили при низкой интенсивности возбуждающего света, что позволяло избежать выгорания флуорофора во время эксперимента. Сигнал регистрировали и сохраняли на компьютере.

Протокол эксперимента и анализ изображений

Регистрировали флуоресцентное изображение препарата клеток, предварительно загруженных кальцеином и уравновешенных в среде PBS. Затем производили замену раствора на PBS с повышенной концентрацией калия (100 мМ) и через 10 с делали второе изображение препарата. После записи изображения в среде с повышенной концентрацией калия препарат возвращали в основную среду PBS и производили запись изображения для выявления клеток, потерявших флуоресцентный краситель. Такие клетки исключали из статистического анализа. Измерение интенсивности флуоресценции на записях изображений проводили с помощью программы ImageJ (НИН, США).

На рис. 1 показаны типичные кривые результатов сканирования интенсивности флуоресценции единичной клетки в среде PBS (1) и в среде PBS с повышенным содержанием калия (2). На изображении каждой клетки выделяли точку максимальной интенсивности – центроид.

При анализе флуоресцентного изображения клетки определяли интегральную флуоресценцию как суммарную освещенность области диаметром 5 мкм вокруг центроида (d) (рис. 1). Суммарную светимость в этой области в среде PBS обозначали как a1, в среде PBS с повышенным содержанием калия – a2.

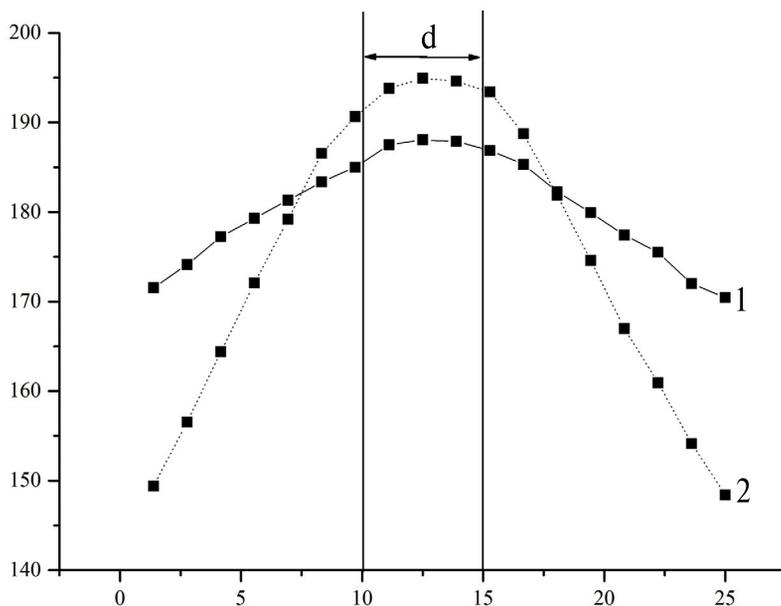


Рис. 1. Типичные кривые интенсивности флуоресцентного изображения клетки при сканировании через район центраида. Кривая 1 – контроль PBS. Кривая 2 – PBS с повышенной концентрацией калия (100 мМ). *d* – диаметр области считывания флуоресценции (5.0 мкм.). Оси: ординат – интенсивность флуоресценции усл. ед.; абсцисс – расстояние, мкм.

Статистический анализ

Для каждой клетки рассчитали коэффициент набухания $Q = a_2/a_1$, который мы далее рассматривали как важный показатель изменения объема клетки после повышения концентрации калия в среде.

После этого все исследуемые клетки разделяли на две группы в зависимости от того, $Q \geq 1$ или $Q < 1$. Клетки с показателем $Q \geq 1$ считали потенциально активными. Клетки с коэффициентом Q ниже 1 рассматривали как утратившие функциональность, поскольку у них, очевидно, недостаточное формирование электрохимического потенциала ионов натрия необходимого для осуществления клеточного транспорта.

Введённые выше показатели Q мы проверяли на соответствие нормальному распределению при помощи теста Шапиро–Вилка из программы Статистика 6.1. Достоверность различий средних величин у коэффициентов Q в выборках после 4 и 10 дней консервации оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок, у которых не предполагается равенства дисперсий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Флуоресцентные изображения монослоя эндотелиальных клеток роговицы представлены на рис. 2. Повышение концентрация калия в среде приводило к увеличению интенсивности флуоресценции в районе центраида клетки. Измерение яркости флуоресцентных изображений, которые проводили в контроле (PBS) и изотонической среде с повышенным содержанием калия, позволило рассчитать относительное увеличение объема клеток в результате их деполяризации, вызванной входом ионов калия.

