

УДК 616-092.19

DOI: 10.24884/1682-6655-2022-21-3-64-71

Н. С. ЩЕРБАК¹, Г. Ю. ЮКИНА¹, А. Г. ГУРБО²,
Е. Г. СУХОРИУКОВА¹, А. Г. САРГСЯН¹,
В. В. ТОМСОН¹, М. М. ГАЛАГУДЗА^{1, 2}

Морфофункциональное состояние микроглии и нейронов гиппокампа у возрастных крыс после анестезии хлоралгидратом

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого д. 6/8

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2
E-mail: ShcherbakNS@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 01.07.22 г.; принята к печати 19.08.22 г.

Резюме

Введение. Успешность транслирования результатов фундаментальных исследований в клиническую практику определяется достаточно большим количеством составляющих, включая возраст экспериментальных животных и использованный наркоз. В качестве анестетика в доклинических исследованиях достаточно часто применяют хлоралгидрат, при этом его воздействие на морфофункциональные характеристики гиппокампа у возрастных животных остается неизученным, что может приводить к существенному искажению и неправильной трактовке полученных результатов. **Цель** – морфофункциональная оценка состояния нейронов и микроглии в слоях CA1, CA2, CA3 и CA4 полей гиппокампа при анестезии хлоралгидратом у возрастных крыс. **Материалы и методы.** Самцам крыс Вистар в возрасте 24 месяцев вводили хлоралгидрат в дозе 400 мг/кг. В ранний (2 суток) период после анестезии хлоралгидратом методами гистологического, иммуногистохимического и морфометрического анализа качественно и количественно оценивали морфофункциональное состояние нейронов и реакцию микроглии в краевом, пирамидном и молекулярном слоях полей CA1, CA2, CA3 и CA4 гиппокампа. **Результаты.** Показано, что через 48 ч после анестезии хлоралгидратом у 24-месячных крыс Вистар изменения морфофункционального состояния пирамидного слоя гиппокампа характеризовались значимыми снижением количества нейронов в полях CA1 и CA3 с двумя ядрышками на 42 и 54 % соответственно и уменьшением ширины слоя полей CA1 и CA3 и CA4 на 27, 29 и 21 % соответственно, при сравнении с аналогичными показателями в контрольной группе ($P < 0,05$). Реакция микроглии во всех слоях полей CA1, CA2, CA3 и CA4 гиппокампа выражалась трансформацией клеточного тела и отростков Iba-1-позитивных микроглиоцитов и значимым увеличением экспрессии белка Iba-1, по сравнению с таковым у животных без применения хлоралгидрата ($P < 0,05$). **Заключение.** Однократное применение хлоралгидрата в дозе, необходимой для достижения наркоза у возрастных крыс Вистар без модельного хирургического вмешательства приводит к морфофункциональным изменениям нейронов в наиболее уязвимых полях гиппокампа с одновременной активацией микроглии во всех полях, это обстоятельство необходимо учитывать при проведении поисковых фундаментальных работ и доклинических исследований.

Ключевые слова: хлоралгидрат, крысы, гиппокамп, Iba-1, старение

Для цитирования: Щербак Н. С., Юкина Г. Ю., Гурбо А. Г., Сухорукова Е. Г., Саргсян А. Г., Томсон В. В., Галагудза М. М. Морфофункциональное состояние микроглии и нейронов гиппокампа у возрастных крыс после анестезии хлоралгидратом. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2022;21(3): 64–71. Doi: 10.24884/1682-6655-2022-21-3-64-71.

UDC 616-092.19

DOI: 10.24884/1682-6655-2022-21-3-64-71

N. S. SHCHERBAK¹, G. Yu. YUKINA¹, A. G. GURBO²,
E. G. SUKHORUKOVA¹, A. G. SARGSIAN¹,
V. V. THOMSON¹, M. M. GALAGUDZA^{1, 2}

Morphofunctional state of microglia and hippocampal neurons in aged rats after anesthesia with chloral hydrate

¹ Pavlov University, Saint Petersburg, Russia

6-8, L'va Tolstogo street, Saint Petersburg, Russia, 197022

² Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

2, Akkuratova str., Saint Petersburg, Russia, 197341

E-mail: ShcherbakNS@yandex.ru

Received 01.07.22; accepted 19.08.22

Summary

Introduction. Successful translating of the fundamental research results into clinical practice is determined by a sufficiently large number of components, including the age of experimental animals and the anesthesia used. Chloral hydrate is often used as

an anesthetic in preclinical studies, while its effect on the morphofunctional characteristics of the hippocampus in aged animals remains unexplored, which can lead to significant distortion and incorrect interpretation of the obtain results. *Objective* – morphofunctional assessment of the neurons and microglia in the layers of CA1, CA2, CA3 and CA4 fields of the hippocampus in aged rats anesthetized with chloral hydrate. *Materials and methods*. Male Wistar rats at the age of 24 months were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg). In the early (2 days) period after chloral hydrate anesthesia, the morphofunctional state of neurons and the reaction of microglia were qualitatively and quantitatively assessed by histological, immunohistochemical, and morphometric analysis in the marginal, pyramidal, and molecular layers of fields CA1, CA2, CA3, and CA4 of the hippocampus. *Results*. 48 hours after 24-month-old Wistar rats were anesthetized with chloral hydrate, changes in the morphofunctional state of the pyramidal layer of the hippocampus were shown to be characterized by a significant decrease in the number of neurons in fields CA1 and CA3 with two nucleoli by 42 and 54 %, respectively, and a decrease in the width of the layer of fields CA1 and CA3 and CA4 by 27, 29 and 21 %, respectively, compared with similar indicators in the control group ($P<0.05$). In all layers of fields CA1, CA2, CA3 and CA4 of hippocampus, microglia reacted by the transformation of Iba-1-positive microgliaocytes body and processes and a significant increase of the Iba-1 protein expression compared to the animals without administration of chloral hydrate ($P<0.05$). *Conclusions*. A single chloral hydrate dose administration necessary to anesthetized the aged Wistar rats without model surgery leads to morphofunctional changes in neurons in the most vulnerable fields of the hippocampus with simultaneous activation of microglia in all fields. This circumstance must be taken into account when conducting basic research and preclinical studies.

