

УДК: 611.813.3

**РЕАКЦИЯ АСТРОЦИТОВ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ ЛУКОВИЦЫ КРЫСЫ НА ВВЕДЕНИЕ  
КАПСАИЦИНА В ИНФАНТИЛЬНОМ ВОЗРАСТЕ**

Т.А. РУМЯНЦЕВА, Д.А. ПОЖИЛОВ, В.Е. ВАРЕНЦОВ, А.В. МОСКАЛЕНКО

*ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России,  
ул. Революционная, 5, Ярославль, 150000, Россия*

**Аннотация.** Изучено распределение астроцитарного маркера *GFAP* в различных слоях обонятельной луковицы и ростральном миграционном потоке у крыс 30-, 60-, 90-суточного возраста, а также на 30 и 60 сутки после токсического воздействия. Токсическое воздействие проводилось при помощи капсаицина в суммарной дозе 120 мг/кг. Маркер выявляли на парасагиттальных срезах обонятельной луковицы. Установлено, что численная плотность распределения астроцитов и средняя площадь распределения их отростков зависят от слоя обонятельной луковицы. Площадь распределения отростков астроцитов изменяется противоположно изменениям численной плотности распределения самих клеток.

Динамика численной плотности астроцитов в слоях обонятельной луковицы при введении капсаицина однотипна. Плотность клеток максимально увеличивается к 30 суткам эксперимента, что соответствует длительности острой фазы реактивного глиоза (4-5 недель), когда астроциты выступают, в том числе и в роли макрофагов. Максимально глиоз выражен в ростральном потоке, наружном плексиформном и гранулярном слоях. Эти изменения являются следствием гибели нейронов, чувствительных к прямому воздействию капсаицина. К 60 суткам численная плотность астроцитов во всех слоях снижается вследствие развития компенсаторных процессов.

Введение токсических доз капсаицина в инфантильном возрасте приводит к развитию выраженного глиоза в обонятельной луковицы, пик которого приходится на 30 сутки. Реакция глии на введения нейротоксина носит фазный характер и завершается в целом через два месяца после воздействия.

**Ключевые слова:** нейрогенез, обонятельная луковица, ростральный миграционный поток, астроциты, глиоз, *GFAP*.

**THE REACTION OF ASTROCYTES OF THE OLFATORY BULB OF A RAT  
TO THE ADMINISTRATION OF CAPSAICIN IN THE INFANTILE AGE**

T.A. RUMYANTSEVA, D.A. POZHILOV, V.E. VARENTSOV, A.V. MOSKALENKO

*Yaroslavl State Medical University, Revolutionary St., 5, Yaroslavl, 150000, Russia*

**Abstract.** The distribution of the astrocyte marker *GFAP* in various layers of the olfactory bulb and the rostral migration flow in rats of 30-, 60-, and 90-day age, as well as on the 30th and 60th days after the toxic effect was studied. Toxic effect was carried out by administering capsaicin in a total dose of 120 mg / kg. The marker was detected on the parasagittal sections of the olfactory bulb. It is established that the numerical density of the distribution of astrocytes and the average area of distribution of their processes depend on the layer of the olfactory bulb (OB). The area of distribution of the processes of astrocytes varies in the opposite way to the changes in the numerical density of the distribution of the cells themselves.

The dynamics of the numerical density of astrocytes in the layers of OB during the administration of capsaicin is of the same type. The cell density is maximally increased by 30 days of the experiment, which corresponds to the acute phase of reactive gliosis (4-5 weeks), when astrocytes act as macrophages. Maximum gliosis is expressed in the rostral migration stream, the outer plexiform and granular layers. These changes are a consequence of the death of neurons that are sensitive to the direct effects of capsaicin. By the 60 days the numerical density of astrocytes in all layers decreases due to the development of compensatory processes.

The introduction of toxic doses of capsaicin in infantile age leads to the development of severe gliosis in the OB, the peak of which falls on the 30th day. The reaction of glia on the introduction of the neurotoxin is phase-like and is completed as a whole two months after the exposure.