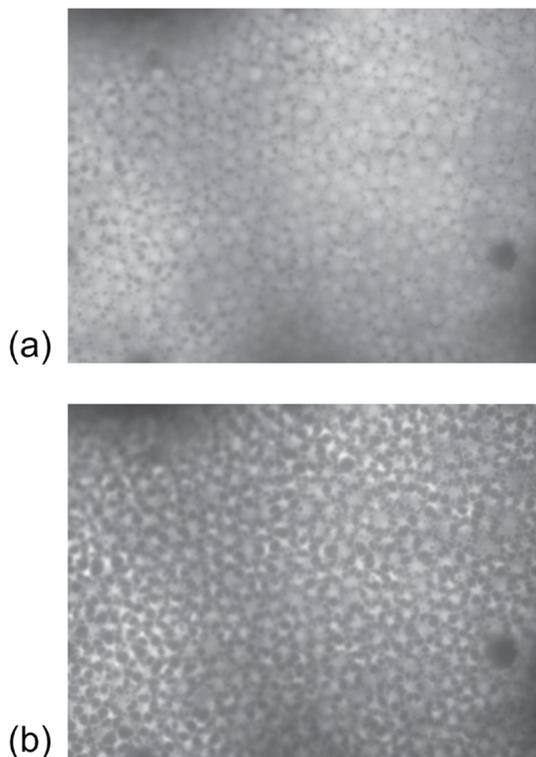


Рис. 2. Флуоресцентные изображения клеток препарата эндотелия в контроле (PBS) (а) и в PBS с повышенным содержанием калия (100 мМ) (b). Масштабный отрезок – 100 мкм.

Каждую исследованную выборку клеток, полный объём которой мы обозначали N , разделяли на две группы в зависимости от того, $Q \geq 1$ или $Q < 1$. В дальнейшем исследовали только числовую выборку из коэффициентов Q с $Q \geq 1$. Для этой числовой выборки стандартным образом находили стандартное отклонение SD и стандартную ошибку среднего SEM .

В табл. 1 приведены результаты исследования единичных образцов, а также значения, полученные на объединенных материалах. Можно видеть, что при увеличении на 6 дней времени нахождения препаратов в консервационной среде при 4°C происходило снижение средней величины Q , а также снижение доли клеток, превышающих пороговое значение этого показателя. Такой результат, полученный с высокой достоверностью, позволяет думать, что применяемый экспериментальный подход может давать устойчивые результаты, надежность которых возрастает при увеличении объемов выборки.

При проверке гипотезы о равенстве средних в двух объединённых выборках значение t -критерия Стьюдента оказалось очень большим ($t > 34$), что соответствовало $p = 2E-76$.

Таким образом, увеличение на 6 дней времени нахождения препаратов в условиях холодной консервации привело к снижению средней величины M показателя Q с очень высокой достоверностью. Эти результаты позволяют нам с большой уверенностью высказать предположение, что средние величины M набухания клеток эндотелия

в калиевой среде могут служить показателями способности клеток к восстановлению электрогенного транспорта и давать информацию для прогноза функциональности трансплантата.

Таблица 1. Влияние времени консервации на набухание клеток эндотелия роговицы в среде с концентрацией ионов калия 100 мМ

Выборка	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>SEM</i>	<i>n</i>	<i>N</i>	% ($Q \geq 1$)
4 дня						
1	1.055	0.021	0.002	166	167	99.4
2	1.071	0.023	0.002	155	160	96.9
3	1.045	0.020	0.002	155	169	91.7
4	1.050	0.017	0.001	197	198	99.5
5	1.062	0.039	0.002	253	288	87.8
Объединенная выборка	1.055	0.028	0.001	926	982	94.3
10 дней						
1	1.017	0.007	0.001	11	34	32.4
2	1.021	0.010	0.001	56	75	74.7
3	1.015	0.006	0.001	36	57	63.2
4	1.020	0.011	0.001	45	78	57.7
5	1.018	0.011	0.002	21	49	42.9
6	1.023	0.013	0.002	23	45	51.1
Объединенная выборка	1.014	0.010	0.001	192	338	56.8

В таблице: *N* – количество клеток в рассматриваемой выборке; *n* – количество клеток в выборке с $Q \geq 1$; ($Q \geq 1$) – процент клеток в выборке с $Q \geq 1$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При хирургическом лечении роговицы методом кератопластики серьезной проблемой является риск дисфункции трансплантата, связанный с недостаточной интенсивностью процессов активного транспорта в клетках эндотелия роговицы. Активный электрогенный транспорт определяет способность эндотелия регулировать осмотический баланс матрикса [2]. Поддержание клеточного объема у теплокровных животных осуществляется исключительно регуляцией потоков через плазматическую мембрану неорганических ионов и низкомолекулярных органических осмолитов и зависит от активного электрогенного транспорта в клетках [13, 14]. Основным источником энергии для транспорта ионов

