

12. *Rash J. E., Duffy H. S., Dudek F. E., Bilhartz B. L., Whalen L. R., Yasumura T.* Grid-mapped freeze-fracture analysis of gap junctions in gray and white matter of adult rat central nervous system, with evidence for a «panglial syncytium» that is not coupled to neurons. *J Comp Neurol.* 1997; 388(2):265–292. DOI: 10.1002/(sici)1096-9861(19971117)388:2<265::aid-cne6>3.0.co;2-#
13. *Ling E.A., Kaur C., Lu J.* Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epiplexus cells. *Microsc Res Tech.* 1998; 41(1):43–56. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<43::AID-JEMT5>3.0.CO;2-V
14. *Кирик О. В., Сухорукова Е. Г., Алексеева О. С., Коржевский Д. Э.* Субэпендимные микроглиоциты III желудочка головного мозга // *Морфология.* — 2014. — Т. 145. — № 2. — С. 67–69.
15. *Kong G. Y., Kristensson K., Bentivoglio M.* Reaction of mouse brain oligodendrocytes and their precursors, astrocytes and microglia, to proinflammatory mediators circulating in the cerebrospinal fluid, *Glia.* 2002; 37(3):191–205. DOI: 10.1002/glia.10030
16. *Коржевский Д. Э.* Сосудистое сплетение головного мозга и структурная организация гематоликворного барьера у человека // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* — 2003. — Т. 2. — № 1(7). — С. 5–14.

УДК 611.892

*Колос Е. А., Яковлев В. С., Филиппов М. С.*

## **БЕЛОК ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ КОННЕКСИН-43 В ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ГАНГЛИЯ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА**

*Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург,  
Российская Федерация*

---

*Аннотация.* Цель работы состояла в изучении распределения и локализации белка щелевых контактов коннексина-43 (Cx43) в клетках спинномозгового ганглия крысы на разных этапах постнатального онтогенеза: у новорожденных крыс, крыс в возрасте 4 месяцев и 18 месяцев. В работе использованы иммуногистохимические методы выявления Cx43, а также маркера глиоцитов — глутаминсинтетазы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что коннексин-43-содержащие структуры присутствуют преимущественно в клетках-сателлитах новорожденных, молодых и стареющих животных. Показано, что бляшки белковых каналов, образованных белком Cx43, с возрастом становятся более многочисленными. Установленный факт увеличения числа Cx43-содержащих щелевых контактов в клетках-сателлитах после рождения может свидетельствовать об активации взаимодействия между глиальными клетками в чувствительных узлах крыс в постнатальном онтогенезе.

*Ключевые слова:* спинномозговой ганглий крысы, щелевые межклеточные контакты, коннексин-43, старение, иммуногистохимия.

*Kolos E. A., Yakovlev V. S., Filippov M. S.*

## **GAP JUNCTION PROTEIN CONNEXIN-43 IN DORSAL ROOT GANGLION GLIAL CELLS OF RATS OF DIFFERENT AGES**

*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation*

*Abstract.* The aim of this work was to study the distribution and localization of the gap junction protein connexin-43 (Cx43) in rat dorsal root ganglion cells at different stages of postnatal ontogenesis: in newborn rats, rats aged 4 months and 18 months. We used immunohistochemical methods to detect Cx43, as well as the glial marker – glutamine synthetase.

The main results showed that connexin-43-containing structures are identified predominantly in satellite cells of newborns, young and aging animals. It has been established that Cx43 gap junction plaques become more numerous with age. An increase in the number of Cx43-containing gap junctions in rat satellite glial cells after birth may indicate the activation of the interaction between glial cells in rat sensory ganglia in postnatal ontogenesis.

