

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПАТОЛОГИЯ ВЫСШЕЙ  
НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ

УДК 616.8-092

ОЦЕНКА СЕНСОМОТОРНОГО ДЕФИЦИТА В ОТДАЛЕННОМ  
ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ИШЕМИИ/ГИПОКСИИ ГОЛОВНОГО  
МОЗГА НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫС

© 2013 г. Д. Н. Силачев<sup>1</sup>, М. И. Шубина<sup>1</sup>, С. С. Янкаускас<sup>1,2</sup>, В. П. Мкртчян<sup>1</sup>,  
В. Н. Манских<sup>2</sup>, М. В. Гуляев<sup>3</sup>, Д. Б. Зоров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,

<sup>2</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,

<sup>3</sup>Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,

e-mail: zorov@mail.genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 25.06.2012 г.

Принята в печать 19.10.2012 г.

Методом магнитно-резонансной томографии показано, что ишемия/гипоксия головного мозга новорожденных крысят, выполненная по методу Левина–Райса, вызывает односторонние повреждения в области коры больших полушарий, стриатуме и гиппокампе. Одностороннее ишемическое повреждение приводит к долгосрочным сенсомоторным и поведенческим нарушениям через 90–115 сут после операции при тестировании животных в наборе, состоящем из тестов “Цилиндр”, “Сужающаяся дорожка”, Монтойа и “Постановка конечности на опору”. Подобранный нами комбинация тестов в сочетании с магнитно-резонансной томографией позволяет достоверно оценить отдаленные сенсомоторные нарушения у взрослых животных, перенесших травму в неонатальном периоде.

*Ключевые слова:* ишемия/гипоксия, новорожденные, неврологический дефицит, сенсомоторный дефицит.

Evaluation of a Long-Term Sensorimotor Deficit after Neonatal Rat Brain  
Ischemia/Hypoxia

D. N. Silachev, M. I. Schubina, S. S. Jankauskas, V. P. Mkrthyan,  
V. N. Mansikh, M. V. Gulyaev, D. B. Zorov

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,*

*Department of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University,*

*Department of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Russia,*

e-mail: zorov@mail.genebee.msu.ru

The application of magnetic resonance imaging method showed that ischemia/hypoxia of the brain of neonatal rats made by the protocol suggested by Levine–Rice induces one-sided lesions in the areas of cerebral cortex, striatum and hippocampus. Unilateral ischemic injury leads to a long-term sensorimotor and behavioral distortions within 90–115 days after the operation which has been tested in animals by the battery of tests including Cylinder, Beam-walking, Staircase and Limb-placing test. Chosen battery of tests in combination with magnetic resonance imaging allows to reliably estimate the long-term sensorimotor recovery in adult animals suffered an injury in neonatal age.

*Keywords:* ischemia/hypoxia, neonatal, neurologic impairment, sensorimotor disability.

DOI: 10.7868/S0044467713030131

Неонатальная ишемия и/или гипоксия (ИГ) у человека являются основными факторами риска возникновения неврологических нарушений, которые часто проявляются в виде сенсомоторного и опорно-двигательного дефицита, церебрального паралича в детском возрасте и в зрелости [9].

Для экспериментального моделирования данного патологического состояния новорожденных с целью поиска нейропротекторных препаратов широко используется модель С. Левина [17], модифицированная Дж.Е. Райсом [22], основанная на унилатеральной перерезке сонной артерии с последующей системной гипоксией. В этой модели достаточно точно воспроизводятся патоморфологические и функциональные нарушения, наблюдаемые у новорожденных после ишемии/гипоксии головного мозга [3].

Было установлено, что оценка моторного и сенсомоторного дефицита является достаточно объективным показателем функциональных нарушений мозга в модели Левина—Райса [15]. Однако до настоящего времени в большей части работ по оценке неврологического дефицита в модели ИГ все измерения были выполнены только в краткосрочный период [5, 6, 15, 18, 32]. В этих исследованиях показана существенная задержка развития некоторых моторных и когнитивных функций преимущественно в первые 3 недели после неонатального ишемического/гипоксического повреждения. Имеются только единичные работы, где изучались когнитивные и локомоторные расстройства в течение продолжительного периода времени (более 3 мес.) [15, 32]. Таким образом, большинство используемых различными исследователями сенсомоторных тестов способно выявить неврологический дефицит только в течение первых недель после ишемии [7], что обусловлено высокой компенсаторной реорганизацией мозга новорожденных [20, 21, 29]. В то же время вторичная дегенерация нейронов в позднем постишемическом периоде может отменять ранний положительный эффект терапевтического воздействия или само лечение может приводить к поздней гибели клеток [24].

Таким образом, существует очевидная необходимость в применении чувствительных долгосрочных протоколов измерения нейрофункциональных показателей у экспериментальных животных в модели ИГ мозга новорожденных. Ряд исследователей приходят к

выводу, что протокол оценки функциональных последствий повреждения головного мозга должен быть мультимодальным, состоящим из нескольких поведенческих тестов, направленных на всестороннюю оценку сенсомоторных и когнитивных функций в долгосрочном периоде [12, 27, 28]. Разработка подробных схем оценки неврологического дефицита в течение продолжительного времени является необходимым условием для всестороннего изучения потенциальных нейропротекторных стратегий.

В настоящем исследовании были отобраны тесты, которые наиболее эффективно показали себя в оценке долгосрочного сенсомоторного дефицита у взрослых животных после фокальной ишемии [10, 24]. Были выбраны тест “Цилиндр” для оценки асимметрии использования передних конечностей, тест “Сужающаяся дорожка”, выявляющий опорно-двигательный дефицит, и тест Монтойа, являющийся высоко-чувствительным для оценки тонкой моторики передних конечностей. Также нами была использована балльная оценка неврологического дефицита — тест “Постановка конечности на опору”. Кроме того, в настоящей работе применен метод магнитно-резонансной томографии (МРТ) для ранней неинвазивной оценки зоны повреждения незрелого головного мозга с последующим сравнением сформировавшегося очага во взрослом мозге и сопоставлением полученных данных с нейрофункциональными изменениями.

Целью настоящей работы была разработка протокола оценки сенсомоторного и опорно-двигательного дефицита в отдаленном периоде после неонатальной ИГ на основании описанных выше тестов, направленных на комплексную и устойчивую оценку функциональных изменений.

## МЕТОДИКА

### Животные

В работе использовались нелинейные крысы, содержащиеся в условиях вивария с 12-часовым световым циклом при постоянной температуре ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). При работе с животными соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 2010/63/EU об использовании животных для экспериментальных исследований. Количество крысят в помете составля-

ло 9–12. Для эксперимента было отобрано 39 7-дневных крысят обоих полов массой от 9 до 14 г.