**Key words:** neurogenesis, olfactory bulb, rostral migratory stream, astrocytes, gliosis, *GFAP*.

**Введение:** В настоящее время понимание функции астроцитов значительно расширилось. По современным представлениям, астроциты активно участвуют в формировании гематоэнцефалического барьера, воспалительных реакциях и направляют миграцию нейрональных предшественников из стволовых ниш к месту назначения [3, 4, 8].

Данные литературы о нормативных показателях астроцитов в различные сроки довольно многочисленны, но разрознены. Ряд исследований посвящены реактивному глиозу, развивающемуся при ишемии или токсических воздействиях, однако, зависимость реакции глиии от возраста на фоне разной интенсивности нейрогенеза практически не изучена. Кроме того, остается практически неизученным вопрос о реакции глиии на токсические воздействия в зависимости от интенсивности нейрогенеза, обусловленной возрастом животного [10].

Оптимальным объектом для изучения реакции нейронов и глиии на токсическое воздействие является *обонятельная луковица* (ОЛ), так как в ней оканчивается ростральный миграционный поток, связывающий ее с субвентрикулярной зоной, в которой нейрогенез продолжается на протяжении всей жизни [1, 8, 9].

**Цель исследования** – выявить реакцию астроцитарной глиии обонятельной луковицы на воздействие нейротоксина в инфантильном возрасте, как с позиции оценки интенсивности реактивного глиоза, так и с позиции обеспечения миграции нейрональных предшественников.

**Материалы и методы исследования.** Работа выполнена на самцах крыс линии *Wistar*. Животные были разделены на *контрольную* и *экспериментальную* группы. В *контрольную* вошли 20 крыс возрастом 30, 60, 90, 180 суток, по 5 особей каждого возраста. Согласно классификации Западнюка И.П. [2], эти возраста соответствуют инфантильному (30 суток), ювенильному (60 и 90 суток), зрелый возраст (180 суток) взят в качестве контрольной точки для определения дефинитивных показателей в конце эволютивного периода.

В *экспериментальную* группу вошли 20 крыс линии *Wistar* 30-суточного возраста. Капсаицин вводился трёхкратно с интервалом в сутки, подкожно в дозировке 30, 30 и 60 мг/кг массы тела соответственно. Капсаицин разводился в смеси 10% ТВИН-80, 10% этанола и 80% физиологического раствора.

Использованная доза капсаицина относится к высоким: 100-200 мг/кг, сразу после введения они стимулируют экспрессию нейропептидов, а затем оказывают токсическое действие [6]. Токсическое действие капсаицина реализуется через деполяризацию мембран клеток и повышение проводимости неспецифических ионных каналов. Это ведёт к накоплению в клетках  $Ca^{2+}$  и  $Na^+$ . Ионы кальция активируют релизинг нейромедиаторов, а натрий в составе *NaCl* смещает осмотическое равновесие, приводя в последствии к гидратации, активации протеаз и гибели клеток.

Животные выводились из эксперимента на 14, 28, 56 сутки от начала эксперимента, т.е. оценивались морфологические изменения на протяжении двух месяцев после токсического воздействия. Все процедуры проводили в соответствии со строгими соблюдениями принципов, изложенных в Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986) [11], в соответствии с приказом МЗ СССР от 12.08.1977 г. «Правила проведения работы с использованием экспериментальных животных». Забор материала осуществляли после предварительной перфузии 10% забуференным формалином и фиксации в течение 24 часов при 4°C.

Исследование проведено на парафиновых парасагиттальных серийных срезах мозга крыс, проходящих через центральную часть ОЛ. Кислый фибриллярный белок астроцитов – *GFAP* [4, 7] является основным компонентом, обеспечивающим реактивность и адаптацию астроцитов. Маркер *GFAP* выявляется в цитоплазме и в отростках астроцитов. Астроциты после проведения иммуногистохимической реакции визуализируются как клетки округлой или полигональной формы со светлым ядром и с 3-5 извилистыми ветвящимися отростками (рис. 1А).

