

УДК 616-018, 611.868, 611.84/.88, 612.811.4, 612.861, 612.313.82, 612.897, 612.899, 57.054, 57.017.35, 611.813.3, 611.811.018, 612.822.56

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ p53-ПОЗИТИВНЫМИ НЕЙРОНАМИ И ТЕМНЫМИ НЕЙРОНАМИ В ГИППОКАМПЕ КРЫС ПОСЛЕ ХИРУРГИЧЕСКИХ ВМЕШАТЕЛЬСТВ НА ПЕРЕГОРОДКЕ НОСА

© 2022 г. В. И. Торшин¹, И. В. Кастыро^{1,*}, академик РАН И. В. Решетов², М. Г. Костяева¹, В. И. Попадюк¹

Поступило 26.08.2021 г.
После доработки 05.10.2021 г.
Принято к публикации 08.10.2021 г.

В исследовании оценивается взаимосвязь экспрессии белка p53 и появления темных нейронов (ТН) в гиппокампе у крыс при экспериментальном моделировании септопластики. Была проведена септопластика у 15 половозрелых крыс-самцов линии Wistar. Изучены гистологические срезы гиппокампа, окрашенные толуидиновым синим по Нисслю и антителами к белку p53. В субполе CA1 количество p53-позитивных нейронов достоверно повысилось на 2-й, 4-й ($p < 0.001$) и 6-й дни ($p < 0.05$). В динамике пик роста экспрессии белка p53 в цитоплазме нейронов CA1 и CA2 пришелся на 2–4-е сутки после операции, а на 6-й день количество этих нейронов снизилось ($p < 0.001$). В цитоплазме нейронов CA3 на всех сроках после хирургического вмешательства было отмечено увеличение экспрессии белка p53, по сравнению с контрольной группой. В пирамидном слое CA1 количество ТН на 6-й день снизилось ($p < 0.001$). В CA2 через 2 сут был отмечен минимум ТН, по сравнению с 4-м днем ($p < 0.001$). В CA3 на 4-й день наблюдался пик ТН, по сравнению с остальными днями ($p < 0.001$). Была обнаружена положительная сильная связь на всех сроках оценки и во всех субполях гиппокампа между ростом количества темных и p53-позитивных нейронов. Появление темных и p53-позитивных нейронов в гиппокампальной формации у крыс после моделирования септопластики является типовыми ответными реакциями нервной ткани на стресс. Очевидно, что экспрессия белка p53 связана с базофилией цитоплазмы нейронов, их морфофункциональным состоянием. Предположительно белок p53 может запускать не только активацию поврежденных нейронов в гиппокампе, но и играть нейропротективную роль. Предстоящие исследования должны определить роль белка p53 в дальнейшей судьбе поврежденных нейронов в пирамидном слое и дифференцировать механизмы его экспрессии.

Ключевые слова: септопластика, гиппокамп, темные нейроны, p53, апоптоз, нейрогенез

DOI: 10.31857/S2686738922010206

ВВЕДЕНИЕ

Моделирование септопластики у крыс приводит к развитию мощного стрессового ответа [1]. На примере животных это позволяет нам понять то, какие процессы возможны при проведении подобных хирургических вмешательств [2]. Моделирование стрессовых воздействий приводит к нарушению функционального состояния нейронов с последующими морфологическими изменениями [3]. Особое внимание при стрессе уделяется гиппокамп [4, 5]. Белок p53 является акти-

ватором транскрипции определенного набора генов-мишеней, ингибирующим клеточный цикл регуляторным фактором и эффектором клеточных ответов на повреждения, которые включают остановку клеточного цикла и апоптоз [6]. Вместе с тем p53 является нейропротектором в модели таупатии *in vivo*. Было показано, что p53 контролирует транскрипцию группы генов, участвующих в синаптической функции. Транскрипционный контроль p53 этих синаптических генов сохраняется в мышечных нейронах и человеческом мозге [7]. Поврежденные (темные) нейроны имеют специфические морфологические признаки: усохшая цитоплазма, сморщенное ядро с сегментированным хроматином и неровными границами, штопоробразный аксон [4, 8]. Считается, что в этих нейронах произошел запуск запрограммированной гибели клеток [9]. Однако не исключается, что темные нейроны при опреде-