### **Моделирование ишемического/гипоксического повреждения**

Крысят из одного помета случайным образом делили на три группы: контроль ( $n = 12$ ) – интактные животные, ИГ ( $n = 15$ ) – крысы с ишемией/гипоксией мозга и гипоксией мозга (гипокс,  $n = 12$ ). В группе ИГ была проведена операция по методу Левина–Райса с некоторыми модификациями для получения ишемического/гипоксического повреждения головного мозга [22]. Животных анестезировали 1%-ным изофлюраном. Выделяли левую общую сонную артерию и пережигали ее электрокаутером, далее крысят подвергали в течение 2 ч системной гипоксии в смеси газов, содержащей 8% кислорода и 92% азота. После гипоксии животных возвращали к матери. С животными группы Гипокс проводили те же манипуляции, как в группе ИГ, за исключением пережигания общей сонной артерии. Для поддержания постоянной температуры тела во время операции и до выхода из наркоза крысят помещали на термостатируемый коврик ( $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Длительность операции составляла около 10 мин.

### **Поведенческие тесты**

Все поведенческие тесты были выполнены на оборудовании ООО “НПК Открытая Наука”. В тестах оценивался функциональный дефицит в передних и задних конечностях, контралатеральных левому поврежденному полушарию.

#### **Тест “Постановка конечности на опору”**

Используемый протокол основан на методике, описанной Де Риком и соавт. [8] и модифицированной Ю. Ёолкконеном и соавт. [16]. Крысы были приучены к рукам за 3 дня до тестирования. Тест “Постановка конечности на опору” использовался для оценки неврологического дефицита у животных в возрасте 42 и 90 сут. Тест состоял из семи испытаний, оценивающих сенсомоторную интеграцию передних и задних конечностей в ответ на тактильную, проприоцептивную и зрительную стимуляцию.

1. Крысу передними конечностями размещали на край стола, придерживая туловище. Каждую переднюю лапу поочередно аккуратно стаскивали с края стола, контролируя ее возвращение и размещение. В норме крыса сразу же возвращала конечность на место.

2. Выполнялось так же, как первое испытание, но с некоторым изменением: голову крысы отводили вверх под углом 45 град., таким образом не давая ей возможность видеть поверхность стола или контактировать с ней вибриссами.

3. Крысу размещали параллельно краю стола и переднюю лапу отводили в сторону.

4. Так же как в 3-м испытании, но только для задней конечности.

5. Крысу задними лапами ставили на край стола и каждую лапу поочередно отводили вниз.

6. Крысу размещали передними лапами у края стола и аккуратно подталкивали за туловище по направлению к краю стола. В норме крыса сопротивлялась толканию, перебирая и упираясь передними лапами, но у крыс с ишемией мозга поврежденная конечность соскальзывала.

7. Крысу держали за корень хвоста и медленно опускали на поверхность стола. В норме крыса вытягивала вперед передние конечности за 10 см до поверхности стола.

Тест оценивался следующим образом: крыса выполняла испытание нормально – 2 балла; крыса выполняла испытание с промедлением ( $>2$  с) и/или не полностью – 1 балл; крыса не выполнила испытание – 0 баллов.

#### **Тест “Цилиндр”**

В тесте “Цилиндр” оценивалась асимметрия использования животным передних конечностей в течение спонтанного исследования стенок цилиндра [26]. Тестирование животных проводили на 90-е сутки после индукции ИГ. Крысу помещали в прозрачный цилиндр (высотой 30 см и диаметром 20 см) и проводили видеорегистрацию движений камерой, расположенной под цилиндром, в течение 5–8 мин. Подсчитывали количество независимого использования контралатеральной передних конечностей во время исследования стенки цилиндра после подъема животного на задние лапы, а также

одновременное (совместное) использование обеих лап.

### Тест “Сужающаяся дорожка”

Опорно-двигательный дефицит в передних и задних конечностях оценивали с помощью теста “Сужающаяся дорожка” на 90-е сутки после операции. Установка теста “Сужающаяся дорожка” представляет собой сужающуюся доску длиной 165 см и расположенные под ней борта для опоры конечностей животного во время соскальзывания. В конце установки располагалась темная камера, являющаяся конечной целью перемещения животного. Точка старта освещалась ярким светом, мотивируя крыс бежать к концу доски в темную камеру. Крыс предварительно обучали в течение 3 дней пересекать всю длину установки. Процесс тестирования регистрировался на видеокамеру с последующим анализом количества соскальзываний передней и задней лап. Постановка конечности полностью на борт считалась как полное соскальзывание или частичное, если конечность крысы частично располагалась на верхней доске и борту одновременно, соответственно оцениваясь в 1 или 0.5 балла. Среднее значение актов соскальзывания, полученное в трех испытаниях, бралось для статистического анализа. Данные представляли в виде коэффициента соскальзывания, который рассчитывали для передней и задней конечностей отдельно по формуле: (количество полных соскальзываний  $\times$  1 + количество частичных соскальзываний  $\times$  0.5)/общее количество шагов [25].

### Тест Монтойа

Тест Монтойа применяется для оценки навыков независимого владения передними лапами при поедании шариков корма, расположенных на различных уровнях двух лестниц в тест-установке [19]. С целью увеличения мотивации к поеданию шариков корма во время тестирования животных ограничивали в питании с 91-х суток после ИГ, пока их масса не составляла 90% от питания *ad libitum*, и поддерживали его на этом уровне в течение всего периода тестирования. Для обучения и тестирования на каждую ступень лестницы помещали по три шарика корма ( $\approx$ 50 мг каждый). Животных начинали приучать к установке через 95 сут после ИГ в течение 5 сут по

15 мин ежедневно. Тестировать начинали через 100 сут дважды в день по 10 мин с интервалом 2 ч в течение 2 недель (с понедельника по пятницу). По окончании тестирования с каждой стороны подсчитывали количество съеденных шариков корма. Данные представляли в виде среднего количества съеденных шариков за весь период тестирования с контралатеральной стороны, нормированное на таковое с ипсилатеральной стороны.

### МРТ-исследование головного мозга

Головной мозг всех экспериментальных животных исследовали с помощью МРТ на 7-е и 90-е сутки после операции. Все МРТ-эксперименты были выполнены, как описано ранее [2], на приборе BioSpec 70/30 (“Bruker”, Germany) с индукцией магнитного поля 7 Тл и градиентной системой 105 мТл/м. Морфометрический анализ МР-изображений проводился в программе ImageJ 1.38 $\times$  (National Institutes of Health, USA).

### Гистологическое исследование, определение массы полушарий

По окончании тестирования в тесте Монтойа на 115-е сутки после ИГ животных выводили из эксперимента введением повышенной дозы хлоралгидрата. По 3 крысы из каждой группы случайным образом отбирали для нейрогистологического исследования. У оставшихся животных извлекали головной мозг, разделяли на полушария и производили взвешивание.