через плазматическую мембрану является Na/K-АТФаза, она создает градиент электрохимического потенциала для ионов натрия, что является вторичным источником энергии для многих транспортных процессов в клетке. Разность электрических потенциалов на плазматической мембране клетки зависит от соотношения активности Na/K-АТФазы и проницаемости мембраны для ионов натрия и калия [12]. Можно думать, что эти параметры в значительной мере определяют и насосную функцию клеток в эндотелии роговицы. Таким образом, способность клетки эндотелия формировать трансмембранный градиент электрического потенциала необходима для ее возможности осуществлять насосную функцию эндотелия в целом. При резком повышении концентрации ионов калия в среде формируется новый электрохимический градиент. Возникший градиент создает движущую силу для потока ионов калия в клетку, что вызывает увеличение клеточного объема в результате поступления воды, в том числе в составе гидратной оболочки ионов. Поток ионов калия в клетку приводит к деполяризации плазматической мембраны. Возникающее при этом набухание клетки вызывает реакцию регуляторного снижения клеточного объема. Повышение клеточного объема можно регистрировать фотометрически, поскольку при этом повышается яркость флуоресценции кальцеина, находящегося в клетке. Таким образом, возможно проведение исследования динамики объема клеток эндотелия роговицы при деполяризации ионами калия, что позволит получать информацию об исходном уровне поляризации плазматической мембраны и служить индикатором активности электрогенного транспорта.

Анализируя результаты настоящего исследования, можно предположить, что увеличение срока холодильной консервации приводит к снижению как доли клеток, отвечающих критерию возникновения электрической поляризации в нормальных условиях, так и к снижению величины коэффициента набухания клеток при воздействии среды с повышенной концентрацией калия. Полученные результаты ставят вопрос о том, какие изменения в молекулярных механизмах, определяющих поляризацию плазматической мембраны клеток эндотелия роговицы, происходят в процессе консервации при пониженной температуре. В регуляции баланса электролитов и разности электрических потенциалов на плазматической мембране и клеточного объема участвуют характерные для каждого типа клеток каналы и транспортеры основных ионных осмолитов, находящиеся в плазматической мембране [6, 15]. Множественность параллельных путей переноса ионов через клеточную мембрану делает изучение механизма клеточного транспорта в каждом конкретном типе клеток самостоятельной задачей. В процессе консервации снижается не только степень набухания в калиевой среде, что, по-видимому, отражает постепенную потерю клетками способности к восстановлению поляризации плазматической мембраны. При этом также возрастает доля деполяризованных клеток с $Q < 1$, что может указывать на существование полиморфизма клеточных структур, определяющих электрогенную активность в этих клетках. Это ставит вопрос о значении функционального полиморфизма клеток, о значимости вклада клеток с разной выраженностью реакции на калиевую среду в транспортной функции эндотелия. Реакция повышения объема в калиевой среде отсутствует у деполяризованных клеток, что означает отсутствие потока ионов калия в клетку. Снижение интенсивности флуоресценции связано, по-видимому, с повышенной проницаемостью плазматической мембраны и выходом красителя наряду с другими органическими анионами. Клетки с реакцией этого типа, хотя и сохраняют форму, и, следовательно, не имеют разрыва плазматической мембраны, быстро приходят в осмотическое равновесие со средой, что указывает на высокую неселективную проницаемость для воды и ионов.

