

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ ГИПОПЕРФУЗИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫС С РАЗЛИЧНЫМИ КОГНИТИВНЫМИ СПОСОБНОСТЯМИ

Криштоп В.В.¹, Румянцева Т.А.², Никонова В.Г.¹

¹Университет ИТМО, Ломоносова, д. 9, Санкт-Петербург, e-mail: chrishtop@mail.ru;

²Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, e-mail: rum-yar@mail.ru

Окислительный стресс при хронической гипоперфузии головного мозга является одной из ключевых причин развития нейродегенеративных заболеваний. Вместе с тем ряд исследований демонстрирует, что физическая активность может предотвратить прогрессирование когнитивных нарушений. Целью нашего исследования стало определение динамики окислительного стресса при экспериментальной гипоперфузии и моделирование реабилитационных мероприятий в зависимости от способности животных к обучению. Для моделирования хронической гипоперфузии головного мозга использовали перманентную двустороннюю окклюзию общих сонных артерий. По результатам поведенческих тестов животные были разделены на две подгруппы: с высокими когнитивными способностями (ВУК) и с низкими (НУК). В качестве маркера перекисного окисления (МДА) спектрофотометрически определяли концентрацию ТБК-активных продуктов. Также в плазме крови определяли концентрацию метаболитов метаболического пути оксида азота (NO) / L-аргинина. Физическая активность привела к снижению свободнорадикальных реакций во всех исследуемых группах. Значение tga было существенно увеличено в подгруппе ВУК по сравнению с подгруппой НУК. Значения S и I_{max} были существенно уменьшены в обеих. Было обнаружено, что снижение значений (NO)-X в плазме крови было больше в подгруппе сравнения НУК, тогда как значения LC существенно выросли в подгруппе ВУК. Таким образом, физическая нагрузка может быть использована в качестве фактора, нивелирующего развитие окислительного стресса при гипоперфузии головного мозга.

Ключевые слова: гипоперфузия головного мозга, физические нагрузки, окислительный стресс, когнитивные способности, перекисное окисление липидов.

EFFECT OF PHYSICAL LOAD ON OXIDATIVE STRESS DURING CEREBRAL HYPOPERFUSION IN RATS WITH DIFFERENT COGNITIVE PERFORMANCE

Chrishtop V.V.¹, Rumyantseva T.A.², Nikonorova V.G.¹

¹ITMO University, St. Petersburg, e-mail: chrishtop@mail.ru;

²Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, e-mail: rum-yar@mail.ru

Oxidative stress, during chronic hypoperfusion of the brain, is one of the key causes of the development of neurodegenerative diseases. However, a number of studies demonstrate that physical activity can prevent the progression of cognitive impairment. The aim of our study was to determine the dynamics of oxidative stress during experimental hypoperfusion and to model rehabilitation measures depending on the ability of animals to learn. To model chronic hypoperfusion of the brain, permanent bilateral occlusion of the common carotid arteries was used. According to the results of behavioral tests, the rats were divided into two subgroups: with high cognitive abilities (HCA) and with low (LCA). As a marker of peroxidation (MDA), the concentration of TBA-active products was determined spectrophotometrically. The concentration of metabolites of the metabolic pathway of nitric oxide (NO) / L-arginine was also determined in blood plasma. Physical activity led to a decrease in free radical reactions in all studied groups. The tga value was significantly increased in the HCA subgroup compared to the LCA subgroup. The S and I_{max} values were significantly reduced in both. It was found that the decrease in plasma (NO) -X values was greater in the LCA comparison subgroup, while the LC values increased significantly in the HCA subgroup. Thus, physical activity can be used as a factor leveling the development of oxidative stress in hypoperfusion of the brain.

Keywords: cerebral hypoperfusion, physical exertion, oxidative stress, cognitive performance, lipid peroxidation.