Для нейрогистологического исследования экспериментальных животных под хлоралгидратным наркозом транскардиально перфузировали модифицированным фиксатором Беллесницкого–Лилли: смесью формалин–спирт–уксусная кислота в пропорции 2 : 7 : 1. Парафиновые срезы готовили с помощью стандартной гистологической техники и окрашивали гематоксилин–эозином.

### Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Statistica 6.0 (“StatSoft”, USA). Нормальность распределения признака в выборке оценивали по W-критерию Шапиро–Уилка. Для оценки статистической значимости различий в поведенческих тестах использовали U-критерий Манна–Уитни. Корреля-

ционный анализ между размером пораженной области мозга и неврологическим дефицитом, оцененным в тесте “Постановка конечности на опору”, проводили методом Спирмена. Для оценки статистической значимости различий объемов инфаркта и массы полушарий мозга использовали *t*-критерий Стьюдента. Данные представлены в виде среднее  $\pm$  ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Морфологическая оценка повреждения головного мозга

Оценку повреждения проводили методом МРТ через 7 и 90 сут после индукции ИГ. Повреждение головного мозга у животных в группе ИГ развивалось с различной степенью тяжести, делясь на подгруппы со слабым, умеренным и жестким повреждением. На 90-е сутки у 2 животных наблюдалось слабое повреждение (рис. 1, А), умеренная атрофия ипсилатерального полушария (рис. 1, Б) была у 6 крыс. У 7 животных развилась тяжелая степень церебральной атрофии с образованием большой порэнцефалической кисты и с дегенерацией ипсилатеральной коры, а также с изменениями в контралатеральном полушарии в виде вентрикуломегалии и истончения коры (рис. 1, В). Повреждение главным образом затрагивало сенсомоторную кору, стриатум и гиппокамп. В контрольной и Гипокс группах методом МРТ не было выявлено повреждений. Для группы ИГ на 90-е сутки были проведены дополнительные исследования головного мозга с использованием FLAIR режима МРТ, основанного на вычитании сигнала воды для характеристики кистозных трансформаций. Было выявлено, что зоны мозга с гиперинтенсивным сигналом на T2-взвешенных (T2В) МР-изображениях соответствуют зоне травмы головного мозга и заполнены ликвором (рис. 1, А, 3, Б, 3, В, 3).

Морфометрическое измерение объема повреждений на T2В МР-изображениях на 7-е и 90-е сутки выявило статистически значимую динамику увеличения объема повреждения в группе ИГ. На 7-е сутки объем инфаркта составил  $120 \pm 8.5$  мм<sup>3</sup>, на 90-е сутки  $330 \pm 19.7$  мм<sup>3</sup>, что равнялось  $46.7 \pm 30.1$  и  $59.7 \pm 2.5\%$  ( $p < 0.05$ ) от объема поврежденного полушария соответственно (рис. 2, А). Масса мозга в группе ИГ ипсилатерального полушария была на 43.3% меньше по сравнению с контралатеральным полушарием, составляя  $0.29 \pm$

$\pm 0.04$  и  $0.67 \pm 0.02$  г ( $p < 0.001$ ) соответственно (рис. 2, Б).

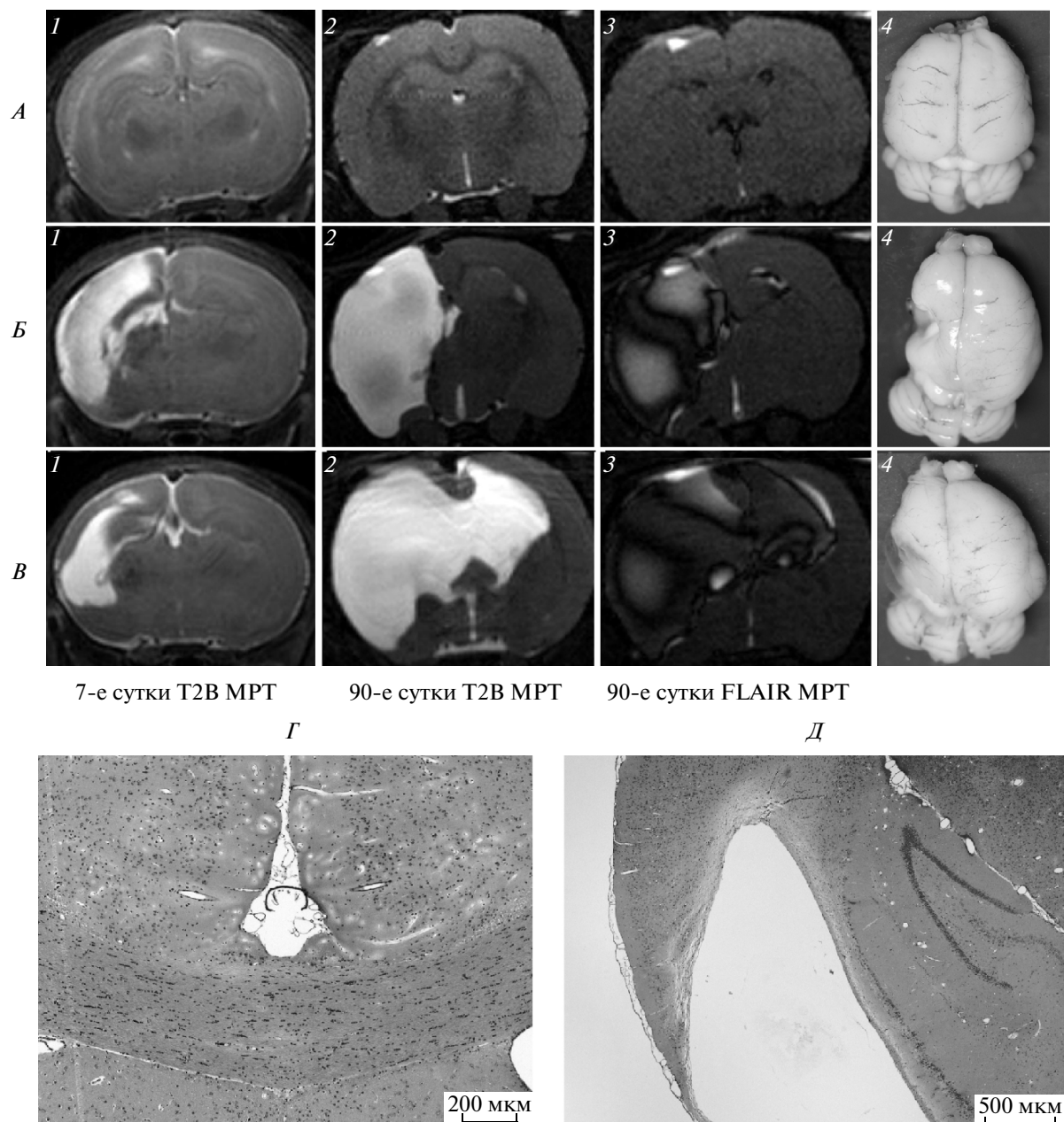
Гистологическое исследование выявило в группах ИГ и Гипокс рассеянные многочисленные мелкие очаги просветления нейропилля вокруг нейронов и сосудов в неокортексе, что свидетельствует о нейродегенеративных процессах в данных участках коры (рис. 1, Г). В группе ИГ стенки кист со стороны конвекса были представлены тонкой (толщиной в две-три клетки) пленкой соединительной ткани (рис. 1, Д). Кисты свободно, без видимой границы переходили в полость бокового желудочка мозга, выстланного эпендимой. Стенки кист местами представлены тонкой соединительнотканной пленкой, местами — остатками ткани коры мозга, отделенной от полости выраженным глиомезодермальным рубцом.