Keywords: chloral hydrate, rats, hippocampus, Iba-1, aging

For citation: Shcherbak N. S., Yukina G. Yu., Gurbo A. G., Sukhorukova E. G., Sargsian A. G., Thomson V. V., Galagudza M. M. Morphofunctional state of microglia and hippocampal neurons in aged rats after anesthesia with chloral hydrate. *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2022;21(3):64–71. Doi: 10.24884/1682-6655-2022-21-3-64-71.

Введение

Анестезия при физиологическом старении представляет серьезную проблему клинической и фундаментальной медицины, которая обусловлена увеличением продолжительности жизни и, как следствие, ростом потребности в хирургических вмешательствах людей пожилого возраста, неизученностью особенностей резервных реакций на стресс, противоречивостью данных о потребности в дозе анестетиков в зависимости от лекарственной группы при старении [1]. Известно, что послеоперационное снижение когнитивных функций гораздо чаще встречается у пожилых людей, и это связано с более высокой заболеваемостью и смертностью, что ставит под сомнение преимущества хирургического вмешательства под общим наркозом в этой когорте пациентов [2]. Механизм, способствующий развитию послеоперационной когнитивной дисфункции, остается неизученным. Снижение когнитивных резервов, наличие хронических заболеваний, измененные метаболические реакции, стрессовое воздействие общей анестезии – все эти факторы могут быть ответственны за развивающееся состояние в стареющем мозге [2, 3]. Существует гипотеза, что послеоперационная когнитивная дисфункция при старении обусловлена воспалительным компонентом патогенеза [3].

Структурой головного мозга, играющей центральную роль во всех когнитивных процессах, является гиппокамп. Согласно классическому описанию цитоархитектоники гиппокампа, выделяют четыре поля – CA1, CA2, CA3 и CA4 [4]. При изучении гиппокампа исследователи фокусируют свое внимание преимущественно на поле CA1, что, вероятно, обусловлено функциональной ответственностью, наибольшей уязвимостью к ишемии и морфологическим строением этого поля [5–7]. К настоящему времени практически не установлена ответственность за физиологические функции поля CA2, предполагается вовлеченность нейронов этой области в развитие эпилептических повреждений [8]. В ряде экспериментальных исследований поле CA4 рассматривают как продолжение

поля CA3 или в составе зубчатой извилины (*gyrus dentatus*) [9]. Эти обстоятельства приводят к тому, что морфофункциональные изменения в полях CA2, CA3 и CA4 гиппокампа остаются неизученными, что осложняет анализ, сопоставление и сравнение полученных результатов, не позволяет рассматривать реакцию гиппокампа как целой структуры на ишемическое или нейропротективное воздействие, стресс.

При проведении экспериментальных исследований на грызунах в качестве анестезирующего агента активно используется хлоралгидрат, что во многом определено его метаболизмом, дешевизной и необходимостью наличия для организации в России лицензионного разрешения на использование барбитуратов и опиатов для анестезии лабораторных животных [10]. При старении нормальный баланс между про- и противовоспалительными медиаторами может смещаться в сторону провоспалительного состояния, и изменяется активность микроглии как компонента «нейроваскулярной единицы» гематоэнцефалического барьера [11]. При этом влияние хлоралгидрата на реакцию микроглии в различных полях гиппокампа у старых крыс остается неизученным, что не позволяет определить фундаментальные физиологические реакции организма при старении в ответ на применение данного анестетика. Это обстоятельство может приводить к получению ложноположительных или ложноотрицательных результатов в эксперименте, что в дальнейшем затрудняет их транслирование в клиническую практику.

Учитывая вышеизложенные факты, **цель** работы заключалась в морфофункциональной оценке состояния нейронов и микроглии в слоях CA1, CA2, CA3 и CA4 полей гиппокампа при анестезии хлоралгидратом у возрастных крыс.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на самцах крыс Вистар в возрасте 24 месяцев (ФГУП ПЛЖ «Рапполово», Россия). Все эксперименты выполняли в соответствии с принципами Европейской конвенции

(Страсбург, 1986 г.), и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996) и с требованиями Постановления Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. № 51 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» и были одобрены Биоэтической комиссией ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» (протокол № 18–5, 2018 г.).

Моделирование общей анестезии. Животные случайным выбором были распределены на две экспериментальные группы. Животных группы «ХГ» (n=7) наркотизировали путем введения хлоралгидрата (*Sigma-Aldrich*, США) в дозе 400 мг/кг внутривенно. Животным группы «Контроль» (n=7) внутривенно вводили физиологический раствор в объеме, эквивалентном объему раствора хлоралгидрата. Проводили неинвазивную регистрацию параметров гемодинамики у всех животных до введения физиологического раствора или хлоралгидрата, а также через 25 мин после введения соответствующих растворов. Через 48 ч учитывали летальность, у выживших животных оценивали неврологический статус и тестировали по ряду поведенческих тестов [12]. Далее животных из каждой группы повторно наркотизировали, извлекали головной мозг и для лучшей сохранности биоматериала и повышения выявляемости белков при последующем проведении иммуногистохимического исследования фиксировали его в цинк-этанол-формальдегиде не менее 24 ч [13, 14]. Для получения сопоставимых результатов от всех животных образцы обрабатывали параллельно и в одинаковых условиях.