Индивидуализация лечебно-восстановительных мероприятий при нейродегенеративных и ишемических повреждениях центральной нервной системы в

последние годы приобретает особое значение. Такие индивидуальные особенности, как стрессоустойчивость и уровень когнитивных способностей, перекочевали из разряда диагностируемых величин в область факторов риска. Современные исследования демонстрируют тесную взаимосвязь состояния когнитивной функции с выраженностью оксидантного стресса [1]. Физическая нагрузка является неотъемлемым компонентом реабилитационных мероприятий при церебральной гипоперфузии, характерной для подавляющего числа цереброваскулярных заболеваний. Предполагается, что улучшение когнитивных функций под ее воздействием связано с высвобождением нейротрофического фактора мозга (BDNF) из церебральных эндотелиальных клеток под воздействием окислительного стресса [2]. Следует отметить, что высвобождение BDNF под влиянием физических нагрузок имеет ряд индивидуальных особенностей: величина этих эффектов у женщин ниже по сравнению с мужчинами [3].

Цель нашего исследования – выявить особенности протекания оксидантного стресса при экспериментальной церебральной гипоперфузии и моделировании реабилитационных мероприятий в зависимости от способности животных к обучению.

Материал и методы исследования

Эксперимент проводился на 240 крысах Wistar (120 самцов и 120 самок). Исследование одобрено Этическим комитетом ФБОУ ВО «ЯГМУ» Минздрава России (протокол № 8 от 24.03.2016 г.) и выполнен в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г., а также ее пересмотренным вариантом 2000 г. и Приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Билатеральная окклюзия обеих общих сонных артерий под внутрибрюшинным наркозом золетилом была использована в качестве модели хронической церебральной гипоперфузии. Накануне оперативного вмешательства животных тестировали в водном лабиринте Морриса для оценки уровня когнитивных способностей [4]. По результатам тестирования крысы обоего пола были разделены на две подгруппы: с высоким уровнем когнитивных способностей (ВУК) и низким уровнем развития когнитивных способностей (НУК). Впоследствии прооперированные крысы сформировали группу сравнения (128 животных, из которых 64 – животные с ВУК, и 64 – животные с НУК) и экспериментальную группу (112 животных), также включающую в себя одинаковое количество животных с ВУК и с НУК. Животные экспериментальной группы, начиная с 7-х суток после операции, ежедневно подвергались плаванию в бассейне в течение 15 минут на протяжении 4 недель, то есть спустя 35 дней после операции физические нагрузки прекращались.

Концентрацию ТБК активных продуктов (малонового диальдегида – МДА) в плазме крови определяли спектрофотометрически. Концентрацию L-цитруллина (LC) и суммарную

концентрацию нитрит- и нитрат-ионов (NO)-X плазмы крови использовали для оценки эндогенной продукции оксида азота. Определение концентрации (LC) в плазме крови проводили по методике, основанной на реакции остатков LC с диацетилмоноксидом и оксидом железа (III) в кислой среде. Интенсивность окислительного стресса оценивали по антиоксидантной активности плазмы крови путем индуцирования в ней хемиллюминесценции пероксидом водорода с сульфатом железа по стандартной методике на приборе БХЛ 07. Определяли: I max (мВ) – максимальную интенсивность свободнорадикальных процессов, за все время измерения; S (мВ×с) – светосумму; tgα (мВ/с). Все вышеперечисленные исследования выполняли у интактных животных, а также через 1, 6, 8, 14, 28, 35, 60 и 90 суток после операции в экспериментальной группе и группе сравнения. Статистический анализ первичных данных был проведен с использованием программного пакета StatSoft Statistica v 10.0. Значимость различий измеряемых параметров оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для двух независимых выборок. Между средними значениями исследуемых групп и подгрупп рассчитывался коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные данные в группе сравнения характеризуются стабильностью. В первые сутки исследования, спустя 24 часа после моделирования церебральной гипоксии, достоверная динамика большинства показателей отмечена только в подгруппе животных с низким уровнем когнитивных способностей: МДА, LC – достоверно возрастают; (NO)-X, I max, tgα, S – достоверно снижаются (табл. 1).