*Keywords:* dorsal root ganglion, gap junctions, connexin-43, aging, immunohistochemistry.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Известно, что в процессе передачи сигналов в центральной нервной системе принимают участие не только нервные, но и глиальные клетки, способные оказывать влияние на синаптическую активность нейронов [1, 2]. Структурной особенностью спинномозгового ганглия (СМГ) периферической нервной системы является отсутствие синаптических контактов между нейронами в пределах ганглия [3]. Тело каждого сенсорного нейрона изолировано слоем сателлитных глиальных клеток (клеток-сателлитов, КС) и заключено в оболочку из соединительной ткани. Такое расположение нейрональных и глиальных элементов СМГ указывает на то, что их взаимодействие является ключевым фактором, регулирующим нейронную активность. Как известно, основой коммуникации клеток в тканях и органах являются различные типы межклеточных контактов, в том числе щелевые. В настоящее время большое внимание исследователей уделяется изучению коннексин-43-содержащих щелевых контактов в ЦНС в норме и при патологии [4, 5]. В то же время исследования, посвященные периферической нервной системе (ПНС), немногочисленны и их результаты противоречивы. С помощью электронной микроскопии и применения внутриклеточного введения флуоресцентных красителей ранее показано, что в СМГ одним из способов коммуникации клеток-сателлитов друг с другом являются щелевые контакты [6–8]. Имеются единичные исследования, выполненные с применением иммуногистохимического метода выявления белка щелевых контактов коннексина-43 (Cx43) в клетках спинномозгового ганглия [9]. Целью работы явилось изучение распределения и локализации белка щелевых контактов коннексина-43 (Cx43) в клетках спинномозгового ганглия крысы на разных этапах постнатального онтогенеза.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В работе использовали новорожденных, половозрелых (возраст 4 месяца) и стареющих (возраст 18 месяцев) крыс Вистар ( $n = 20$ ). Все манипуляции с живот-

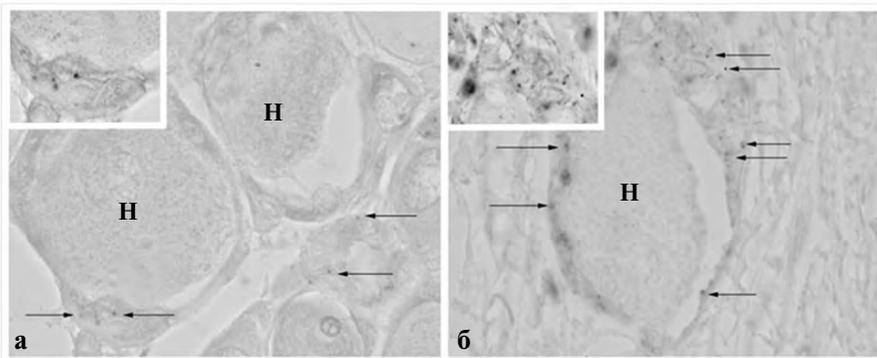
ными были выполнены в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных и с соблюдением Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.). Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол № 4/22 от 29.09.2022). У крыс выделяли СМГ на уровне шейного отдела спинного мозга (СМ) и фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [10]. После соответствующей гистологической обработки материал заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 3 и 5 мкм. На парафиновых срезах проводили иммуногистохимическую реакцию на Сх43, используя мышинные моноклональные антитела (клон F-7, Santa Cruze Biotechnology, США). Для идентификации клеток-сателлитов (КС) применяли моноклональные мышинные антитела к глутаминсинтетазе (клон GS-6, Chemicon, США). В качестве вторичных реагентов был использован набор UltraVision Quanto Detection System HRP (TL-060-QH; Thermo Fisher Scientific, США). В работе исследовали распределение скоплений Сх43-содержащих белковых каналов — бляшек белковых каналов (gap junction plaque), которые на гистологических препаратах имеют вид иммунопозитивных точек. Препараты анализировали с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Германия), микрофотографии получали с применением камеры ICC50 (Leica, Германия) и программного обеспечения LAS EZ (Leica, Германия). Анализ Сх43-содержащих структур проводили с помощью программы ImageJ (NIH, США). Для сравнительного исследования ганглиев новорожденных, половозрелых и стареющих крыс проводили подсчет числа сателлитных клеток в глиальной оболочке каждого исследуемого чувствительного нейрона. С целью выявления возрастных изменений межклеточных взаимодействий подсчитывали число Сх43-иммунопозитивных точек в пределах сателлитной оболочки каждого нейрона. Подсчет проводили на сто нейронов, статистический анализ различий между группами проводили с помощью критерия Краскела — Уоллиса с последующим парным сравнением групп тестом Манна — Уитни. Специфичность иммуногистохимической реакции на коннексин-43 и глутаминсинтетазу оценивали при постановке отрицательного и положительного контролей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В чувствительном ганглии крыс тело каждого нейрона окружено тонкой оболочкой, образованной уплощенными глиальными клетками с ядром эллиптической формы. Таким образом, в спинальных ганглиях глиальные клетки легко отличимы от тел нервных клеток по их форме, положению и морфологическим характеристикам ядра. У новорожденных крыс СМГ уже приобретают свойственную им структуру, и молодые нейроны на препаратах, подкрашенных толуидиновым синим по Нисслию, морфологически отличаются от КС. Показано, что у новорожденных животных Сх43 локализуется преимущественно в перинуклеарной зоне цитоплазмы клеток-сателлитов. Вероятно, такое распределение белка обусловлено присутствием Сх43-содержащих везикул, транспортирующих белок к формирующимся бляшкам щелевых контактов. Также в области уплощенных тел сателлитоцитов идентифицируются единичные иммунопозитивные точки, представляющие собой бляшки щелевого контакта.