Маркер выявляли с помощью поликлональных кроличьих антител *GFAP* (*ab16997*, UK, разведение 1:200), вторичные антитела (*Goat anti Rabbit IgG*, *ab97051*, UK, разведение 1:1000). Детекцию пероксидазы производили диаминобензидиновым хромогеном *DAB Substrate Kit* (*ab64238*). Срезы докрашивали гематоксилином Майера, промывали в воде, обезвоживали, заключали в канадский бальзам. Микроскопировали при помощи светового микроскопа *Optica DM-20* (*Italy* 2015) со встроенной камерой. На каждом срезе в 50 полях зрения оценивались численная плотность распределения астроцитов (шт/мм<sup>2</sup>) и средняя площадь распределения отростков астроцитов, численная плотность распределения *DCX+* нейронов (шт/мм<sup>2</sup>). Результаты обрабатывались в программе *Microsoft Excel 2010* методами вариационной статистики и корреляционного анализа, вычислялись среднее арифметическое и стандартное отклонение. Достоверность различий при нормальном распределении показателей оценивалась при помощи критерия Стьюдента, при отличном от нормального – использовали непараметрический критерий Уилкоксона (уровень значимости  $p < 0,05$ ).

**Результаты и их обсуждение.** В ОЛ выделяют шесть концентрически расположенных слоёв: слой волокон обонятельного нерва, гломерулярный (клубочковый), наружный плексиформный (сетчатый), митральный, внутренний плексиформный и гранулярный (зернистый), а также центральную часть ОЛ, где оканчивается ростральный миграционный поток. Учитывая выраженные различия распределения в слоях, численную плотность астроцитов оценивали отдельно в каждом слое ОЛ и в ростральном потоке.

В слое волокон обонятельного нерва астроциты не определяются. Численная плотность астроцитов максимальна в гломерулярном и митральном слоях.

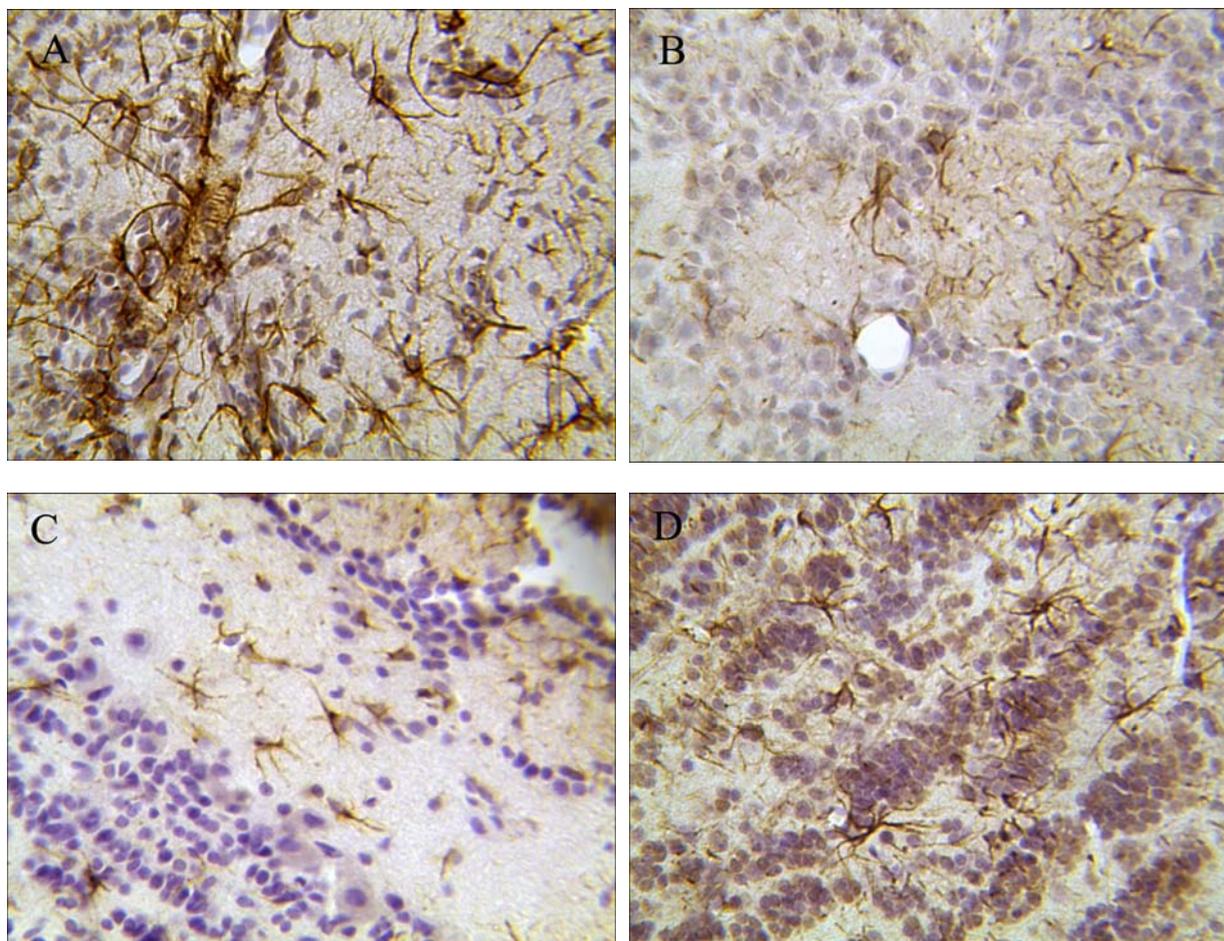
В гломерулярном слое астроциты можно чётко разделить на пери- и юкстагломерулярные. Отростки перигломерулярно расположенных глиальных клеток проникают вглубь клубочка, их тела встроены в слои клубочков. Тела юкстагломерулярных глиальных клеток расположены между клубочками, отростки ветвятся между клубочками и проникают в них (рис. 1B). Показатель численной плотности астроцитов с 30 по 60 сутки достоверно не изменяется и составляет  $270 \pm 20,3$  и  $240 \pm 27,6$  соответственно, к 90 суткам снижается на 30% до  $181 \pm 27,7$  ( $p < 0,05$ ), к 180 суткам возрастает до  $375 \pm 32,3$  ( $p < 0,05$ ).