Морфологическое исследование. Головной мозг нарезают на сегменты, далее образцы обезживали в серии этанола и заливали в парафиновые блоки по стандартной гистологической методике. Готовили фронтальные срезы толщиной 5 мкм, соответствующие стереотаксическому атласу головного мозга крысы (брегма – $3,4 \pm 0,2$ мм), которые окрашивали крезиловым фиолетовым, гематоксилином Майера и эозином («Био Витрум», Россия) [15].

Иммуногистохимический метод для выявления микроглиоцитов подробно описан нами ранее [16]. В качестве маркера микроглии использовали первичные поликлональные козы анти тела к антигену Iba-1 (ab107159; *AbCam*, Великобритания). Гистологические срезы после депарафинирования, регидратации и теплового демаскирования в цитратном буфере pH 6,1 (*Aligent Technologies*, США) инкубировали с первичными антителами к Iba-1 в разведении 1:2000 в течение 45 мин при комнатной температуре. Для связывания первичных антител применяли набор реагентов R.T.U. VECTASTAIN Universal Quick Kit Catalog № PK-7800 (USA). Визуализацию продукта реакции проводили при помощи хромогена DAB+ (*Diagnostic BioSystems*, Netherlands). Препараты докрашивали гематоксилином Майера (*Bio-Optica*, Италия).

Морфометрический анализ гистологических препаратов. При помощи световой микроскопии и про-

граммного обеспечения «ImageScope M» (компания «СМА» («Системы для Микроскопии и Анализа»), Москва, Россия) изучали оба полушария головного мозга. На нескольких срезах головного мозга при увеличении $\times 400$ (об. 40, ок. 10) подсчитывали число морфологически неизменных пирамидных нейронов и Iba-1-позитивных ядросодержащих микроглиоцитов в краевом слое или слое полиморфных клеток (*stratum oriens*), пирамидном слое (*stratum pyramidale*) и молекулярном слое (*stratum moleculare*) полей CA2, CA3 и CA4 гиппокампа. Учитывали только те нейроны, в срезе которых отмечалось одно или более ядрышек. Полученные показатели пересчитывали на 1 мм для пирамидного слоя и на 1 мм^2 для краевого и молекулярного слоев. В полях CA1, CA2, CA3 и CA4 вычисляли процентное содержание пирамидных нейронов с двумя и более ядрышками, определяли толщину пирамидного слоя во всех полях гиппокампа.

Анализ экспрессии белка Iba-1 в микроглиоцитах проводили на основании измерения оптической плотности продукта реакции, которую осуществляли на морфометрической установке, состоящей из светового микроскопа Axio Scope A1 (*Carl Zeiss*, Германия), цифровой камеры Baumer CX05e (*Baumer Optronic*, Германия), компьютера IBM PC с программным обеспечением «ВидеоТест-Морфология» («ВидеоТест», Россия). Результаты анализа выражали в относительных единицах (отн. ед.) оптической плотности. В каждом анализируемом слое полей CA2, CA3 и CA4 гиппокампа проводили измерение оптической плотности Iba-1-позитивных структур. При каждом измерении вычитали оптическую плотность фона.

Методы статистического анализа. Результаты обрабатывали статистически с использованием программ «Statistica 7.0» (*Stat.Soft for Windows, Inc.*) и «Microsoft Excel 2003» с вычислением среднего арифметического и его стандартной ошибки. После проверки распределения на нормальность значимость различий между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна – Уитни. Различия учитывали как значимые при $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

У всех крыс в возрасте 24 месяцев при морфологическом исследовании области гиппокампа на изучаемом уровне брегмы четко определялись поля CA1, CA2, CA3 и CA4 по характерной структуре и цитоархитектонике слоев, свойственной для головного мозга крысы. У животных группы «Контроль» средняя плотность морфологически неизменных нейронов в пирамидном слое полей CA2, CA3 и CA4 составляла 154 ± 12 , 162 ± 10 и 110 ± 14 клеток на 1 мм длины слоя соответственно. Для поля CA1 этот показатель был показан нами ранее и составлял 263 ± 14 [5]. В пирамидном слое изученных полей у животных группы «Контроль» наблюдались единичные нейроны с морфологическими изменениями в виде гиперхромности, сморщивания клетки, отсутствия ядра. У животных группы «ХГ» через 48 ч после анестезии хлоралгидратом в пирамидном слое полей CA3 и CA4 встречались сморщенные и неправильной

Таблица 1

Число морфологически неизмененных нейронов с двумя ядрышками в пирамидном слое CA1, CA2, CA3 и CA4 полей гиппокампа у 24-месячных крыс Вистар в норме и после анестезии хлоралгидратом ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ на протяжении 1 мм на срезе)

Table 1

The number of morphologically unchanged neurons with two nucleoli in the pyramidal layer of CA1, CA2, CA3 and CA4 hippocampal fields in intact 24-month-old Wistar rats and the anesthetized with chloral hydrate ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ for 1 mm on a slice)

Экспериментальная группа	Поля гиппокампа			
	CA1	CA2	CA3	CA4
Контроль	50±9	22±5	39±9	32±8
ХГ	29±6*	19±6	18±7*	30±9

Здесь и далее * – по сравнению с показателем в группе «Контроль» при $P < 0,05$.