Таблица 1

Динамика LC и NO-X в эксперименте

Сутки	Группа сравнения				Экспериментальная группа			
	LC		NO-X		LC		NO-X	
	ВУК	НУК	ВУК	НУК	ВУК	НУК	ВУК	НУК
0	6,27±0,59	5,92±0,48	20,9±1,9	37,6±3,4	-	-	-	-
1	5,67±0,55	7,46±0,69*	42±3,8*	14,6±1,3*	-	-	-	-
6	5,47±0,54	9,26±0,81*	41,3±3,8*	30,9±2,8*	-	-	-	-
8	5,83±0,55	5,25±0,43	36±3,3*	9,8±0,9*	5,47±0,54	9,26±0,86 [#]	44,5±4,0 [#]	9,9±0,9
14	6,84±0,68	6,58±0,54	25±2,1*	20,6±1,9*	5,79±0,55	3,55±0,34 [#]	22,0±2,0	4,3±0,4 [#]
21	5,61±0,55	3,67±0,36	22,6±2,1	5,8±0,5*	6,87±0,61 [#]	6,48±0,57 [#]	10,5±1 [#]	8,8±0,8 [#]
28	5,38±0,44	6,78±0,53	30,7±2,8	31,9±2,9*	6,26±0,58	5,7±0,45	33,6±3,1	31,9±2,9
35	6,93±0,65	4,86±0,44*	82,8±7,5*	135,8±12,3*	5,96±0,55	6,84±0,6 [#]	52,4±4,8 [#]	26±2,4 [#]

60	8,88±0,72*	9,8±0,82*	13,5±1,2*	34,5±3,1	5,1±0,43 [#]	7,79±0,69 [#]	30,4±2,8 [#]	27,5±2,5 [#]
90	6,35±0,49	8,09±0,65*	6,2±0,6*	18,2±1,7*	6,93±0,64	9,11±0,77	2,3±0,2 [#]	1,2±0,1 [#]

Примечание. * - $p < 0,05$ по отношению к контрольным значениям; [#] - $p < 0,05$ по отношению к значениям группы сравнения.

Изменения со стороны животных с ВУК касаются только: (NO)-X – рост и S – снижение. В дальнейшие сроки исследования в подгруппе НУК достоверное снижение сохраняется, начиная с 14, 21 суток исследования: (NO)-X до 28 суток, I_{max} , tga , S сохраняется до 35 суток исследования, МДА – до 60-х суток эксперимента (табл. 2).

Таблица 2

Динамика tga и S в эксперименте

Сутки	Группа сравнения				Экспериментальная группа			
	tga		S		tga		S	
	ВУК	НУК	ВУК	НУК	ВУК	НУК	ВУК	НУК
0	0,21±0,02	0,23±0,02	1012,9±81,2	1110,5±86,9	-	-	-	-
1 с	0,20±0,02	0,16±0,01*	530,7±43,4*	391,2±30,2*	-	-	-	-
6 с	0,19±0,02	0,12±0,01*	681±53,1*	382,4±34,2*	-	-	-	-
8 с	0,21±0,02	0,18±0,02*	848,5±81,7*	598,1±57,9*	0,19±0,02	0,12±0,01 [#]	681±59,7 [#]	382,4±35,7 [#]
14 с	0,18±0,01	0,19±0,02	675,5±59,6*	752,7±69,5*	0,19±0,01	0,18±0,02	772,5±68,9	489,3±44,9 [#]
21 с	0,19±0,02	0,18±0,01*	673,7±57,2*	705,1±55,37*	0,15±0,01	0,2±0,02	566,4±52,5	850,2±82,6 [#]
28 с	0,27±0,02*	0,18±0,02*	762,9±74,5	605,8±55,9*	0,26±0,02	0,19±0,02	785,7±62,5	723,8±59,8 [#]
35 с	0,18±0,02	0,15±0,01*	649,7±55,8*	516,2±44,6*	0,23±0,02 [#]	0,21±0,02 [#]	913,3±73,4 [#]	772,2±64,9 [#]
60 с	0,23±0,02	0,24±0,02	1206,7±96,9	1142,8±104,0	0,19±0,02 [#]	0,21±0,02	705,5±65,2 [#]	930,4±78,2 [#]
90 с	0,24±0,02	0,23±0,02	1158,7±99,4	1135,4±92,45	0,24±0,02	0,21±0,02	1185,7±103,4	1198,7±95,32

Примечание. * - $p < 0,05$ по отношению к контрольным значениям; [#] - $p < 0,05$ по отношению к значениям группы сравнения.