### Тест “Постановка конечности на опору”

С помощью теста “Постановка конечности на опору” было показано, что ИГ приводила к сенсомоторным нарушениям в передних и задних конечностях. Через 42 сут контрольные крысы набирали в этом тесте 14 баллов, группа Гипокс  $13 \pm 0.3$  балла, тогда как животные группы ИГ только  $4.5 \pm 0.4$  балла (рис. 3). К 90-м суткам у животных с ИГ происходило спонтанное статистически значимое снижение неврологического дефицита с повышением балльности до  $6.4 \pm 0.6$ , тогда как у животных группы Гипокс неврологический статус понижался до  $11.2 \pm 0.3$  балла (рис. 3). В контрольной группе животных неврологический дефицит выявлен не был. Проведенный корреляционный анализ для группы ИГ между объемом повреждения головного мозга и неврологическим дефицитом на 90-е сутки не выявил статистически значимой линейной связи между признаками ( $r = 0.37$ ,  $p = 0.2$ ).

### Тест “Цилиндр”

В тесте “Цилиндр” в контрольной и Гипокс группах независимое использование контра- и ипсилатеральной передней лапы было 21 и 20.5%, 20.3 и 19.3% соответственно от всех касаний стенок цилиндра. На 90-е сутки после операции у крыс группы ИГ использование контралатеральной лапы статистически значимо снижалось в 2 раза (до 9%,  $p < 0.05$ ). Это снижение компенсировалось по-



**Рис. 1.** Оценка степени повреждения головного мозга. *А–В* – магнитно-резонансные изображения трех срезов головного мозга животных, полученных методом Т2-взвешенной МРТ (Т2В МРТ) на 7-е и 90-е сутки и FLAIR МРТ на 90-е сутки с соответствующими фотографиями мозга, полученными после завершения эксперимента, у репрезентативных крыс группы ИГ. Степень повреждения головного мозга распределялась по трем категориям: слабое (*А, 1–4*), умеренное (*Б, 1–4*) и высокое (*В, 1–4*). *Г* – очаги просветления нейропила в коре головного мозга крысы группы Гипокс через 115 сут после 2 ч гипоксии. *Д* – морфология кисты в области коры головного мозга крысы группы ИГ.

**Fig. 1.** Evolution of brain lesions. *А–В* – magnetic resonance images of the animal brain obtained by T2-weighted MRI (T2W MRI) on the 7th and 90th day, and FLAIR MRI on the 90th day with appropriate photographs of brains obtained after completion of the experiment by a representative of the ischemia/hypoxia group. The degree of brain injury was graded by three categories: slight (*А, 1–4*), moderate (*Б, 1–4*) and severe (*В, 1–4*). *Г* – foci of lightening of neuropil in the rat cerebral cortex from a hypoxia group 115 days after 2 h of hypoxia. *Д* – morphology of the cysts in the rat cortex exposed to ischemia/hypoxia.

вышением использования ипсилатеральной лапы на 43% по сравнению с контрольной группой (рис. 4). В то же время пропорция одновременного использования лап не изменялась во всех группах и составила в среднем 60% (рис. 4).

#### Тест “Сужающаяся дорожка”

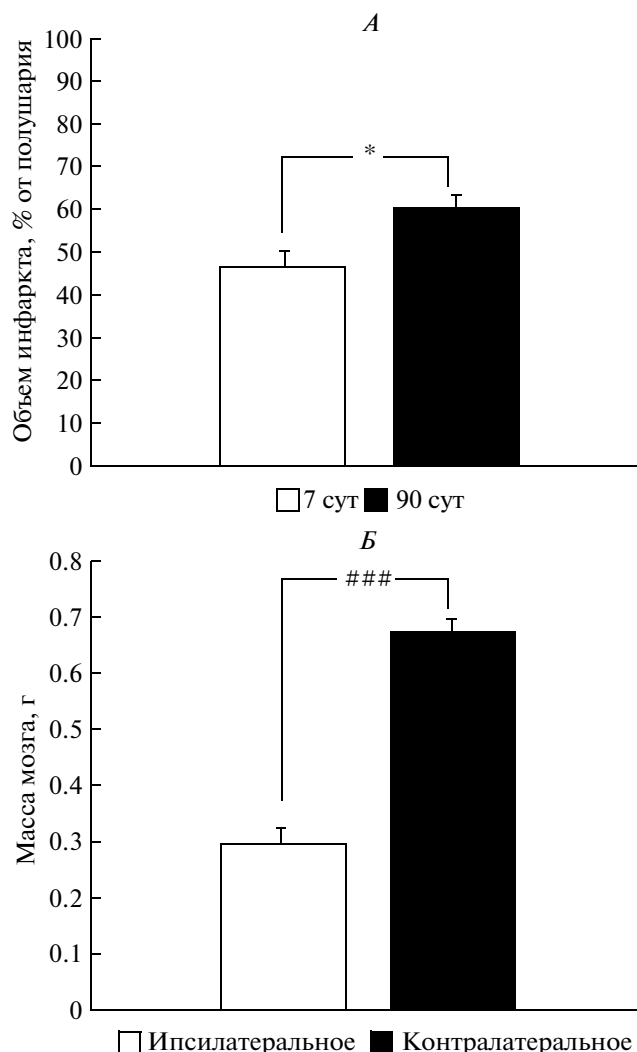
В данном тесте оценивался опорно-двигательный дефицит в передних и задних конечностях. Анализ данных в тесте “Сужающаяся дорожка” не выявил различий в коэффициенте соскальзывания для задней лапы у всех групп животных. Однако данный коэффициент для передней лапы был статистически значимо выше в 2 раза у группы ИГ и составил  $11 \pm 3.2\%$  по сравнению с группой Гипокс. У животных контрольной и Гипокс групп он составил  $3.6 \pm 0.9$  и  $5.0 \pm 1.7\%$  соответственно, между этими группами статистически значимых различий не выявлено (рис. 5).