¹ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

*e-mail: ikastyro@gmail.com

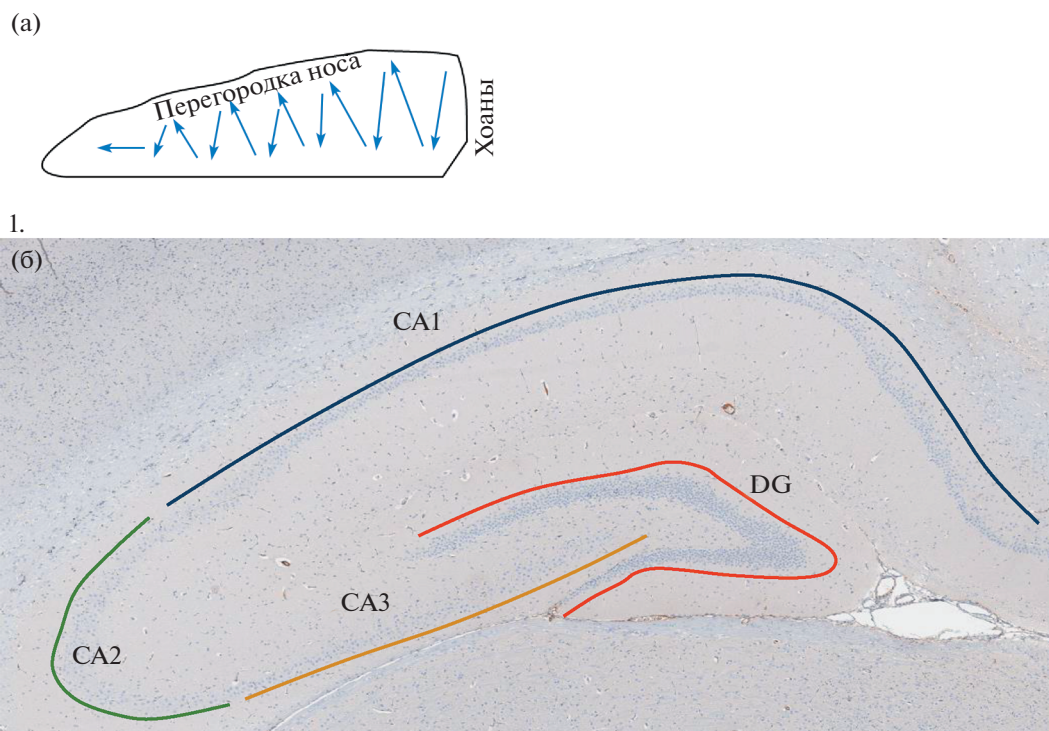


Рис. 1. (а) Схема проведения моделирования септопластики. Стрелками указано направление скарификации слизистой перегородки носа. (б) Расположение субполей гиппокампа крысы. Иммуногистохимическая реакция анти-p53. Докрашивание гематоксилином Майера. Ув. $\times 100$.

ленных условиях способны к восстановлению своего морфофункционального состояния [8].

Нейроны его пирамидного слоя чувствительны к различным стрессовым факторам, в том числе и при хирургическом стрессе. Так было показано, что моделирование хирургических манипуляций в полости носа у крыс провоцирует экспрессию белка p53 в нейронах гиппокампа и появление темных нейронов. При этом исследований, оценивающих одновременность этих процессов при моделировании септопластики у крыс, не проводилось.

В настоящем исследовании цель исследования заключалась в определении взаимосвязи появления p53-позитивных нейронов и темных нейронов в гиппокампе у крыс после хирургических вмешательств на перегородке носа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Двадцати половозрелым крысам-самцам линии Wistar массой 205.25 ± 10.15 г. было проведено моделирование септопластики стандартным методом путем зигзагообразной скарификации слизистой оболочки полости носа (рис. 1а) [10].