формы нейроны, отмечался перичеселлюлярный отек. При этом в пирамидном слое поля CA2 такие изменения были минимальны и не отличались от группы «Контроль». Количество морфологически неизмененных пирамидных нейронов в полях CA2, CA3 и CA4 у животных группы «ХГ» незначимо уменьшалось – на 6, 14 и 11 % соответственно, по сравнению с таковым в группе «Контроль». Ранее нами было показано, что аналогичный показатель для поля CA1 гиппокампа понижался на 11 % и также значимо не отличался от значений в контрольной группе ($P > 0,05$) [5]. Остается неясным, почему при негативных воздействиях определенные нейроны умирают, тогда как непосредственно соседние нейроны остаются неповрежденными. Можно предположить, что внутренние различия между клетками, как на генетическом, так и на эпигенетическом уровне, определяют уязвимость, однако природа этих различий неизвестна. Анестезия хлоралгидратом применяется традиционно и широко при проведении экспериментальных исследований на крысах различного возраста и не приводит к значимой гибели нейронов гиппокампа. Проведение модельных хирургических вмешательств на мелких лабораторных животных с использованием общей анестезии сопровождается морфофункциональными перестройками структур головного мозга и когнитивной дисфункцией [17, 18]. В то же время существуют исследования [19], показывающие положительные эффекты, анестетиков на когнитивные функции у старых крыс. Результаты нашего предыдущего исследования [12] по изучению гемодинамики, неврологического статуса и летальности показали, что введение хлоралгидрата через 25 мин приводит к снижению систолического артериального давления на 46,8 % ($P < 0,05$), учащению частоты сердечных сокращений на 16,4 % ($P < 0,05$); через 48 ч – к 43 % летальности, увеличению до 2,9 (min 1 – max 4) коэффициента неврологического дефицита, подавлению двигательной активности и повышению уровня эмоциональной напряженности в тесте «открытое поле», по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе. Гиппокамп, подвергшийся действию общего анестетика в дозе, необходимой для достижения наркоза, по-видимому, не страдает от существенной общей потери клеток или синапсов, когнитивные нарушения, вероятно, связаны с

другими нейробиологическими изменениями, которые могут включать изменения в передаче сигналов, кодировании информации и пластических, электрофизиологических или нейрохимических свойствах нейронов или глии.

В качестве критерия функционального состояния нейронов пирамидного слоя гиппокампа оценивали число ядрышек в их ядре. В образцах головного мозга крыс группы «Контроль» нейроны пирамидного слоя полей CA1, CA2, CA3 и CA4 с двумя ядрышками составляли 19, 14, 24 и 32 % соответственно от общего числа (табл. 1). Через 48 ч после применения хлоралгидрата в группе «ХГ» в полях CA1 и CA3 выявлялось достоверное снижение числа нейронов с двумя ядрышками на 42 и 54 % соответственно, при сравнении с таковым в группе «Контроль» ($P < 0,05$) (табл. 1).

Ядрышко представляет собой высокофункциональную внутриядерную органеллу, в которой, помимо сборки рибосом, координируются многочисленные процессы, такие как транскрипция, репарация и репликация ДНК, клеточный цикл и апоптоз. Кроме того, ядрышко является ключевым центром в ощущении клеточного стресса и претерпевает серьезные структурные и композиционные изменения в ответ на клеточные возмущения [20]. Число ядрышек в ядре нейронов свидетельствует об уровне экспрессии рРНК и белков [21]. Старение и применение препаратов с различным механизмом действия может существенным образом влиять на число ядрышек [22]. Полученные нами результаты по уменьшению числа ядрышек в нейронах поля CA1 и CA3 гиппокампа и результаты нашего предыдущего исследования по изучению когнитивной дисфункции у крыс после анестезии хлоралгидратом [12] согласуются с результатами исследования на крысах по изучению влияния анестезии севофлураном [17]. Кроме того, известно, что активация экспрессии белков в клетках головного мозга лежит в основе механизма действия препаратов, улучшающих память и обучаемость [22].

Ширина пирамидного слоя полей CA1, CA2, CA3 и CA4 в группе «Контроль» приведена в табл. 2. Применение анестезии хлоралгидратом в группе «ХГ» способствовало значимому уменьшению ширины пирамидного слоя полей CA1, CA3 и CA4 на 27, 29 и 21 % соответственно, при сравнении с аналогичным

Таблица 2

Ширина пирамидного слоя CA1, CA2, CA3 и CA4 полей гиппокампа у 24-месячных крыс Вистар в норме и после анестезии хлоралгидратом, мкм

Table 2

The width of the pyramidal layer of CA1, CA2, CA3 and CA4 hippocampal fields in intact 24-month-old Wistar rats and the anesthetized with chloral hydrate, microns

Экспериментальная группа	Поля гиппокампа			
	CA1	CA2	CA3	CA4
Контроль	147±8	170±15	241±18	248±15
ХГ	107±12*	167±12	171±15*	196±18*

показателем в группе «Контроль» ($P<0,05$) (табл. 2). Изменение ширины пирамидного слоя может объясняться наблюдаемым незначительным уменьшением числа нейронов, а также их размеров за счет объемов цитоплазмы и ядра в результате снижения рибосомно-белкового синтеза, подтвержденного уменьшением числа ядершек.