В наружном плексиформном слое астроциты распределены равномерно (рис. 1C). С 30 по 60 сутки их плотность снижается с  $295 \pm 35,3$  до  $201 \pm 43,9$  ( $p < 0,05$ ), к 90 суткам возрастает до значений, близких к исходным  $305 \pm 24,6$  ( $p < 0,01$ ), и достоверно не изменяется до конца наблюдения ( $286 \pm 12,4$ ,  $p < 0,05$ ).

В гранулярном слое астроциты располагаются между группами клеток, их отростки проникают как внутрь таких групп, так и ветвятся в пространстве между ними. Численная плотность астроцитов с 30 по 60 сутки снижается с  $224 \pm 21,3$  до  $134 \pm 36,9$ , достоверно не изменяется до 90 и к 180 суткам вновь возрастает до  $174 \pm 16,6$  ( $p < 0,01$ ) (рис. 1D).

В ростральном потоке астроциты распространены на всем протяжении, их отростки направлены по ходу движения нейрональных предшественников, образуют многочисленные контакты. Численная плотность снижается с 30 по 60 сутки с  $422 \pm 42,5$  до  $168 \pm 16,9$ , возрастает к 180 суткам до  $325 \pm 31,4$  ( $p < 0,01$ ).

Средняя площадь сечения тел астроцитов на протяжении наблюдения остаётся практически постоянной, а показатель площади распределения отростков зависит от возраста животного и слоя ОЛ.



*Рис.1.* Распределение астроцитов в слоях обонятельной луковицы крыс разного возраста. *A.* 1 мес., астроциты вокруг сосуда в центре обонятельной луковицы. *B.* 1 мес., астроциты в гломерулярном слое. *C.* 1 мес., астроциты в наружном плексиформном слое. *D.* 6 мес., астроциты в гранулярном слое. Микрофото: иммуногистохимическое исследование, антитела против *GFAP*, докраска гематоксилином Майера, об.40.

Так, площадь распределения отростков в гломерулярном слое возрастает с 30 до 90 суток в 2 раза, и пик увеличения приходится на 90 сутки (медианная площадь –  $544,8 \text{ мкм}^2$ ). В наружном плексиформном слое с 30 по 60 сутки наблюдается увеличение площади на 36% до  $513,4$ , а на 180 сутки – понижение на 16% ( $p < 0,05$ ). В гранулярном слое с 30 по 180 сутки происходит плавное уменьшение площади рас-

пределения отростков почти в два раза до 339,7 ( $p<0,05$ ). Медианная площадь распределения отростков в ростральном потоке с 30 по 180 сутки возрастает на 43% до 583,2 ( $p<0,05$ ).