Пять крыс составили контрольную группу. За 10 мин до операции 15 крысам, которые составили экспериментальную группу, в целях общей

анестезии внутривенно вводили раствор зоветила 100 в дозировке 15 мг/кг. В экспериментальной группе крыс гуманную эвтаназию проводили на 2-е, 6-е и 14-е сутки после операции по 5 особей путем введения летальных доз зоветила 100. Фиксацию головного мозга всем крысам проводили до трепанации черепа 10% раствором формалина в течение 5–10 мин. После трепанации черепа головной мозг фиксировали 10% раствором формалина, после чего заключали в парафиновые блоки. У каждой крысы получали 8 срезов головного мозга во фронтальной плоскости толщиной 4 мкм, которые окрашивали антителами к белку p53 с докрашиванием гематоксилином Майера и толуидиновым синим по Нисслю. Изучали субполя гиппокампа CA1, CA2, CA3 и зубчатую извилину (DG) (рис. 1б). В пирамидном слое субполей подсчитывали абсолютное количество нейронов, у которых была положительная ядерная реакция с антителами к белку p53, а также количество темных нейронов.

Полученные данные с помощью методов подсчета клеток были представлены как среднее значение $\pm SE$. Затем их сравнивали между обеими группами с помощью t-теста с SPSS 21software.

Работа была выполнена в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и ее пересмотренным вариантом 2000 г.

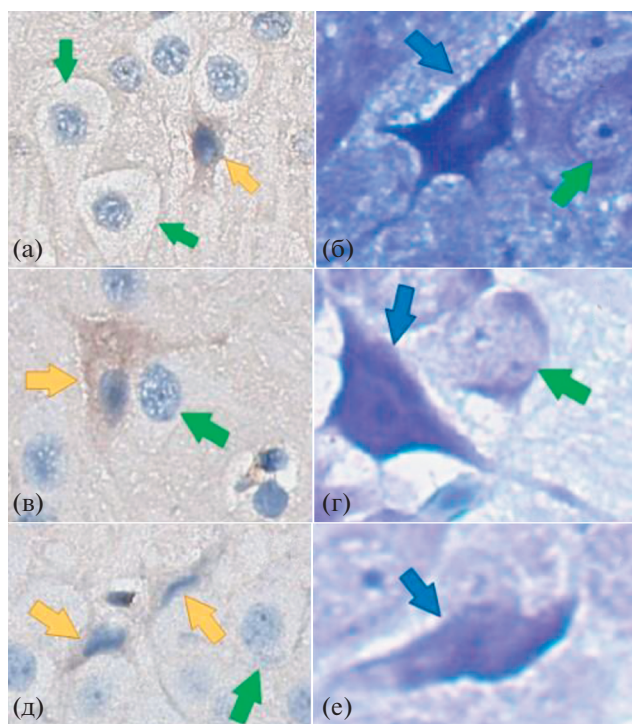


Рис. 2. P53-позитивные нейроны (а, в, д) (желтые стрелки, окр. мышинными моноклональными антителами к белку p53, ув. ×600) и темные нейроны (б, г, е) (синие стрелки, окр. толуидиновым синим по Нислю, ув. ×400) в гиппокампе у крыс на 2-й (а, б), 4-й (в, г) и 6-й дни (д, е) после моделирования септопластики. Примечание: зелеными стрелками обозначены нормальные нейроны.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Согласно критерию Манна–Уитни, в СА1 количество p53-позитивных нейронов достоверно повысилось на 2-й, 4-й ($p < 0.001$) и 6-й дни ($p < 0.05$) после проведения моделирования септопластики, по сравнению с контрольной группой (рис. 2).

В динамике пик роста экспрессии белка p53 в цитоплазме нейронов СА1 и СА2 гиппокампа пришелся на 2-4-е сутки, а на 6-й день количество этих нейронов значительно снизилось ($p < 0.001$). В СА2 на 6-й день по p53-позитивным нейронам экспериментальная группа не отличалась от контрольной (рис. 3а). В СА3 на всех сроках после хирургического вмешательства было отмечено повышение экспрессии белка p53, по сравнению с контрольной группой ($p < 0.001$). В DG, по сравнению с контролем, количество p53-позитивных нейронов было значительно выше на всех сроках оценки. Пик численности этих клеток пришелся на 4-й день, по сравнению с остальными сроками ($p < 0.001$) (рис. 3а).