#### Тест Монтойа

В камере Монтойа животных тестировали в течение 10 дней и подсчитывали среднее количество съеденных шариков корма за весь период тестирования. В данной камере животное могло захватить шарик корма, только скоординировав движение всех пальцев кисти. В группах контрольной и Гипокс не было выявлено статистически значимых различий в количестве съеденных шариков. Животные, перенесшие ИГ, имели выраженное нарушение в моторике контралатеральной лапы, выражающееся в невозможности доставания корма с нижних ступенек лестницы. Животные этой группы съедали с контралатеральной стороны в среднем на 40% меньше корма по сравнению с группой Гипокс ( $p < 0.001$ ) (рис. 6).

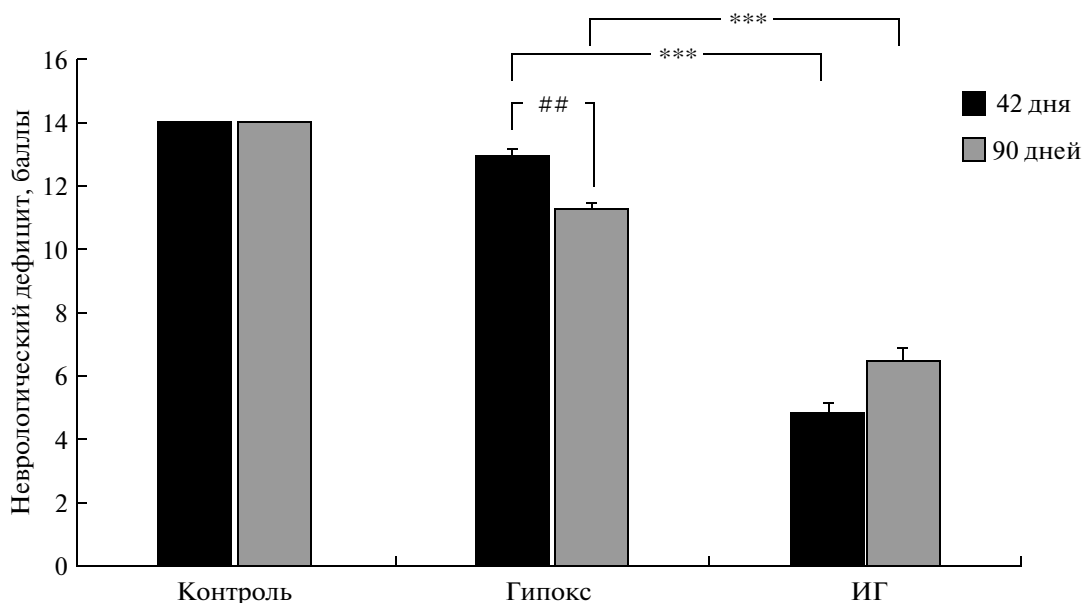
### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы показали, что отобранные нами поведенческие тесты являются чувствительными и объективными для долгосрочной оценки нейрофункциональных изменений в модели неонатальной ИГ головного мозга у крыс. В результате индукции ИГ повреждались преимущественно структуры головного мозга, ответственные за сенсомоторные функции, т.е. сенсомоторная кора и стриатум, что соответствует повреждаемым отделам мозга при асфиксии у новорожденных детей [30].



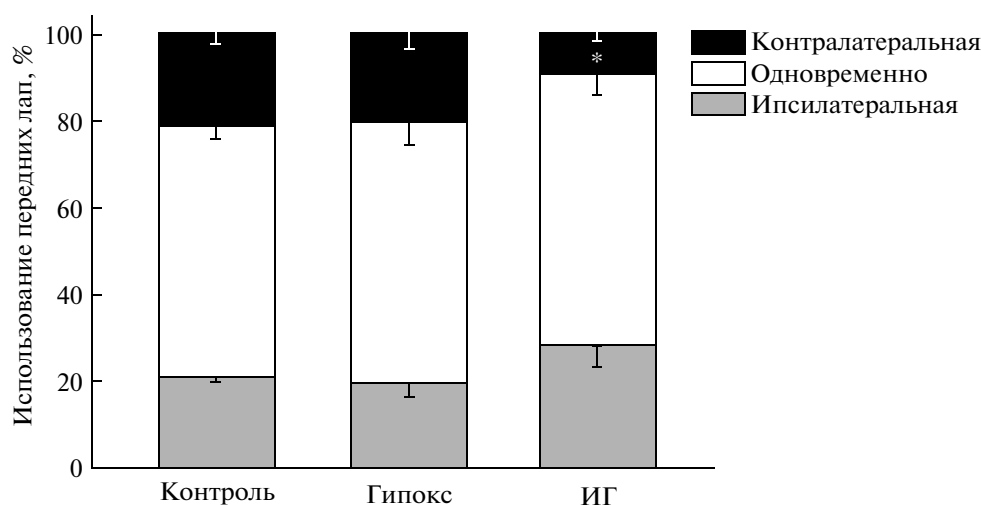
**Рис. 2.** Оценка объема инфаркта и массы полушарий головного мозга животных после индукции ИГ у неонатальных крысят. *А* – оценка объема инфаркта по T2-взвешенным МР-изображениям через 7 и 90 сут после индукции ИГ. *Б* – масса полушарий головного мозга крыс группы ИГ через 115 сут после операции. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  ошибка среднего. \* –  $p < 0.05$ , внутригрупповое сравнение “7 сут” и “90 сут” (t-критерий Стьюдента); ### –  $p < 0.001$  по сравнению с контралатеральным полушарием (t-критерий Стьюдента).

**Fig. 2.** Evolution of the lesion volume in the brain and weight of cerebral hemispheres after induction of hypoxia/ischemia in neonatal rats. *A* – evolution of brain lesions, as assessed by T2-weighted MR-images after being subjected to hypoxia/ischemia at 7 and 90 days. *B* – the weight of cerebral hemispheres rats from group hypoxia/ischemia at 115 days after operation. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance: \* –  $p < 0.05$  compared to within the groups between “7 days” and “90 days” (t-test); ### –  $p < 0.001$  compared to contralateral hemispheres (t-test).