При выявлении Сх43 в СМГ половозрелых и стареющих крыс идентифицируется диффузное окрашивание цитоплазмы низкой интенсивности, а также ин-

тенсивно окрашенные мелкие точки — бляшки белковых каналов (*рис. 1*). Для установления локализации зон иммунореактивности на последовательных срезах (толщиной 3 мкм) ганглиев крыс была проведена иммуногистохимическая реакция на Сх43 и фермент глутаминсинтетазу, являющийся маркером КС. Установлено, что изучаемые коннексин-43-иммунопозитивные бляшки локализуются только в пределах сателлитной оболочки.



*Рис. 1.* Сх43-иммунопозитивные структуры в клетках-сателлита спинномозгового ганглия крыс в возрасте 4 месяцев (а) и 18 месяцев (б). ↑↑ — бляшки щелевых соединений; Н — чувствительные нейроны. Иммуногистохимическая реакция на коннексин-43. Ув. 1000

Для оценки возрастных изменений в ганглии крыс был проведен количественный анализ, который показал, что с момента рождения число Сх43-содержащих бляшек в течение первых 4 месяцев постнатального развития увеличивается вдвое ( $p < 0,05$ ). Также установлено, что среднее число Сх43-иммунопозитивных бляшек в глиальных оболочках стареющих животных в два раза превышает аналогичный показатель у молодых крыс ( $p < 0,05$ ). При этом число клеток-сателлитов с возрастом не изменяется ( $p > 0,05$ ). Следует отметить, что мы не обнаружили присутствия коннексина-43 на поверхности чувствительных нейронов. Результаты работы, демонстрирующие увеличение Сх43-содержащих щелевых контактов у крыс в постнатальном онтогенезе дополняют имеющиеся в литературе данные. В настоящее время характер изменений нейрон-глиальных и межглиальных взаимодействий в СМГ при старении изучен фрагментарно. Немногочисленные исследования были выполнены с применением электронной микроскопии и с внутриклеточным введением специфических красителей. Ряд исследований, выполненных на мышах, показывает, что при старении возрастает распространение флуоресцентного красителя между клетками-сателлитами одной глиальной оболочки, что свидетельствует о возрастании количества щелевых контактов между глиоцитами [11, 12]. В то же время, по данным Procacci P. и соавт. [9], среднее количество Сх43-иммунопозитивных щелевых контактов в перинейрональных сателлитных клетках старых мышей значительно ниже по сравнению с глиоцитами молодых и взрослых животных. Можно предположить, что в изученные нами сроки у стареющих крыс в СМГ начинают развиваться дегенеративные процессы, еще не очевидные структурно, но оказывающие влияние на функции клеток, и увеличение взаимодействий клеток-сателлитов является компенсаторной реакцией в ответ на изменение гомеостаза. Важно отметить, что увеличение коннексина-43 в СМГ отме-

чено рядом авторов при экспериментальной патологии ПНС: при повреждении периферического нерва, в условиях системного и локального воспаления, при моделировании хронической боли [13, 14].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные указывают на динамические изменения межклеточных взаимодействий в СМГ крыс на разных сроках постнатального развития. Оказалось, что в первые 4 месяца после рождения число бляшек Sx43-содержащих белковых каналов в пределах сателлитной оболочки чувствительных нейронов возрастает вдвое. У животных в возрасте 18 месяцев среднее число бляшек Sx43-содержащих каналов в два раза превышает аналогичный показатель 4-месячных крыс. Установлено, что щелевые контакты, сформированные белком коннексином-43, образуют преимущественно клетки-сателлиты чувствительных ганглиев. Сенсорные нейроны подобных структур не имеют.