В целом, площадь распределения отростков астроцитов изменяется разнонаправленно с изменениями численной плотности распределения самих клеток. Численная плотность распределения астроцитов и средняя площадь распределения отростков зависят от слоя обонятельной луковицы.

Известно, что именно астроциты являются направляющими для клеточного потока нейрональных предшественников, как в ростральном миграционном потоке, так и в ОЛ [7, 8]. Пик интенсивности нейрогенеза, установленный в наших предыдущих исследованиях по уровню экспрессии даблкортина [5], приходится на 60-90 сутки. Нейробласты таким образом «раздвигают» астроциты, тем самым уменьшая их численную плотность, при этом площадь распределения отростков GFAP+ клеток увеличивается. С уменьшением интенсивности миграции нейрональных предшественников глиальные клетки вновь сближаются, а площадь распределения их отростков падает.

В экспериментальной группе характер распределения GFAP в астроцитах не изменяется (рис. 2А). Сохраняется позитивность в телах клеток и в их отростках.

В гломерулярном слое к 30 суткам эксперимента численная плотность астроцитов возрастает с  $270\pm 20,3$  до  $366\pm 44,8$  (на 50% выше, чем в контрольной группе), к 60 суткам снижается до  $221\pm 26,0$  (на 25% выше, чем в контрольной группе) ( $p<0,05$ ) (табл.). В наружном плексиформном слое к 30 суткам эксперимента плотность возрастает с  $295\pm 35,3$  до  $435\pm 42,6$  (на 45% выше, чем в контрольной группе), к 60 суткам снижается до  $287\pm 27,1$  (в контрольной группе  $305\pm 24,6$ ) ( $p<0,05$ ) (рис. 2А). В гранулярном слое плотность астроцитов к 30 суткам эксперимента повышается с  $224\pm 21,3$  до  $296\pm 29,5$ , достоверно не изменяется до 60 суток (в 2,3 раза выше, чем в контрольной группе) ( $p<0,05$ ) (рис. 2В).

Таблица

**Численная плотность GFAP+ клеток в ОЛ у контрольных и экспериментальных крыс**

Возраст, сут. контроль (эксперимент)	Гломерулярный слой		Наружный плексиформный слой		Гранулярный слой	
	Контр.	Эксп.	Контр.	Эксп.	Контр.	Эксп.
30 (0)	269±20,2	269±20,2	295±35,33	295±35,3	224±21,3	224±21,3
45 (15)	252±23,0*	289±16,0*	245±23,0	356±23,0*°	156±12,1*	265±24°
60 (30)	240±27,6	366±44,8*°	201±43,8	435±42,6*°	133±36,0	296±29,5°
90 (60)	181±27,3*	221±26,0*	305±24,5*	287±27,1*	132±30,5	283±30,5°

Примечание: \* – достоверно различается по отношению к предыдущему сроку,  
 ° – достоверно различается по отношению к контрольной группе