**Рис. 3.** Неврологический дефицит, оцененный в тесте “Постановка конечности на опору”, через 42 и 90 сут после индукции ишемии/гипоксии. Гипокс – гипоксия, ИГ – ишемия/гипоксия. Данные представлены в виде среднее  $\pm$  ошибка среднего. \*\*\* –  $p < 0.001$ , сравнение группы Гипокс с ИГ; ## –  $p < 0.01$ , внутригрупповое сравнение “42 сут” и “90 сут” (U-критерий Манна–Уитни).

**Fig. 3.** Performance of a limb-placing test in hypoxia/ischemia rats 42 and 90 days after operation. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance: \*\*\* –  $p < 0.001$  compared to “hypoxia” and “hypoxia/ischemia” groups; ## –  $p < 0.01$  compared to within the groups between “42 days” and “90 days”.



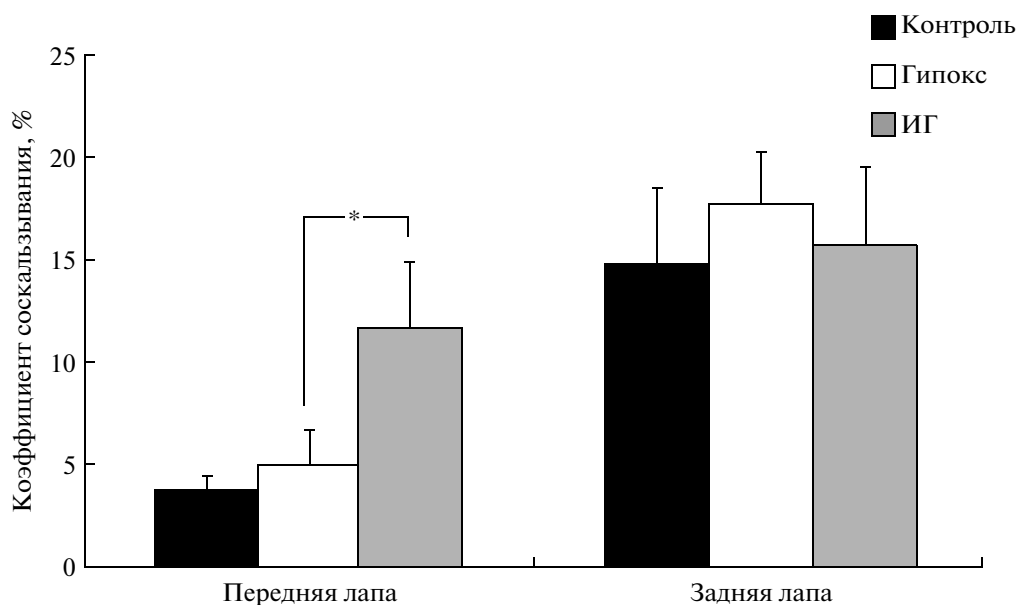
**Рис. 4.** Ишемия/гипоксия головного мозга вызывает асимметрию использования передних конечностей, оцененную в тесте “Цилиндр” на 90-е сутки после операции. Гипокс – гипоксия; ИГ – гипоксия/ишемия. Данные представлены в виде среднее  $\pm$  ошибка среднего. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой Гипокс (U-критерий Манна–Уитни).

**Fig. 4.** Brain hypoxia/ischemia induced limb asymmetry measured in the “Cylinder” test on 90th day after the surgery. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance: \* –  $p < 0.05$  compared to “hypoxia” group (U-test Mann–Whitney).

Проведенный нами анализ МР-изображений выявил наличие гетерогенности в повреждениях у животных после ИГ головного

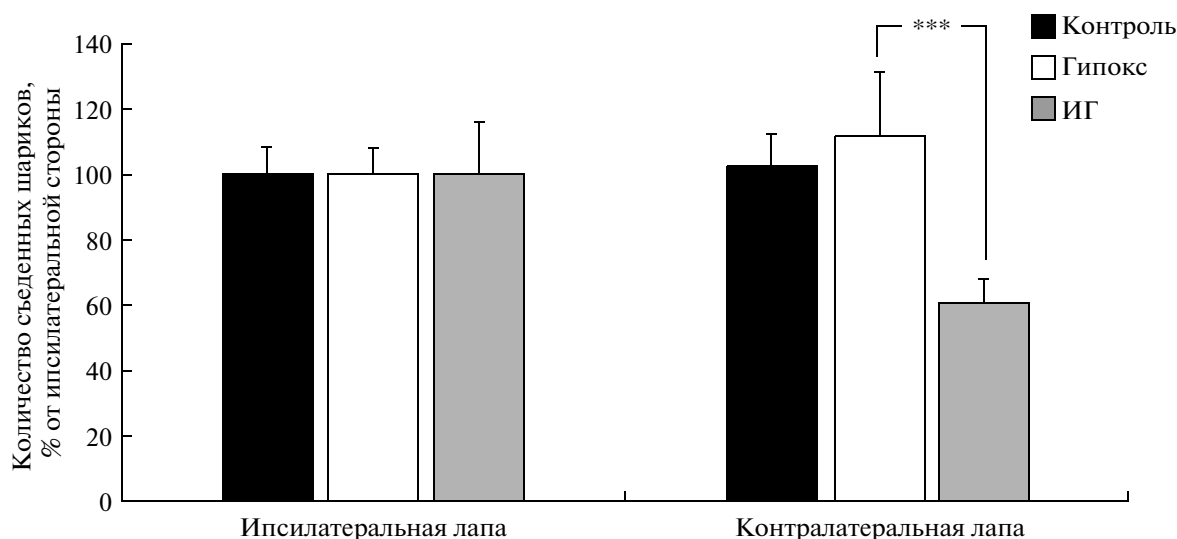
мозга на 90-е сутки. Повреждение можно было разделить на слабое, умеренное и высокое, что соотносится с описанием данной модели,





**Рис. 5.** Оценка коэффициента соскальзывания передней и задней конечности в тесте “Сужающаяся дорожка” у крыс через 90 сут после индукции ишемии/гипоксии. Результаты представлены в виде коэффициента соскальзывания. Гипокс – гипоксия; ИГ – ишемия/гипоксия. Данные представлены в виде среднее  $\pm$  ошибка среднего. \* –  $p < 0.05$  при сравнении группы Гипокс с ИГ (U-критерий Манна–Уитни).

**Fig. 5.** Rats forelimb and hindlimb performance in the beam-walking test on 90th day after the surgery. Results are expressed as slip ratio for the impaired (contralateral to lesion) forelimb and hindlimb. Statistical significance: \* –  $p < 0.05$  compared to “hypoxia” with “hypoxia/ischemia” groups (U-test Mann–Whitney).