У животных с ВУК изменения параметров менее выражены: статистически значимо высокие значения NO-X сохраняются только на 14-е сутки исследования, а сниженные по отношению к контрольным показателям значения S – на протяжении 14, 21, 28, 35 суток после операции. Кроме того, в подгруппе животных с ВУК на 28-е сутки исследования статистически значимо возрастает tga и I_{max} . Поздние сроки после операции, после предшествующей стабилизации большинства показателей на цифрах, близких к значениям интактных животных, характеризуются повторным нарастанием изменений, во многом повторяющих динамику ранних сроков после операции.

В подгруппе НУК 60-е и 90-е сутки исследования отмечены ростом LC по отношению к показателям интактных животных, которому предшествует значительный достоверный рост (NO)-X на 28-е сутки исследования, который на 90-е сутки сменяется снижением ниже

показателей интактных животных. Также на 90-е сутки в этой подгруппе достоверно возрастает МДА, другие показатели от показателей интактных животных достоверных отличий не имеют (табл. 3). В подгруппе с ВУК 60-е сутки также отмечены достоверным ростом LC по отношению к показателям интактных животных, которому предшествует значительный рост (NO)-X на 28-е сутки исследования. Однако в отличие от НУК этот рост менее выражен и на 60-е и 90-е сутки сменяется более значительным снижением (NO)-X, ниже показателей интактных животных. Так же как и в подгруппе НУК, на 90-е сутки у животных с ВУК достоверно возрастает МДА.

Таблица 3

Динамика МДА и I_{max} в эксперименте

Сутки	Группа сравнения				Экспериментальная группа			
	МДА		I _{max}		МДА		I _{max}	
	ВУК	НУК	ВУК	НУК	ВУК	НУК	ВУК	НУК
0	1,7±0,1	1,9±0,1	5,8±0,52	6,22±0,51	-	-	-	-
1	1,6±0,6	2,7±1*	5,57±0,47	4,3±0,4**	-	-	-	-
6	1,4±0,1*	1,3±0,1*	4,85±0,41	3,11±0,27*	-	-	-	-
8	1,4±0,1*	1,5±0,1**	5,53±0,43	4,65±0,45*	1,9±0,2 [#]	1,3±0,1 [#]	4,85±0,42	3,11±0,29 [#]
14	1,7±0,5	1,1±0,3*	4,7±0,46*	5,27±0,43*	1,2±0,1 [#]	1,7±0,2 [#]	5,23±0,44	4,75±0,4
21	1,6±0,2	1,3±0,2*	5,23±0,44	5,01±0,39*	1,3±0,1 [#]	1,3±0,1	3,98±0,39 [#]	5,38±0,52
28	1,7±0,5	1,1±0,3*	7,53±0,59*	4,87±0,42*	1,4±0,1	1,4±0,1	7,12±0,57	5,29±0,45
35	1,3±0,1*	1,2±0,1*	4,91±0,46	4,07±0,31*	1,1±0,1 [#]	1,5±0,1 [#]	6,38±0,51 [#]	5,65±0,54 [#]
60	1,3±0,1*	1,5±0,1*	6,34±0,6	6,7±0,67	1,3±0,1	1,5±0,1	5,26±0,47 [#]	5,74±0,46 [#]
90	2,9±0,1	3,0±0,1*	6,58±0,65	6,22±0,52	1,9±0,2 [#]	1,7±0,2 [#]	6,73±0,67	5,79±0,48

Примечание. * - p < 0,05 по отношению к контрольным значениям; # - p < 0,05 по отношению к значениям группы сравнения.