По количеству ТН в пирамидном слое гиппокампа в экспериментальной и контрольной группах распределение данных было не гауссово. В СА1 количество ТН на 2-й и 4-й дни достоверно не отличалось от контроля, но на 6-й день после операции было отмечено снижение их количества ($p < 0.001$) (рис. 2). В СА2 экспериментальная группа от контрольной значительно не различалась. Через 2 сут после операции был отмечен минимум количества ТН, по сравнению с 4-м днем ($p < 0.001$). В СА3 на 4-й день после операции наблюдался пик численности ТН, по сравнению с остальными днями ($p < 0.001$). В контроле количество ТН не отличалось от 2-го дня, но было достоверно ниже, по сравнению с 4-м ($p < 0.001$) и 6-м ($p < 0.05$) днями после операции (рис. 3б). В DG наблюдались схожие с СА3 результаты (рис. 3б).

Сопоставляя количество нейронов, в которых белок p53 экспрессировался в цитоплазму, и количество темных нейронов, была обнаружена положительная сильная связь на всех сроках оценки и во всех субполях гиппокампа (рис. 4). Самый низкий коэффициент детерминации был обнару-

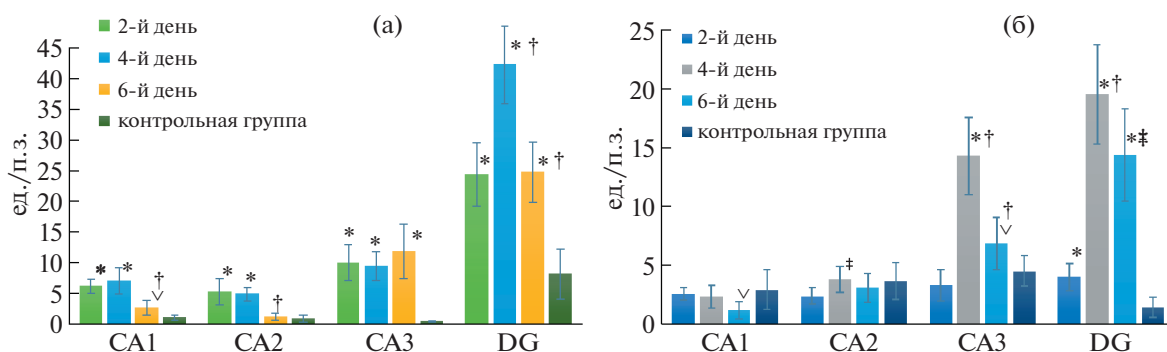


Рис. 3. Динамика изменения количества p53-позитивных нейронов (p53) (а) и темных нейронов (б) при моделировании септопластики. Примечание: * – достоверные различия между данными контрольной группы и сроками после операции ($p < 0.001$); † – достоверные различия между данными контрольной группы и сроками после операции ($p < 0.05$); ‡ – достоверные различия между сроками после операции внутри экспериментальной группы ($p < 0.001$); †‡ – достоверные различия между сроками после операции внутри экспериментальной группы ($p < 0.05$).