**Рис. 6.** Влияние неонатальной гипоксии/ишемии головного мозга на тонкие моторные навыки в тесте Монтойа через 115 сут после операции. Результаты представлены в виде среднего количества съеденных шариков за весь период тестирования с контралатеральной стороны, нормированного на таковое с ипсилатеральной стороны. Гипокс – гипоксия; ИГ – гипоксия/ишемия. Данные представлены в виде среднее  $\pm$  ошибка среднего. \*\*\* –  $p < 0.001$  при сравнении группы Гипокс с ИГ (U-критерий Манна–Уитни).

**Fig. 6.** Effect of neonatal hypoxia–ischemia on a skilled motor task determined by the staircase test on 115th day after the operation. Results represent the average number of consumed pellets with contralateral side was normalized to ipsilateral side. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance: \*\*\* –  $p < 0.001$  compared to “hypoxia” with “hypoxia/ischemia” groups (U-test Mann–Whitney).

имеющимся в литературе [31]. Наличие вариативности повреждений может вызывать затруднения в оценке нейрофункционального статуса, что в свою очередь предъявляет повышенные требования к выбору поведенческих тестов, способных выявить минимальные функциональные изменения.

Для полноценной оценки функциональной двигательной активности необходимо исследование корковых и подкорковых двигательных систем. Для этого используют наборы поведенческих тестов, всесторонне оценивающих работу передних конечностей как наиболее приспособленных к сложным движениям.

Независимую оценку работы передних конечностей мы проводили с помощью тестов “Цилиндр” и Монтойа. Ранее во многих работах была показана эффективность этих тестов для оценки сенсомоторных нарушений на различных моделях ишемии головного мозга крыс [1, 13]. В тесте “Цилиндр” оценивается асимметрия работы передних конечностей в виде подсчета частоты независимого или одновременного использования передних лап для поддержания позы животного во время исследования стенок цилиндра. ИГ приводила к статистически значимому снижению использования конралатеральной лапы, тогда как одновременное использование лап оставалось неизменным во всех группах. Тест Монтойа сводится к задаче по сбору шариков корма с разных ступеней лестницы. Такая работа требует сложной и точной регуляции моторики, что позволяет получать объективные количественные данные по функционированию сенсомоторных областей головного мозга, исходя из количества съеденных шариков [19]. В настоящем исследовании мы показали наличие выраженного функционального дефицита в конралатеральной конечности, в результате чего животные могли собирать этой конечностью корм преимущественно с верхних ступенек в отличие от ипсилатеральной лапы. В нашем протоколе тест Монтойа был использован на заключительном этапе после того, как животные были протестированы во всех других тестах, так как в этом тесте применялось ограничение питания животных, что могло бы оказать влияние на результаты в других тестах [23].

Тест “Сужающаяся дорожка” был включен в протокол с целью расширения спектра измеряемых параметров, так как он позволяет

одновременно выявлять опорно-двигательные нарушения в передних и задних конечностях во время движения животного. Ранее было показано, что этот тест является чувствительным к фокальным повреждениям сенсомоторной коры, а также дорзолатерального стриатума [7, 14], т.е. структур, аналогичных повреждаемым в модели неонатальной ИГ. Анализ полученных результатов выявил функциональные нарушения только в передних конечностях, что подтверждает предположение о предпочтительности выбора передних конечностей для оценки сенсомоторных нарушений.

В настоящем исследовании нами также использовалась неврологическая шкала, оценивающая сенсомоторный дефицит в ответ на проприоцептивную, тактильную и зрительную стимуляцию передних и задних конечностей [16], являющаяся расширенным аналогом хорошо известной шкалы Дж.Б. Бедерсона [4]. Важно отметить, что с помощью теста “Постановка конечности на опору” функциональные нарушения были выявлены в группах крыс, перенесших ишемию/гипоксию или только гипоксию, тогда как в остальных тестах для группы гипоксии функциональных изменений не было отмечено. Данный тест состоит из семи испытаний, оценивающих функционирование различных зон соматической сенсомоторной коры. Гистологическое исследование срезов головного мозга крыс, подвергнутых гипоксии, выявило диффузное повреждение в неокортексе, в том числе в различных зонах соматической сенсомоторной коры. Однако нам не удалось обнаружить преобладания повреждения в какой-либо из зон как гистологическим методом, так и с помощью теста постановки конечности. Таким образом, одним из важных преимуществ этого теста является интегративный характер оценки сенсомоторной функции, позволяющий выявлять небольшие диффузионные повреждения в области сенсомоторной коры в отличие от тестов “Цилиндр”, “Сужающаяся дорожка” или Монтойа. Животные, перенесшие ИГ, набирали в тесте “Постановка конечности на опору” меньше баллов по сравнению с гипоксией и контрольными, однако имелась положительная динамика снижения неврологического дефицита на 90-е сутки по сравнению с 42-ми. Отсутствие статистически значимой корреляции между объемом повреждения головного мозга и неврологическим дефицитом на 90-е сутки у

группы ИГ может говорить о наличии нелинейного характера связи между признаками. Так, на оценку неврологического дефицита влияет не только объем повреждения, но и наличие высокой пластичности мозга у молодых животных, обуславливающей восстановление сенсомоторных функций. С этими выводами согласуется наблюдаемое нами спонтанное восстановление функций передних и задних конечностей в группе ИГ. Такая пластичность может быть реализована, например, за счет передачи функции из поврежденных структур в здоровые. В работе М. Такахаши и коллег [29] было показано, что односторонняя декортикация неонатальных крысят вызывала выраженный сенсомоторный дефицит в контралатеральной передней лапе, а дополнительное повреждение сенсомоторной коры в противоположном полушарии приводило к тяжелым функциональным нарушениям уже в обеих лапах и сопровождалось формированием кортикофугальными аксонами из поврежденной коры абберрантных проекций в контралатеральные структуры, отвечающие за сенсомоторные функции. Также нейропластичность может быть обеспечена за счет образования новых нейральных клеток из депо стволовых клеток в субвентрикулярной зоне и миграции их в зону повреждения [11]. В группе животных, перенесших только гипоксию, наблюдалась обратная небольшая динамика повышения неврологического дефицита, что может быть объяснено развитием отсроченного повреждения в результате перенесенной 2-часовой гипоксии без ишемии, что подтверждается гистологическим исследованием. Разнонаправленная динамика в группах ИГ и Гипокс, выявленная с помощью теста “Постановка конечности на опору”, не исключает одновременного протекания в обеих группах процессов отсроченного повреждения и компенсаторных реакций, а говорит о преобладании того или иного процесса в зависимости от степени повреждения мозга. Несмотря на отрицательную динамику в группе Гипокс неврологический дефицит был в 2 раза менее выражен по сравнению с группой ИГ.