Показанное нами ранее снижение систолического артериального давления при применении хлоралгидрата у старых крыс позволяет предположить не только токсическое действие анестетика, но и ишемическое повреждение нейронов гиппокампа [12]. Однако существует мнение, что глубокая анестезия снижает метаболизм и, следовательно, потребность в кислороде, что может ослабить эти изменения вследствие ишемии [23]. При применении ингаляционных анестетиков у крыс более значимые морфофункциональные изменения отмечаются в полях CA1, CA3 и CA4 гиппокампа [17, 24]. Известно, что нейроны полей CA1 и CA3 гиппокампа являются наиболее чувствительными к неблагоприятным факторам, таким как ишемия и нейротоксины, в частности, к высокому уровню кортизола [25]. Известно, что уровень кортизола в сыворотке крыс повышается в ответ на стресс и понижается в старости [26]. Можно предположить, что совокупное вредное воздействие возраста, стресса и анестетика, по-видимому, намного превосходит защитный потенциал этих областей. К тому же необходимо учитывать роль и других процессов, в частности, нейровоспаления, влияющего на морфофункциональное состояние нейронов гиппокампа и, вероятно, приводящее, в итоге, к развитию когнитивной дисфункции при применении общих анестетиков. Когнитивная дисфункция после наркотизации хлоралгидратом может быть обусловлена переходом из одного функционального состояния в другое как нейронов гиппокампа, так и одного из компонентов «нейроваскулярной единицы», в частности, микроглиоцитов.

Под активацией или реакцией микроглии в ответ на воздействия различной природы понимают изменение числа клеток, морфологические преобразования формы тела и отростков микроглиоцитов, изменение интенсивности экспрессии белков [27]. В качестве молекулярного маркера для анализа функционального состояния микроглии используют специфически экспрессирующийся во всех микроглиоцитах кальций-связывающий белок Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1) [28].

У животных группы «Контроль» в краевом, пирамидном и молекулярном слоях полей CA2, CA3 и CA4 гиппокампа выявлялись типичные Iba-1-позитивные клетки микроглии с овально-звездчатой формой клеточного тела и ветвящимися отростками, средняя плотность которых составляла для поля CA2 128 ± 14 , 37 ± 6 и 115 ± 14 , для поля CA3 – 141 ± 11 , 45 ± 5 и 158 ± 16 и для поля CA4 – 138 ± 12 , 42 ± 7 и 124 ± 14 соответственно. Для поля CA1 аналогичный показатель составил 133 ± 12 , 40 ± 5 и 118 ± 14 и был изучен нами ранее [5]. В пирамидном слое всех полей гиппокампа микроглиоциты располагались между нейронами. В молекулярном слое всех полей наблюдались микроглиоциты со сложным ветвлением отростков, и в поле CA3 гиппокампа отмечалось значимое увеличение плотности микроглиоцитов на 34, 37 и 27 % соответственно, по сравнению с аналогичным показателем для молекулярного слоя в полях CA1, CA2 и CA4 ($P<0,05$). Известно, что с возрастом изменяется нейроглиальное соотношение, увеличивается число глиальных клеток, что обусловлено их нарастающим участием в компенсаторных процессах. Полученные различия для молекулярного слоя могут объясняться влиянием возраста как такового на активацию микроглии в зависимости от поля, поскольку предыдущие исследования также показывали, что старение связано с активацией микроглии в поле CA3 гиппокампа [29]. Кроме того, можно предположить, что наблюдаемая активация микроглии может быть ассоциирована с развитием возрастных нейродегенеративных процессов. Уровень иммунореактивности к Iba-1 в образцах животных группы «Контроль» в структурах краевого, пирамидного и молекулярного слоев составил для поля CA2 $0,34\pm0,01$, $0,32\pm0,02$ и $0,35\pm0,01$, для поля CA3 – $0,35\pm0,02$, $0,33\pm0,03$ и $0,37\pm0,02$ и для поля CA4 – $0,34\pm0,02$, $0,34\pm0,03$ и $0,37\pm0,02$ отн. ед. соответственно. При этом значимых различий по данному показателю обнаружено не было ($P>0,05$), как в пределах каждого поля, так и между всеми полями гиппокампа. Отсутствие различий в уровне иммунореактивности к Iba-1 в слоях поля CA1 гиппокампа у животных контрольной группы также было показано нами ранее [5]. В исследовании на 24-месячных песчанках монгольских различий в уровне иммунореактивности к Iba-1 в структурах слоев поля CA1 гиппокампа также не было отмечено [6].

Применение хлоралгидрата у 24-месячных крыс через 48 ч сопровождалось морфологическими изменениями микроглиоцитов, которые проявлялись в