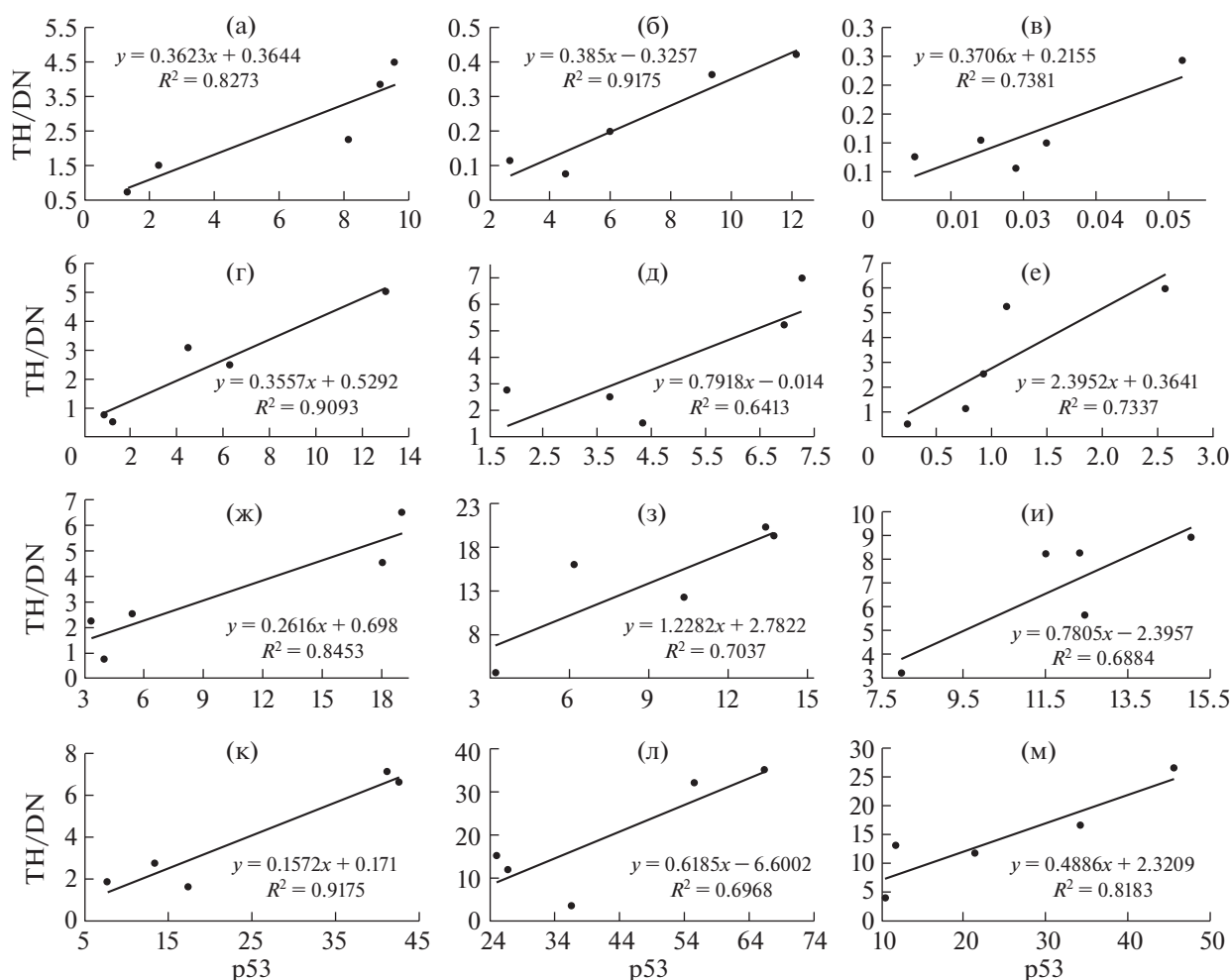


Рис. 4. Корреляция между количеством темных нейронов (ТН) и количеством p53-позитивных нейронов (p53) в субполях гиппокампа CA1 (а–в), CA2 (г–е), CA3 (ж–и) и DG (к–м) на 2-й (а, г, ж, к), 4-й (б, д, з, л) и 6-й (в, е, и, м) дни после моделирования септопластики.