Результаты проведенного исследования указывают на то, что коэффициент набухания клеток эндотелия в среде с высокой концентрацией калия может служить показателем способности клеток к восстановлению электрогенного транспорта. Делается заключение, что исследование изменения объема клеток эндотелия роговицы в среде с повышенной концентрацией ионов калия является перспективным для прогноза функциональности трансплантата.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е. И. С., И. А. И.), сбор данных (Г. С. Б., Л. Е. К., Е. И. С.), обработка данных (М. М. Т., Г. С. Б., Л. Е. К., А. И. С., Е. И. С.), обсуждение и редактирование манускрипта (Г. С. Б., Л. Е. К., Е. И. С., А. И. С., И. Г. П., И. А. И.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета программы фундаментальных научных исследований СО РАН, проекты № FWNF-2022–0010 и FWNR-2022–0019, а также при частичной поддержке в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 124041900016–2). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Maurice DM* (1972) The location of the fluid pump in the cornea. *J Physiol* 221: 43–54. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1972.sp009737>
2. *Bonanno JA* (2012) Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res* 95: 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.06.004>
3. *Klyce SD* (2020) Endothelial pump and barrier function. *Exp Eye Res* 198: 108068. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108068>
4. *Srinivas SP* (2010) Dynamic regulation of barrier integrity of the corneal endothelium. *Optom Vis Sci* 87: E239–E254. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181d39464>
5. *Verkman AS, Ruiz-Ederra J, Levin MH* (2008) Functions of aquaporins in the eye. *Prog Retin Eye Res* 27: 420–433. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.04.001>
6. *Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF* (2009) Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev* 89: 193–277. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2007>
7. *Wehner F, Shimizu T, Sabirov R, Okada Y* (2003) Hypertonic activation of a non-selective cation conductance in HeLa cells and its contribution to cell volume regulation. *FEBS Lett* 551: 20–24. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00868-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00868-8)
8. *Hoffmann EK* (2011) Ion channels involved in cell volume regulation: effects on migration, proliferation, and programmed cell death in non adherent EAT cells and adherent ELA cells. *Cell Physiol Biochem* 28: 1061–1078. <https://doi.org/10.1159/000335843>
9. *Борзенков СА, Малюжин БЭ, Гаврилова НА, Комах ЮА, Тонаева ХД* (2018) Алгоритм заготовки трупных роговиц человека для трансплантации: Методические рекомендации. Москва. Офтальмология. [*Borzenok SA, Maljugin BJ, Gavrilova NA, Komah JA, Tonaeva HD* (2018) Algorithm for harvesting cadaveric human corneas for transplantation: Guidelines. *M. Oftalmologija*. (In Russ)].
10. *Mori Y* (2012) Mathematical properties of pump-leak models of cell volume control and electrolyte balance. *J Math Biol* 65: 875–918. <https://doi.org/10.1007/s00285-011-0483-8>
11. *Solenov E, Watanabe H, Manley GT, Verkman AS* (2004) Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C426–C432. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2003>

12. Zargiannis SG, Ilyaskin AV, Baturina GS, Katkova LE, Medvedev DA, Karpov DI, Ershov AP, Solenov EI (2013) Regulatory volume decrease of rat kidney principal cells after successive hypotonic shocks. *Math Biosci* 244: 176–187.
<https://doi.org/10.1016/j.mbs.2013.05.007>
13. O'Neill WC (1999) Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C995–C1011.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.5.C995>
14. Strange K (2004) Cellular volume homeostasis. *Adv Physiol Educ* 28: 155–159.
<https://doi.org/10.1152/advan.00034.2004>
15. Jentsch TJ, Maritzen T, Zdebek AA (2005) Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest* 115(8): 2039–2046.
<https://doi.org/10.1172/JCI25470>

Effect of preservation on Changes in the Volume of Corneal Endothelial Cells in an Environment with a High Concentration of Potassium

**L. E. Katkova^a, G. S. Baturina^{a,b}, M. M. Teterin^c, A. I. Sakhanenko^d, I. G. Palchikova^{b,c},
I. A. Iskakov^f, and E. I. Solenov^{a,b,c,*}**

^a*Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia*

^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

^c*Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia*

^d*Sobolev Institute of Mathematics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russia*

^e*Technological Design Institute of Scientific Instrument Engineering of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

^f*Fedorov NMRC MNTK "Eye Microsurgery", Novosibirsk, Russia*

**e-mail: eugsol@bionet.nsc.ru*

The experimental study of preservation length on the effect of high potassium concentration in the medium on the volume of human corneal endothelial cells was done. The results of the study of individual samples of fragments of donor material and the values calculated using joined data after hypothermic preservation for 4 and 10 days are presented. The increase of the time when cornea samples are kept in preservation medium (Eusol-C) at 4°C led to a decrease in the average value ($M \pm SEM$) of cell swelling indicator (N) in a potassium medium from 1.055 ± 0.001 ; $n = 982$ to 1.014 ± 0.001 ; $n = 338$; after 4 and 10 days, respectively. Student's t -test for independent samples showed a high degree of significance for the difference between these values ($p = 2E-76$). Identification of the proportion of cells capable to swell in a medium with a high content of potassium ions ($N > 1$), reflecting the electrogenic activity in these cells, showed a decrease of this indicator in the studied groups with increasing duration of preservation (94.3% and 56.8% after 4 and 10 days, respectively).

Based on the results of the study, it is suggested that the values of endothelial cells swelling in a potassium environment can serve as indicators of the cells' ability to restore electrogenic transport. It is concluded that the study of cell swelling in a medium with a high content of potassium ions can provide information for predicting the functionality of the graft.

Keywords: corneal endothelium, corneal transplantation, hypothermic preservation