виде увеличения клеточного тела, нарастания сложности разветвленности и толщины отростков во всех проанализированных слоях полей СА2, СА3 и СА4 по сравнению с группой «Контроль». Число Iba-1-позитивных клеток в группе «ХГ» в краевом, пирамидном и молекулярном слоях составляло для поля СА2 134 ± 12 , 33 ± 8 и 121 ± 15 , для поля СА3 – 154 ± 16 , 48 ± 6 и 162 ± 14 и для поля СА4 – 138 ± 15 , 46 ± 7 и 128 ± 14 соответственно и значимо не отличалось от значений в группе «Контроль» ($P > 0,05$). При этом применение хлоралгидрата приводило к увеличению уровня иммунореактивности к Iba-1 в проанализированных слоях полей СА2, СА3 и СА4 гиппокампа. Так, данный показатель у животных группы «ХГ» в микроглиоцитах краевого, пирамидного и молекулярного слоев был значимо выше на 21, 21 и 20 % для поля СА2 ($P < 0,05$), на 28, 26 и 21 % для поля СА3 ($P < 0,05$) и на 26 ($P < 0,01$), 22 и 21 % для поля СА4 ($P < 0,05$) соответственно, по сравнению с аналогичными показателями в группе «Контроль». Для слоев поля СА1 повышение этого показателя составило 26, 24 и 17 %, по сравнению с контрольной группой ($P < 0,05$) [5]. Примечательно, что во всех проанализированных слоях полей гиппокампа, пирамидный слой которых подвергся морфофункциональным изменениям различной степени при применении хлоралгидрата, отмечалось увеличение уровня иммунореактивности к Iba-1. Ранние морфофункциональные последствия анестезии хлоралгидратом у возрастных крыс затрагивают нейроны полей СА1 и СА3 и активируют микроглиоциты во всех полях гиппокампа. Вероятно, наблюдаемая закономерность обусловлена тем, что изменение сложной сети гиппокампа путем воздействия анестетиком может трансформировать функциональную динамику системы в целом. Существует гипотеза, что воздействие общих анестетиков приводит к значительному изменению физиологического состояния всего гиппокампа, сопровождающегося модификацией функционирования, в частности, развитием нейровоспаления, которое может быть причиной формирования когнитивной дисфункции [30]. Критически важную роль в процессах внимания и памяти играет относительно синхронный тета-ритм, который формируется в результате суммирования токов упорядоченной структуры гиппокампа [31]. Можно предположить, что общий функциональный эффект активированной микроглии вследствие применения общих анестетиков обеспечивается за счет всей активированной микроглии гиппокампа в целом. Сегодня биологическая роль цитоплазматического белка Iba-1 определяется его активным участием в процессах фагоцитоза и обеспечении миграции клеток, роль ядерного белка не установлена [32]. Различные типы активации микроглии в гиппокампе показаны в ряде экспериментальных исследований, в которых проводили хирургическое моделирование ишемии головного мозга или кишечника под анестезией изофлураном, севофлураном и пропофолом [23, 30, 33]. При этом исследований без модельных хирургических вмешательств, направленных на изучение влияния общих анестетиков у экспериментальных животных различных видов и возрастов, практически

не существует. Кроме того, необходимо учитывать, что влияние физиологического старения и особенностей хирургического вмешательства на функциональное состояние микроглии могут существенно варьировать в зависимости от области головного мозга. Также известно, что нейроны полей гиппокампа существенно отличаются по наличию эфферентных и афферентных связей, что обуславливает их конкретную функциональную ответственность за физиологические функции. Эти обстоятельства затрудняют проведение систематического анализа фундаментальных исследований для определения ключевого звена патогенеза послеоперационной когнитивной дисфункции, как в эксперименте, так и в клинической практике. К тому же необходимо выяснить, влияет ли применение общих анестетиков на активацию микроглии напрямую, или этот эффект является индикатором других адаптивно-приспособительных реакций организма.

Заключение

Основываясь на полученных результатах, можно сделать выводы о том, что хлоралгидрат в дозе 400 мг/кг у 24-месячных крыс Вистар через 48 ч после применения приводит:

1) к изменению морфофункционального состояния пирамидного слоя полей СА1, СА3 и СА4 гиппокампа, характеризующимся значимым снижением числа ядрышек в нейронах и уменьшением ширины слоя полей без значимой потери морфологически неизмененных нейронов;

2) к активации микроглии во всех слоях полей СА1, СА2, СА3 и СА4 гиппокампа, которая выражается в морфологическом изменении клеточных тел и отростков микроглиоцитов и увеличении в них экспрессии белка Iba-1 без изменения числа клеток.

Таким образом, результаты проведенной работы показывают, что однократное применение хлоралгидрата в дозе, необходимой для достижения наркоза у возрастных крыс Вистар, сопровождается морфофункциональными изменениями нейронов в наиболее уязвимых областях гиппокампа с одновременной активацией микроглии всего гиппокампа. Эти результаты необходимо учитывать при проведении как поисковых фундаментальных исследований, так и доклинических работ по оценке эффективности разрабатываемых препаратов и методов.

Финансирование работы / Financing

Работа выполнена в рамках темы государственного задания. / The work was carried out within the framework of the topic of the state task.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Куклин В. Н. Возрастные изменения физиологии систем кровообращения и дыхания и особенности анестезиологического обеспечения пациентам старше 60 лет // *Вестн. интенсив. терапии им. А. И. Салтанова*. – 2019. –