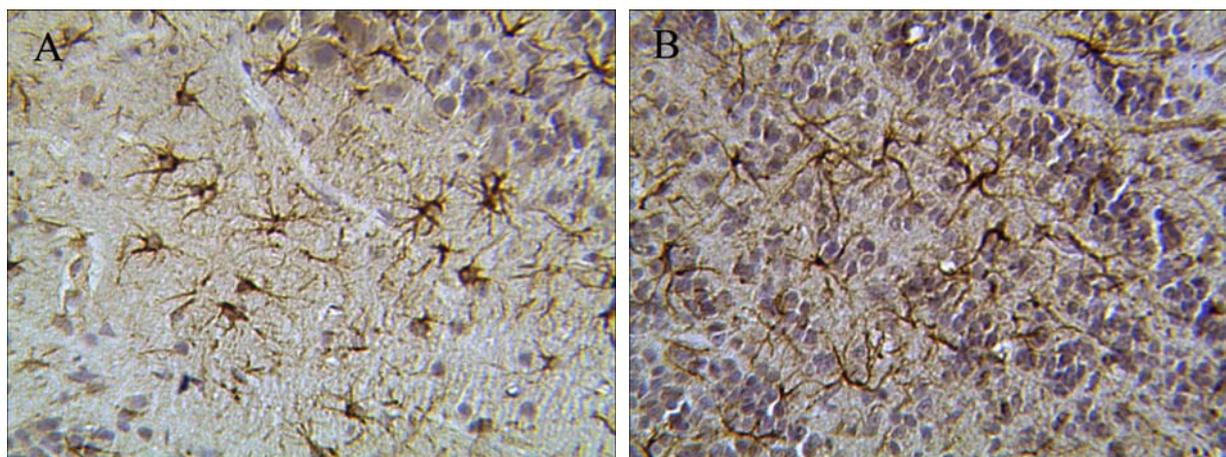


Рис. 2. Увеличение численной плотности распределения астроцитов в слоях обонятельной луковицы крыс на 30 сутки после воздействия капсаицина. А. Астроциты наружном плексиформном слое. В. Астроциты в гранулярном слое. Микрофото: иммуногистохимическое исследование, антитела против GFAP, докраска гематоксилином Майера, об.40.

В роstralном потоке численная плотность возрастает к 30 суткам эксперимента в 1,5 раза с  $422 \pm 42,5$  до  $721 \pm 65,7$  (в 4,5 раза превышает показатель контрольной группы), к 60 суткам снижается до  $563 \pm 51,1$  (в 4 раза выше контрольной группы) ( $p < 0,01$ ).

Средняя площадь сечения тел астроцитов на протяжении наблюдения остаётся практически постоянной, а площадь распределения отростков достоверно не изменяется по сравнению с контрольной группой ( $p > 0,05$ ).

Численная плотность GFAP+ клеток в гранулярном и наружном плексиформном слоях обонятельной луковицы и в разных звеньях роstralного потока является оптимальным показателем для оценки интенсивности глиоза.

Выраженное увеличение численной плотности астроцитов в роstralном потоке, по-видимому, обусловлено ростом миграции нейробластов и их массовой гибелью. Является ли их гибель следствием прямого токсического действия капсаицина или нейротоксин вызывает усиление миграции нейробластов в ответ на гибель части нейронов остается неясным. Для решения этого вопроса необходимо сопоставление полученных результатов с исследованиями экспрессии маркеров нейрогенеза.

**Выводы.** Численная плотность распределения астроцитов и средняя площадь распределения их отростков зависят от слоя обонятельной луковицы. Площадь распределения отростков астроцитов изменяется противоположно изменениям численной плотности распределения самих клеток.

Динамика численной плотности астроцитов в слоях ОЛ при введении капсаицина однотипна. Плотность клеток максимально увеличивается к 30 суткам эксперимента, что соответствует длительности острой фазы реактивного глиоза (4-5 недель), когда астроциты выступают, в том числе и в роли макрофагов. Максимально глиоз выражен в роstralном потоке, наружном плексиформном и гранулярном слоях. Эти изменения являются следствием гибели нейронов, чувствительных к прямому воздействию капсаицина. К 60 суткам численная плотность астроцитов во всех слоях снижается вследствие развития компенсаторных процессов.

Введение токсических доз капсаицина в инфантильном возрасте приводит к развитию выраженного глиоза в ОЛ, пик которого приходится на 30 сутки. Реакция глии на введения нейротоксина носит фазный характер и завершается в целом через два месяца после воздействия.