При воздействии 15-минутной ежедневной физической нагрузки в экспериментальной группе (8-е сутки исследования) снижение S отмечается в обеих подгруппах. Это достигается альтернативными вариантами изменений оксидантного профиля. В подгруппе животных с НУК по отношению к показателям группы сравнения отмечен статистически значимый рост LC, снижение tgα, МДА, I_{max}. В подгруппе животных с ВУК повышается (NO)-X и МДА. Статистически значимое снижение S относительно показателей группы сравнения в обеих экспериментальных подгруппах сохраняется только в первые сутки влияния физической нагрузки. В дальнейшем достоверные отклонения S характерны только для подгруппы животных с НУК: в 14-е сутки эксперимента она еще остается сниженной по отношению к показателям группы сравнения, а на 21, 28, и 35-е сутки исследования

статистически значимо превышает показатели группы сравнения. Аналогичный рост S в подгруппе животных с ВУК отмечен только на 35-е сутки исследования. Также в обеих подгруппах на 21-е сутки исследования отмечен достоверный рост LC и I_{max} .

На 35-е сутки в обеих подгруппах значительно достоверно снижен $(NO)-X$, особенно в подгруппе с НУК. Фактически ежедневное влияние кратковременной нагрузки выравнивает динамику этого показателя, который в группе сравнения принимает максимальные значения за все время эксперимента. На 35-е сутки эксперимента достоверно увеличен по отношению к показателям группы сравнения tga , однако в подгруппе животных с ВУК отмечен только на 35-е сутки исследования, за этим подъемом на 60-е сутки следует достоверное снижение указанного параметра, чего не наблюдается в подгруппе животных с НУК. Спустя 90 суток исследования МДА и $(NO)-X$ статистически значимо снижены в обеих изучаемых подгруппах, однако значения показателя LC аналогичны таковому группы сравнения. Этому снижению на 60-е сутки исследования у животных с ВУК предшествует достоверный рост $(NO)-X$, а у животных с НУК – снижение. Также на 60-е сутки исследования по отношению к показателям группы сравнения в обеих подгруппах животных статистически значимо снижено S и I_{max} . Для подгруппы животных с ВУК характерен существенный рост tga на 35-е сутки с последующим снижением на 60-е по отношению к показателям группы сравнения.

Проведенный корреляционный анализ в нашем исследовании выявил сильную положительную связь динамики маркеров перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной системы (АОС) как у крыс с ВУК (S и tga , 0,99), так и у крыс НУК (I_{max} и tga , 1,00; S и I_{max} , 0,95; S и tga , 0,95). Сильная положительная корреляционная связь между МДА и показателями ПОЛ и АОС проявляется только при физической нагрузке у крыс с низким уровнем когнитивных способностей (МДА и I_{max} , 0,68; МДА и tga , 0,69; МДА и S , 0,67). Статистически значимая отрицательная связь между содержанием нитритов и интенсивностью ПОЛ ($(NO)-X$ и S , -0,64) отмечается в группе сравнения крыс с ВУК. Статистически значимая сильная отрицательная корреляционная связь между содержанием цитрулина – продукта NOS-реакции и нитритов (LC и $(NO)-X$, -0,7) у крыс с ВУК при физической нагрузке свидетельствует о возможном ингибировании продукции NO в ходе NOS-реакции и активации нитритредуктазной компоненты цикла окиси азота.

Статистически значимая отрицательная связь между $(NO)-X$ и I_{max} в группе сравнения крыс с ВУК, по-видимому, свидетельствует о его нейропротективном действии, так как известны антиоксидантные свойства оксида азота, которые препятствуют процессам перекисного окисления липидов, в частности нейтрализуя супероксид-аниона. Статистически значимых положительных корреляционных связей между показателями обмена оксида азота и свободнорадикальных процессов у крыс с НУК не наблюдалось ни в отсутствие физической

нагрузки, ни с физической нагрузкой. Это, по-видимому, свидетельствует об отсутствии компенсаторного действия оксида азота, что подтверждается результатами увеличения МДА, т.е. развития окислительного стресса в этой группе.

Статистически значимая отрицательная зависимость между содержанием цитруллина - продукта NOS-реакции и нитритов у крыс с ВУК при физической нагрузке свидетельствует о возможном ингибировании продукции NO в ходе NOS-реакции и активации нитритредуктазной компоненты цикла окиси азота. В ранний период церебральной гипоперфузии усиленное образование NO может соответствовать адаптационно-компенсаторным механизмам в нейронах, направленным на использование его в качестве протектора гипоксии. Цикл окиси азота обеспечивает не только генерацию NO, но и эффективную элиминацию высокорекреационноспособных свободнорадикальных соединений при помощи превращения в менее активные вещества, например в нитрит- и нитрат-ионы. Вместе с тем существует опасение, что при церебральной гипоксии увеличение акцептирования электронов ионами NO₂ с цепи переноса электронов может усугубить нарушение окислительных энергетических процессов, превращая компенсаторный механизм в патологический [5].