- № 4. – С. 47–57. Doi: 10.21320/1818-474X-2019-4-47-57. [Kuklin VN. Age-related changes in physiology of blood circulation, breath and appropriate anaesthetic considerations in patients older than 60 years. Review // *Annals of Critical Care*. 2019;(4):47–57. (In Russ.)]. Doi: 10.21320/1818-474X-2019-4-47-57.
2. Strom C, Rasmussen LS. Challenges in anaesthesia for elderly // *Singapore Dent J*. 2014;(35):23–29. Doi: 10.1016/j.sdj.2014.11.003.
3. Moller JT, Cluitmans P, Rasmussen LS, Houx P, Rasmussen H, Canet J, Rabbitt P, Jolles J, Larsen K, Hanning CD, Langeron O, Johnson T, Lauven PM, Kristensen PA, Biedler A, van Beem H, Fradakis O, Silverstein JH, Beneken JE, Gravenstein JS. Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly ISPOCD1 study. ISPOCD investigators. International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction / *Lancet*. 1998;(251):857–861. Doi: 10.1016/S0140-6736(97)07382-0.
4. El Falougy H, Kubikova E, Benuska J. The microscopical structure of the hippocampus in the rat // *Bratisl Lek Listy*. 2008;109(3):106–110.
5. Shcherbak NS, Yukina GYu, Gurbo AG, Sukhorukova EG, Sargsian AG, Barantsevich ER, Thomson VV, Galagudza MM. Reaction of Microglia and Neurons of the Hippocampal CA1 Field to Chloral Hydrate in Old Rats // *Advances in Gerontology*. 2021;11(4):341–345. Doi: 10.1134/S2079057021040123.
6. Choi J, Lee CH, Hwang IK. et al. Age-related changes in ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactivity and protein level in the gerbil hippocampal CA1 region // *J. Vet. Med. Sci*. 2007;69(11):1131–1136. Doi: 10.1292/jvms.69.1131.
7. Takeda A, Takada S, Nakamura M, Suzuki M, Tamano H, Ando M, Oku N. Transient increase in Zn²⁺ in hippocampal CA1 pyramidal neurons causes reversible memory deficit // *PLoS One*. 2011;6(12):e28615. Doi: 10.1371/journal.pone.0028615.
8. Leranath C, Ribak CE. Calcium-binding proteins are concentrated in the CA2 field of the monkey hippocampus: a possible key to this region's resistance to epileptic damage // *Exp Brain Res*. 1991;85(1):129–136. Doi: 10.1007/BF00229993.
9. Slomianka L, Drenth T, Cavegn N, Menges D, Lazic SE, Phalanndwa M, Chimimba CT, Amrein I. The hippocampus of the eastern rock sengi: cytoarchitecture, markers of neuronal function, principal cell numbers, and adult neurogenesis // *Front Neuroanat*. 2013;29(7):34. Doi: 10.3389/fnana.2013.00034.
10. Vachon P, Faubert S, Blais D, Comtois A, Bienvenu JG. A pathophysiological study of abdominal organs following intraperitoneal injections of chloral hydrate in rats: comparison between two anaesthesia protocols // *Lab Anim*. 2000;34(1):84–90. Doi: 10.1258/002367700780578082.
11. Erdő F, Denes L, de Lange E. Age-associated physiological and pathological changes at the blood-brain barrier: A review // *J. Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2017;37(1):4–24. Doi: 10.1177/0271678X16679420.
12. Щербак Н. С., Кузьменко Н. В., Плисс М. Г. Влияние хлоралгидрата на показатели гемодинамики и поведенческие реакции у старых крыс // *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*. – 2019. – Т. 105, № 7. – С. 913–922. [Shcherbak NS, Kuz'menko NV, Pliss MG. Vliyaniye khloralgidrata na pokazateli gemodinamiki i povedencheskiye reaksii u starykh kryss. *Ros. fiziol. zhurn. im. I. M. Sechenova*. 2019;105(7):913–922. (In Russ.)]. Doi: 10.1134/S0869813919070094.
13. Коржевский Д. Э., Григорьев И. П., Отеллин В. А. Применение обезживающих фиксаторов, содержащих соли цинка, в нейрогистологических исследованиях // *Морфология*. – 2006. – Т. 129, № 1. – С. 85–86. [Korzhevskii DE, Grigor'ev IP, Otellin VA. Use of zinc-containing dehydrating fixatives for neurohistological studies // *Morfologiya*. 2006;129(1): 85–86. (In Russ.)].
14. Grigorev I. P., Korzhhevskii D. E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review) // *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2018;10(2): 156–165. Doi: 10.17691/stm2018.10.2.19.
15. Paxinos G, Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. New-York, Academic Press, 1998.
16. Влияние ишемического посткондиционирования на реакцию микроглии неокортекса при глобальной ишемии головного мозга у крыс / Н. С. Щербак, Г. Ю. Юкина, Е. Г. Сухорукова, В. В. Томсон // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. – 2020. – № 19 (2). – С. 59–66. [Shcherbak NS, Yukina GYu, Sukhorukova YeG, Tomson VV. Vliyaniye ishemicheskogo postkonditsionirovaniya na reaktsiyu mikrogl'ii neokorteksa pri global'noy ishemii golovnogo mozga u kryss // *Regionarnoye krovoobrashcheniye i mikrotsirkulyatsiya*. 2020;19(2):59–66. (In Russ.)]. Doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-2-59-66.
17. Юкина Г. Ю., Белозерцева И. В., Полушин Ю. С. и др. Структурно-функциональная перестройка нейронов гиппокампа после операции под анестезией севофлураном (экспериментальное исследование) // *Вестн. анестезиологии и реаниматологии*. – 2017. – Т. 14, № 6. – С. 65–72. Doi: 10.21292/2078-5658-2017-14-6-65-72. [Yukina GYu, Belozertseva IV, Polushin YUS. Tomson VV, Polushin AYU, Yanishevskiy SN, Krivov VO. Strukturno-funktsional'naya perestroyka neyronov gippokampa posle operatsii pod anesteziyey sevofluranom (eksperimental'noye issledovaniye) // *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2017;14(6):65–72. (In Russ.)]. Doi: 10.21292/2078-5658-2017-14-6-65-72.
18. Bianchi SL, Tran T, Liu CL, Lin S, Li Y, Keller JM, Eckenhoﬀ RG, Eckenhoﬀ MF. Brain and behavior changes in 12-month-old Tg2576 and nontransgenic mice exposed to anesthetics // *Neurobiol Aging*. 2008;29(7):1002–1010. Doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.009.
19. Callaway JK, Jones NC, Royse AG, Royse CF. Sevoflurane anesthesia does not impair acquisition learning or memory in the Morris water maze in young adult and aged rats // *Anesthesiology*. 2012;(117):1091–1101. Doi: 10.1097/ALN.0b013e31826cb228.
20. Scott DD, Oeffinger M. Nucleolin and nucleophosmin: nucleolar proteins with multiple functions in DNA repair // *Biochemistry and Cell Biology*. 2016;94(5):419–432. Doi: 10.1139/bcb-2016-0068.
21. Berciano MT, Villagrà NT, Pena E, Navascués J, Casafont I, Lafarga M. Structural and functional compartmentalization of the cell nucleus in supraoptic neurons // *Microscopy Research and Technique*. 2002;(56):132–142. Doi: 10.1002/jemt.10013.
22. Malykh AG, Sadaie MR. Piracetam and piracetam-like drugs: from basic science to novel clinical applications to CNS disorders // *Drugs*. 2010;70(3):287–312. Doi: 10.2165/11319230-000000000-00000.
23. Tasbihgou SR, Netkova M, Kalmar AF, Doorduyn J, Struys MMRF, Schoemaker RG, Absalom AR. Brain changes due to hypoxia during light anaesthesia can be prevented by deepening anaesthesia: a study in rats // *PLoS ONE*. 2018;13(2):e0193062. Doi: 10.1371/journal.pone.0193062.
24. Бокерия О. Л., Бакурадзе Е. Д., Дзидзигури Д. В. и др. Морфофункциональные изменения в гиппокампе крыс при проведении ложной операции с галотановым наркозом в сочетании с биорезонансным воздействием // *Традиционная мед.* – 2011. – Т. 24, № 1. – С. 4–7. [Bokeriya OL, Bakuradze YeD, Dzidziguri DV, Modebadze IR, Gotovskiy MYU, Bokeriya LA. Morfofunktsional'nyye izmeneniya v gippokampe kryss pri provedenii lozhnoy operatsii s galotanovym narkozom v sochetanii s biorezonansnym vozdeystviyem // *Traditsionnaya meditsina*. 2011;24(1):4–7. (In Russ.)].