жен при оценке субполя CA2 на 4-й день после операции (рис. 4е).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Апоптоз нейронов возникает при различных физиологических и патологических процессах и является генетически контролируемой формой гибели клеток [11]. Формирование темных нейронов в CA1 и CA3 гиппокампа крыс в настоящем исследовании, по-видимому, является типовой реакцией на стресс, в том числе и сопровождающийся воспалительными реакциями. Так, ранее было показано, что при моделировании острого перитонита у свиней и крыс в субполях CA1 и CA2 также наблюдается образование темных нейронов [12]. Это связывают с запуском механизмов апоптоза, так как рост количества ТН коррелирует с положительными TUNEL-нейронами [13]. Другие исследования также подтверждают, что

сморщивание нейрона и его базофилия могут служить надежными критериями начинающейся его дегенерации [12]. Белок p53 активируется клеточным стрессом и повреждением ДНК и, в зависимости от тяжести стресса и конкретного типа клеток, может способствовать адаптивным ответам на стресс или может запускать остановку клеточного цикла или апоптоз [14]. Когда нормальные пролиферирующие клетки подвергаются повреждению ДНК, они реагируют одним из двух способов: остановка клеточного цикла или апоптоз, и p53 участвует в обоих этих процессах [15]. Кроме широко изученной роли p53 как регулятора запуска апоптоза, была продемонстрирована и его нейропротективная роль [16]. Дефицит p53 приводит к более медленной пролиферации нейрональных стволовых клеток, потенциально из-за длительной фазы G2 [17]. Кроме того, было показано, что p53 служит для смягчения нарушения развития нейронов после облучения и, таким об-

разом, может играть существенную роль в регуляции поздних эффектов в мозге после проведения радиотерапии [18]. Показано, что p53 регулирует некротическую гибель и аутофагическую активность нейронов [19]. В предыдущих исследованиях нами было продемонстрировано, что при моделировании септопластики в гиппокампе у крыс встречаются нейроны, в которых белок p53 появляется как исключительно в цитоплазме, так и в ядре. В последнем случае нейроны носили характерные морфологические признаки дегенерации — склеивание хроматина, нечеткость границ ядра, а в ряде случаев — распад клетки [4]. Можно предположить, что p53 может и не носить исключительно роль регулятора апоптоза.

Ранее также было показано, что темные нейроны могут как восстанавливать свое морфофункциональное состояние за счет увеличения цистерн гранулярной эндоплазматической сети с образованием мембранных завитков, переходом этого процесса на астроцитарные отростки и, как следствие, с последующим снижением степени структурного уплотнения клетки [8], так и быть признаком конечного некротического распада клетки независимо от причины гибели нейрона, в том числе и от различных биохимических каскадов апоптоза [9]. Запуск апоптоза и/или повреждение нейронов гиппокампа в дальнейшей перспективе может привести к различным нейробиологическим последствиям — нарушению памяти, поведенческих реакций и др. [20]. Ранее нами было показано, что моделирование септопластики у крыс провоцирует повышение тонуса симпатической нервной системы и концентрации кортикостерона в плазме крови в течение первых 4–5 дней после операции [20], что косвенно свидетельствует о наличии причинно-следственных связей между нарушением баланса вегетативной нервной системы, активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, появлением “темных” и p52-позитивных нейронов в пирамидном слое гиппокампа и, как следствие, нарушений поведенческих реакций [20]. Кроме того, в предыдущих исследованиях нами были получены результаты, демонстрирующие, что при данном виде хирургических вмешательств развивается тревожное состояние у крыс [10], что можно связать не только с развитием общих воспалительных реакций, но и с сенсорной депривацией периферического отдела обонятельного анализатора [6].