В настоящем исследовании мы впервые описали использование набора тестов, состоящего из тестов “Цилиндр”, “Сужающаяся дорожка”, Монтойа и неврологической шкалы, для оценки отдаленных сенсомоторных нарушений у взрослых крыс после неонатальной ИГ. Применение этого набора тестов

поможет получить значимую информацию для будущих исследований по оценке нейропротекторных терапевтических стратегий на модели неонатальной ИГ головного мозга.

## ВЫВОДЫ

1. Одностороннее ишемическое повреждение приводит к долгосрочным сенсомоторным и поведенческим нарушениям через 90–115 сут после операции при тестировании животных в наборе, состоящем из тестов “Цилиндр”, “Сужающаяся дорожка”, Монтойа и “Постановка конечности на опору”.

2. Неврологическая шкала “Постановка конечности на опору” оказалась наиболее чувствительным тестом для выявления сенсомоторных нарушений в отдаленном периоде после неонатальной ишемии/гипоксии головного мозга.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Середенин С.Б., Силачев Д.Н., Гудашева Т.А., Пирогов Ю.А., Исаев Н.К. Исследование нейропротекторного действия дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 при индукции экспериментальной фокальной ишемии в бассейне средней мозговой артерии. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2011. 151(5): 518–519.
2. Силачев Д.Н., Учеваткин А.А., Пирогов Ю.А., Зоров Д.Б., Исаев Н.К. Сравнение магнитно-резонансной томографии и трифенилтетразолиевого выявления повреждения головного мозга как методов исследования экспериментальной фокальной ишемии. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2009. 147(2): 223–226.
3. Andine P., Thordstein M., Kjellmer I., Nordborg C., Thiringer K., Wennberg E., Hagberg H. Evaluation of brain damage in a rat model of neonatal hypoxic-ischemia. J. Neurosci. Methods. 1990. 35: 253–260.
4. Bederson J.B., Pitts L.H., Tsuji M., Nishimura M.C., Davis R.L., Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke. 1986. 17: 472–476.
5. Bona E., Hagberg H., Loberg E.M., Bagenholm R., Thoresen M. Protective effects of moderate hypothermia after neonatal hypoxia-ischemia: short- and long-term outcome. Pediatr. Res. 1998. 43: 738–745.
6. Bona E., Johansson B.B., Hagberg H. Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. Pediatr. Res. 1997. 42: 678–683.
7. Corbett D., Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. Prog. Neurobiol. 1998. 54: 531–548.

8. *De Ryck M., Van Reempts J., Borgers M., Wauquier A., Janssen P.A.* Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. *Stroke*. 1989. 20: 1383–1390.
9. *De Vries L.S., Jongmans M.J.* Long-term outcome after neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal*. 2010. 95: 220–224.
10. *Grabowski M., Brundin P., Johansson B.B.* Paw-reaching, sensorimotor, and rotational behavior after brain infarction in rats. *Stroke*. 1993. 24: 889–895.
11. *Hayashi T., Iwai M., Ikeda T., Jin G., Deguchi K., Nagotani S., Zhang H., Sehara Y., Nagano I., Shoji M., Ikenoue T., Abe K.* Neural precursor cells division and migration in neonatal rat brain after ischemic/hypoxic injury. *Brain Res*. 2005. 1038: 41–49.
12. *Hicks A., Schallert T., Jolkkonen J.* Cell-based therapies and functional outcome in experimental stroke. *Cell Stem Cell*. 2009. 5: 139–140.
13. *Hobbs C.E., Oorschot D.E.* Neonatal rat hypoxia-ischemia: long-term rescue of striatal neurons and motor skills by combined antioxidant-hypothermia treatment. *Brain Pathol*. 2008. 18: 443–454.
14. *Hunter A.J., Mackay K.B., Rogers D.C.* To what extent have functional studies of ischaemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents? *Trends Pharmacol. Sci*. 1998. 19: 59–66.
15. *Jansen E.M., Low W.C.* Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behav. Brain Res*. 1996. 78: 189–194.
16. *Jolkkonen J., Puurunen K., Rantakomi S., Harkonen A., Haapalinna A., Sivenius J.* Behavioral effects of the alpha(2)-adrenoceptor antagonist, atipamezole, after focal cerebral ischemia in rats. *Eur. J. Pharmacol*. 2000. 400: 211–219.
17. *Levine S.* Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am. J. Pathol*. 1960. 36: 1–17.
18. *Lun A., Dominick B., Gross J.* An animal model of perinatal hypoxic brain damage: behavioural aspects. *Biomed. Biochim. Acta*. 1990. 49: 1021–1026.
19. *Montoya C.P., Campbell-Hope L.J., Pemberton K.D., Dunnett S.B.* The “staircase test”: a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J. Neurosci. Methods*. 1991. 36: 219–228.
20. *Ono K., Shimada M., Yamano T.* Reorganization of the corticospinal tract following neonatal unilateral cortical ablation in rats. *Brain Dev*. 1990. 12: 226–236.
21. *Reinoso B.S., Castro A.J.* A study of corticospinal remodelling using retrograde fluorescent tracers in rats. *Exp. Brain Res*. 1989. 74: 387–394.
22. *Rice J.E. 3rd, Vannucci R.C., Brierley J.B.* The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann. Neurol*. 1981. 9: 131–141.
23. *Schallert T.* Preoperative intermittent feeding or drinking regimens enhance post-lesion sensorimotor function. *Preoperative Events: Their Effects on Behavior Following Brain Damage*. Ed. Schulkin J. New Jersey: Lawrence Erlbaum Assoc. 1989: 1–20.
24. *Schallert T.* Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx*. 2006. 3: 497–504.
25. *Schallert T.* Orienting and placing. *The Behavior of the Laboratory Rat. A Handbook with Tests*. Ed. K.B. Whishaw. N.Y.: Oxford Univ. Press. 2005: 129–140.
26. *Schallert T., Fleming S.M., Leasure J.L., Tillerson J.L., Bland S.T.* CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*. 2000. 39: 777–787.
27. *STAIR.* Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke*. 1999. 30: 2752–2758.
28. *STEPS.* Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS): bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic factor therapy in treating stroke. *Stroke*. 2009. 40: 510–515.
29. *Takahashi M., Vattanajun A., Umeda T., Isa K., Isa T.* Large-scale reorganization of corticofugal fibers after neonatal hemidecortication for functional restoration of forelimb movements. *Eur. J. Neurosci*. 2009. 30: 1878–1887.
30. *Towfighi J., Yager J.Y., Housman C., Vannucci R.C.* Neuropathology of remote hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Acta. Neuropathol*. 1991. 81: 578–587.
31. *Vannucci R.C., Vannucci S.J.* Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev. Neurosci*. 2005. 27: 81–86.
32. *Young R.S., Kolonich J., Woods C.L., Yagel S.K.* Behavioral performance of rats following neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke*. 1986. 17: 1313–1316.