25. Kim JJ, Diamond DM. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories // *Nat Rev Neurosci* 2002; (3):453–462. Doi: 10.1038/nrn849.

26. Sapolsky R. *Stress, the Aging Brain and the Mechanisms of Neuron Death*. MIT Press, Cambridge, 1992.

27. Béchade C, Cantaut-Belarif Y, Bessis A. Microglial control of neuronal activity // *Front Cell Neurosci*. 2013;(7):32. Doi: 10.3389/fncel.2013.00032.

28. Hovens I, Nyakas C, Schoemaker R. A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. *Neuroimmunol // Neuroinflamm*. 2014;(1):82–88. Doi: 10.4103/2347-8659.139719

29. Frank MG, Barrientos RM, Watkins LR, Maier SF. Aging sensitizes rapidly isolated hippocampal microglia to LPS ex vivo // *Journal of Neuroimmunology*. 2010;(226):181–184. Doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.05.022.

30. Hwang IK, Yoo KY, Kim DW, Choi SY, Kang TC, Kim YS, Won MH. Ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactive cells change in the gerbil hippocampal CA1 region after ischemia/reperfusion // *Neurochem Res*. 2006; 31(7):957–965. Doi: 10.1007/s11064-006-9101-3.

31. Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C. The origin of extracellular fields and currents—EEG, ECoG, LFP and spikes // *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(6):407–420. Doi: 10.1038/nrn3241.

32. Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa HK, Sasaki Y, Kohsakaet S. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia // *J. Cell Sci*. 2000;(113):3073–3084. Doi: 10.1242/jcs.113.17.3073.

33. Hovens IB, van Leeuwen BL, Nyakas C, Heineman E, van der Zee EA, Schoemaker RG. Postoperative cognitive dysfunction and microglial activation in associated brain regions in old rats. *Neurobiol // Learn. Mem*. 2015;(118):74–79. Doi: 10.1016/j.nlm.2014.11.009.

Информация об авторах

Шербак Наталия Сергеевна – д-р биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории неотложной кардиологии НИИ сердечно-сосудистых заболеваний, старший научный сотрудник лаборатории биофизики кровообращения Института биомедицины, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru.

Юкина Галина Юрьевна – канд. биол. наук, зав. научной лабораторией патоморфологии Научно-клинического центра патоморфологии, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: pipson@inbox.ru.

Гурбо Анна Геннадьевна – лаборант-исследователь научно-исследовательского отдела микроциркуляции и метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины,

НМИЦ им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: rusak.92.92@mail.ru.

Сухорукова Елена Геннадьевна – канд. мед. наук, старший научный сотрудник научной лаборатории патоморфологии Научно-клинического центра патоморфологии, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: len48@inbox.ru.

Саргсян Ангелина Гагиковна – студентка VI курса Лечебного факультета, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: sargsyanangelina@yahoo.com.

Томсон Владимир Викторович – д-р мед. наук, профессор, директор Научно-исследовательского центра, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: nic.spb@mail.ru.

Галагудза Михаил Михайлович – д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Института экспериментальной медицины, НМИЦ им. В. А. Алмазова, профессор кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: galagoudza@mail.ru.

Authors information

Shcherbak Natalia S. – Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher Urgent Cardiology Laboratory of Institute of Cardiovascular Diseases, Senior Researcher Blood Circulation Biophysics Laboratory of Institute of Biomedicine, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: ShcherbakNS@yandex.ru.

Yukina Galina Yu. – Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Pathomorphology of the Research Center, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: pipson@inbox.ru.

Gurbo Anna G. – laborant-researcher of the laboratory of Microcirculation and Myocardial Metabolism of the Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia, e-mail: rusak.92.92@mail.ru.

Sukhorukova Elena. G. – Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the Laboratory of Pathomorphology of the Research Center, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: len48@inbox.ru

Sargsian Angelina G. – 6-year student of the Faculty of Medicine, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: sargsyanangelina@yahoo.com.

Thomson Vladimir V. – Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Research Center, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: nic.spb@mail.ru.

Galagudza Mikhail M. – Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director of the Institute of Experimental Medicine of the Almazov National Medical Research Centre, Professor of the Department of Pathophysiology, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia, e-mail: galagoudza@mail.ru.