### Литература

1. Гомазков О.А. Нейрогенез как адаптивная функция мозга. М., 2014. 85 с.
2. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев: Вища школа, 1983. 383 с.
3. Коржевский Д.Э. Изучение пространственной организации астроцитов головного мозга при помощи конфокальной лазерной микроскопии // Морфология. 2009. № 135 (3). С. 76–79.
4. Коржевский Д.Э., Отеллин В.А. Иммуноцитохимическое выявление астроцитов в срезах головного мозга в сочетании с окраской по Нисслю // Морфология. 2004. №125 (3). С. 100–102.
5. Пожилов Д.А. Румянцева Т.А., Варенцов В.Е., Москаленко А.В. GFAP И DCX в обонятельных луковицах и роstralном миграционном потоке у крыс разного возраста. Однораловские морфологические чтения. Воронеж: Научная книга, 2017. С. 213–216.
6. Румянцева Т.А., Ковригина Т.Р., Филимонов В.И., Шилкин В.В., Воробьева О.Б. Влияние введения капсаицина на нейроны спинномозговых ганглиев // Макро- и микроморфология. 1999. № 4. С. 117–119.
7. Abbott N.J. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation // Cell Mol Neurobiol. 2005. № 25. P. 5–23.
8. Balu D.T. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology // NeurosciBiobehav. Rev. 2009. № 33 (3). P. 232–252.
9. Bushong E.A. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development // Int J Dev Neurosci. 2004. № 22. С. 73–86.
10. García-Marqués J., López-Mascaraque L. Clonal Mapping of Astrocytes in the Olfactory Bulb and Rostral Migratory Stream // Cerebral Cortex. 2016. №21. P. 1–15.
11. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. The National Academies Press. Washington: DC, 2011. 248 p.

### References

1. Gomazkov OA. Nejrogenez kak adaptivnaya funkciya mozga [Neurogenesis as an adaptive function of the brain]. Moscow; 2014. Russian.

2. Zapadnyuk IP, Zapadnyuk VI, Zahariya EA, Zapadnyuk BV. *Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, so-derzhanie, ispol'zovanie v ehksperimente* [Laboratory animals. Breeding, keeping, use in the experiment]. Kiev: Vishcha shkola; 1983. Russian.

3. Korzhevskij DEH. *Izuchenie prostranstvennoj organizacii astrocitov golovnogogo mozga pri pomoshchi konfokal'noj lazernoj mikroskopii* [a study of the spatial organization of astrocytes in the brain by using confocal laser scanning microscopy]. *Morfologiya*. 2009;135(3):76-9. Russian.

4. Korzhevskij DEH, Otellin VA. *Immunocitohimicheskoe vyyavlenie astrocitov v srezah golovnogogo mozga v sochetanii s okrasкой po Nisslyu* [immunocytochemical detection of astrocytes in the sections of the brain in combination with the color of the Nissl]. *Morfologiya*. 2004;125(3):100-2. Russian.

5. Pozhilov DA, Rumyancheva TA, Varencov VE, Moskalenko AV. *GFAP i DCX v obonyatel'nyh lukov-icah i rostral'nom migracionnom potoke u krysa raznogo vozrasta* [DCX in the olfactory bulbs and Rostral migration flow in rats of different ages. Peer-to-peer morphological readings]. *Odnoralovskie morfologicheskie chteniya*. Voronezh: Nauchnaya kniga; 2017. Russian.

6. Rumyancheva TA, Kovrigina TR, Filimonov VI, SHilkin VV, Vorob'eva OB. *Vliyanie vvedeniya kap-saicina na nejrocity spinnomozgovykh ganglijev* [the impact of the introduction of capsaicin to the spinal ganglia neurocity]. *Makro- i mikromorfologiya*. 1999;4:117-9. Russian.

7. Abbott NJ. *Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation*. *Cell Mol Neurobiol*. 2005;25:5-23.

8. Balu DT. *Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to dis-ease pathology*. *NeurosciBiobehav. Rev*. 2009;33 (3):232-52.

9. Bushong EA. *Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development*. *Int J Dev Neurosci*. 2004;22:73-86.

10. García-Marqués J, López-Mascaraque L. *Clonal Mapping of Astrocytes in the Olfactory Bulb and Ro-stral Migratory Stream*. *Cerebral Cortex*. 2016;21:1-15.

11. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. The National Academies Press. Washington: DC; 2011.

---

**Библиографическая ссылка:**

Румянчева Т.А., Пожилов Д.А., Варенцов В.Е., Москаленко А.В. Реакция астроцитов обонятельной луковицы крысы на введение капсаицина в инфантильном возрасте // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2018. №5. Публикация 3-13. URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-5/3-13.pdf> (дата обращения: 26.10.2018). \*

\* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2018-5/e2018-5.pdf>