Обнаруженные нами в настоящем исследовании высокие коэффициенты детерминации подтверждают теорию того, что вероятнее всего появление темных нейронов в гиппокампе и зубчатой извилине тесно связано с экспрессией белка p53 при хирургическом стрессе, спровоцированном моделированием септопластики у крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появление темных и p53-позитивных нейронов в гиппокампальной формации у крыс после моделирования септопластики является типовыми ответными реакциями нервной ткани на стресс. Очевидно, что экспрессия белка p53 связана с базофилией цитоплазмы нейронов, их морфофункциональным состоянием. Предположительно белок p53 может запускать не только активацию поврежденных нейронов в гиппокампе, но и играть нейропротективную роль. Предстоящие исследования должны определить роль белка p53 в дальнейшей судьбе поврежденных нейронов в пирамидном слое и дифференцировать механизмы его экспрессии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dragunova S.G., Reshetov I.V., Kosyreva T.F., Severin A.E., Khamidulin G.V., Shmaevsky P.E., Inozemtsev A.N., Popadyuk V.I., Kastyro I.V., Yudin D.K., Yunusov T.Yu., Kleyman V.K., Bagdasaryan V.V., Alieva S.I., Chudov R.V., Kuznetsov N.D., Pinigina I.V., Skopich A.A., Kostyaeva M.G.* Comparison of the Effects of Septoplasty and Sinus Lifting Simulation in Rats on Changes in Heart Rate Variability. // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2021. V. 498. P. 165–169.
2. *Demyashkin G.A., Kastyro I.V., Sidorin A.V., Borisov Y.S.* The specific immunophenotypic features of nasopharyngeal carcinoma. // *Vestnik Otorinolaringologii*. 2018. V. 83. № 5. P. 40–44.
3. *Haider S., Naqvi F., Batool Z., Tabassum S., Perveen T., Saleem S., Haleem D.J.* Decreased Hippocampal 5-HT and DA Levels Following Sub-Chronic Exposure to Noise Stress: Impairment in both Spatial and Recognition Memory in Male Rats. *Sci Pharm*. 2012. V. 80. № 4. P. 1001–1011.
4. *Kastyro I.V., Reshetov I.V., Khamidulin G.V., Shilin S.S., Torshin V.I., Kostyaeva M.G., Popadyuk V.I., Yunusov T.Y., Shmaevsky P.E., Shalamov K.P., Kupryakova A.D., Doroginskaya E.S., Sedelnikova A.D.* Influence of Surgical Trauma in the Nasal Cavity on the Expression of p53 Protein in the Hippocampus of Rats. // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2021. V. 497. P. 99–103.
5. *Kirichuk V.F., Tsybal A.A.* Use of terahertz electromagnetic radiation at nitric oxide frequencies for the correction of thyroid functional state during stress. // *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2010. V. 4. P. 37–40.
6. *Sheahan S., Bellamy C.O., Treanor L., Harrison D.J., Prost S.* Additive effect of p53, p21 and Rb deletion in triple knockout primary hepatocytes. // *Oncogene*. 2003. V. 23. № 8. P. 1489–1497.
7. *Merlo P., Frost B., Peng S., Yang Y.J., Park P.J., Feany M.* p53 prevents neurodegeneration by regulating synaptic genes // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014. V. 111. № 50. P. 18055–18060.