В наших исследованиях ВУК у животных был ассоциирован с большим повреждением структур нейроглиального ансамбля после двусторонней перевязки обеих сонных артерий [6], а также с большей смертностью [7]. Выше показано, что у животных с ВУК существует сопряженность между интенсивностью перекисного окисления липидов и уровнем нитратов (отрицательная корреляционная связь), это позволяет предположить связь гибели животных с ВУК с экспрессией NO-синтазы, рост активности которой, как и смертность, приходится на 3-4 неделю развития церебральной гипоперфузии [8].

Полученные нами данные позволяют предполагать большую эффективность коррекции последствий когнитивного снижения при церебральной гипоперфузии донаторами азота у пациентов с высоким уровнем когнитивных функций. Вместе с тем у пациентов с низкими исходными показателями когнитивных функций более эффективными могут оказаться антиоксиданты. Продемонстрированные выше закономерности, полученные в нашем исследовании на животных, для успешного внедрения в практику требуют дальнейших клинических исследований.

Заключение

Физические нагрузки при гипоксии мозга у крыс с ВУК приводят к окислительному стрессу. Продукция оксида азота у крыс с ВУК в условиях гипоксии носит компенсаторный нейропротективный характер. Активация нитритредуктазной компоненты цикла окиси азота

при физических нагрузках у животных с ВУК является, по-видимому, локальной стресс-лимитирующей реакцией в условиях гипоксии мозга.

Список литературы

1. Kachiwala S.J., Harris S.E., Wright A.F., Hayward C., Starr J.M., Whalley L.J., Deary I.J. Genetic influences on oxidative stress and their association with normal cognitive ageing. *Neurosci Lett*. 2005. Vol. 386 (2). P. 116-20. DOI: 10.1016/j.neulet.2005.05.067.
2. Borrer A. Brain-derived neurotrophic factor mediates cognitive improvements following acute exercise. *Med Hypotheses*. 2017. 106. P. 1-5. DOI: 10.1016/j.mehy.2017.06.024.
3. Szuhany K.L., Bugatti M., Otto M.W. A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. *J. Psychiatr Res*. 2015. 60. P. 56-64. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2014.10.003.
4. Криштоп В.В., Румянцева Т.А., Пожилов Д.А. Экспрессия GFAP в коре больших полушарий при развитии церебральной гипоксии у крыс с различными результатами в лабиринте Морриса // *Биомедицина*. 2020. Т. 16. № 1. С. 89-98. DOI: 10.33647/2074-5982-16-1-89-98.
5. Новиков В.Е., Катунина Н.П. Фармакология и биохимия гипоксии // *Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии*. 2002. № 2. С. 73-87.
6. Криштоп В.В., Никонорова В.Г., Румянцева Т.А. Изменения клеточного состава коры головного мозга у крыс с разным уровнем когнитивных функций при церебральной гипоперфузии // *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2019. Т. 8. № 4. С. 22-29. DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-4-22-29.
7. Chrishtop V.V., Pakhrova O.A., Rumyantseva T.A. Dynamics of permanent cerebral hypoxia of rats depending on individual features of higher nervous activity and sex. *Medical News of North Caucasus*. 2018. Vol. 13 (4). P. 654-659. DOI: 10.14300/mnnc.2018.13129.
8. Ren C., Li N., Li S., Han R., Huang Q., Hu J., Jin K., Ji X. Limb Ischemic Conditioning Improved Cognitive Deficits via eNOS-Dependent Augmentation of Angiogenesis after Chronic Cerebral Hypoperfusion in Rats. *Aging Dis*. 2018. Vol. 9 (5). P. 869-879. DOI: 10.14336/AD.2017.1106.