8. Csordás A., Mázló M., Gallyas F. Recovery versus death of “dark” (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment. Light and electron microscopic observations // *Acta Neuropathol.* 2003. V. 106. P. 37–49.
9. Kövesdi E., Pál J., Gallyas F. The fate of “dark” neurons produced by transient focal cerebral ischemia in a non-necrotic and non-excitotoxic environment: Neurobiological aspects // *Brain Research.* 2007. V. 1147. P. 272–283.
10. Kastyro I.V., Reshetov I.V., Khamidulin G.V., Shmaevsky P.E., Karpukhina O.V., Inozemtsev A.N., Torshin V.I., Ermakova N.V., Popadyuk V.I. The Effect of Surgical Trauma in the Nasal Cavity on the Behavior in the Open Field and the Autonomic Nervous System of Rats // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2020. V. 492. P. 121–123.
11. Saeedi Borujeni M.J., Hami J., Haghiri H., Rastin M., Sazegar Gh. Evaluation of Bax and Bcl-2 Proteins Expression in the Rat Hippocampus due to childhood Febrile Seizure // *Iran J Child Neurol.* 2016. V. 10. № 1. P. 53–60.
12. Ari I., Kafa I.M., Kurt M.A. Morphometric investigation of neurons in the hippocampal CA1, CA3 areas and dentate gyrus in a rat model of sepsis // *Int. J. Morphol.* 2010. V. 28. № 1. P. 183–192.
13. Rezaei M., Sazegar G., Homayoun M. Effect of chronic noise exposure on neuron in the hippocampus of wistar rats // *International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR).* 2016. V. 7. № 2. P. 434–442.
14. Joers A., Jaks V., Kase J., Toivo M. p53-dependent transcription can exhibit both on/off and graded response after genotoxic stress // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 37. P. 6175–85.
15. Bellamy C. p53 and apoptosis // *British Medical Bulletin.* 1997. V. 53. № 3. P. 522–538.
16. Khurana V., Merlo P., DuBoff B., Fulga T.A., Sharp K.A., Campbell S.D., Götz J., Feany M.B. A neuroprotective role for the DNA damage checkpoint in tauopathy // *Aging Cell.* 2012. V. 11. № 2. P. 360–362.
17. Marin Navarro A., Pronk R.J., van der Geest A.T., Oliyynyk G., Nordgren A., Arsenian-Henriksson M., Falk A., Wilhelm M. p53 controls genomic stability and temporal differentiation of human neural stem cells and affects neural organization in human brain organoids // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11. P. 52.
18. Li Y.-Q., Cheng Z.W.-C., Liu S.K.-W., Aubert I., Wong C.S. P53 regulates disruption of neuronal development in the adult hippocampus after irradiation // *Cell Death Discovery.* 2016. V. 2. P. 16072.
19. Wang D.B., Kinoshita C., Kinoshita Y., Morrison R.S. p53 and mitochondrial function in neurons // *Biochim Biophys Acta.* 2014. V. 1842. № 8. P. 1186–97.
20. Kastyro I.V., Reshetov I.V., Popadyuk V.I., Torshin V.I., Ermakova N.V., Karpukhina O.V., Inozemtsev A.N., Khamidulin G.V., Shmaevsky P.E., Sardarov G.G., Gordeev D.V., Scopich A.A. Studying the physiological effects of a new model of septoplasty in rats // *Head and Neck Russian Journal.* 2020. V. 8. № 2. P. 33–38.

THE RELATIONSHIP BETWEEN p53-POSITIVE NEURONS AND DARK NEURONS IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS AFTER SURGICAL INTERVENTIONS ON THE NASAL SEPTUM

V. I. Torshin^a, I. V. Kastyro^{a,#}, Academician of the RAS I. V. Reshetov^b,
M. G. Kostyaeva^a, and V. I. Popadyuk^a

^a Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russian Federation

^b I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

[#]e-mail.: ikastyro@gmail.com

The study evaluates the dependence of p53 protein expression on the appearance of dark neurons (DN) in the hippocampus in rats during experimental modeling of septoplasty. Septoplasty simulation was carried out on 15 sexually mature male Wistar rats. We studied histological sections of the hippocampus stained with Nissl toluidine blue and antibodies to the p53 protein. In the CA1 subfield, the number of p53-positive neurons significantly increased on the 2nd, 4th ($p < 0.001$) and 6th days ($p < 0.05$). In the dynamics, the peak of the growth of p53 protein expression in the cytoplasm of CA1 and CA2 neurons fell on the 2–4th day after the operation, and on the 6th day the number of these neurons decreased ($p < 0.001$). In the cytoplasm of CA3 neurons at all periods after surgery, an increase in the expression of the p53 protein was noted as compared to the control group. In the CA1 pyramidal layer, the number of DN decreased on the 6th day ($p < 0.001$). In CA2, after 2 days, a minimum of DN was noted, compared with the 4th day ($p < 0.001$). In CA3, on the 4th day, there was a peak in DN, compared with the rest of the days ($p < 0.001$). A positive strong association was found at all periods of assessment and in all subfields of the hippocampus between an increase in the number of dark and p53-positive neurons. The appearance of dark and p53-positive neurons in the hippocampal formation in rats after simulating septoplasty are typical responses of nervous tissue to stress. It is obvious that the expression of the p53 protein is associated with the basophilia of the cytoplasm of neurons, their morpho-functional state. Presumably, the p53 protein can trigger not only the activation of damaged neurons in the hippocampus, but also play a neuroprotective role. Upcoming studies should determine the role of the p53 protein in the further fate of damaged neurons in the pyramidal layer and differentiate the mechanisms of its expression.

Keywords: septoplasty, hippocampus, dark neurons, p53, apoptosis, neurogenesis