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-25-10003, <https://rscf.ru/project/23-25-10003/>) и гранта Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 05.05.2023 № 23-25-10003.*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Tsuda M., Inoue K., Salter M. W. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in «small» glia. Trends Neurosci. 2005; 28:101–107.
2. Ji R. R., Kawasaki Y., Zhuang Z. Y., Wen Y. R., Decosterd I. Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. Neuron glia biology. 2006; 2:259–269.
3. Pannese E. The satellite cells of the sensory ganglia. Adv Anat Embryol Cell Biol. 1981; 65:1–111.
4. Orellana J. A., Retamal M. A., Moraga-Amaro R., Stehberg J. Role of astroglial hemichannels and pannexons in memory and neurodegenerative diseases. Front Integr Neurosci. 2016; 10:26. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnint.2016.00026>
5. Brocardo L., Acosta L. E., Piantanida A. P., Rela L. Beneficial and detrimental remodeling of glial connexin and pannexin functions in rodent models of nervous system diseases. Front Cell Neurosci. 2019; 13:491. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00491>
6. Hanani M., Huang T. Y., Cherkas P. S., et al. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. Neuroscience. 2002; 114(2):279–283.
7. Pannese E., Ledda M., Cherkas P. S., et al. Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. Anat Embryol (Berl). 2003; 206:337–347.
8. Huang T. Y., Belzer V., Hanani M. Gap junctions in dorsal root ganglia: possible contribution to visceral pain. Eur J Pain. 2010; 14(1):49.e1–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.02.005>

9. *Procacci P., Magnaghi V., Pannese E.* Perineuronal satellite cells in mouse spinal ganglia express the gap junction protein connexin43 throughout life with decline in old age. *Brain Res Bull.* 2008; 75(5):562–569.
10. *Grigorev I. P., Korzhevskii D. E.* Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). *Modern Technologies in Medicine.* 2018; 10:156–165.
11. *Huang T. Y., Hanani M., Ledda M., et al.* Aging is associated with an increase in dye coupling and in gap junction number in satellite glial cells of murine dorsal root ganglia. *Neuroscience.* 2006; 137(4):1185–1192. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.10.020
12. *Hanani M., Spray D. C., Huang T. Y.* Age-related changes in neurons and satellite glial cells in mouse dorsal root ganglia. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24:2677. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24032677>
13. *Wu A., Green C. R., Rupenthal I. D., Moalem-Taylor G.* Role of gap junctions in chronic pain. *J Neurosci Res.* 2012; 90(2):337–345.
14. *Wei H., Wu H. Y., Chen Z., et al.* Mechanical antihypersensitivity effect induced by repeated spinal administrations of a TRPA1 antagonist or a gap junction decoupler in peripheral neuropathy. *Pharmacol Biochem Behav.* 2016; 150–151:57–67.

УДК 611.013

*Комарова А. С.*

### **ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ЭПИТЕЛИЕВ В ВЫСТИЛКЕ АНАЛЬНОГО КАНАЛА У ЗАРОДЫШЕЙ КРЫС НА ПОЗДНИХ СРОКАХ РАЗВИТИЯ**

*Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова, Санкт-Петербург,  
Российская Федерация*

---

*Аннотация.* Цель работы: охарактеризовать особенности взаимоотношения эпителиев в месте контакта гистогенетически различных эпителиев в анальном канале у зародышей белых крыс на поздних сроках развития.

Материалы и методика работы. Материалом служила область сформированного анального канала у зародышей белых крыс на поздних сроках развития (17–20 суток). Методика работы заключается в изучении парафиновых срезов, полученных в результате стандартной гистологической проводки и окрашенных гематоксилином и эозином. Изучали препараты под световым микроскопом Score A1 с камерой AxioCam ERc 5s и использованием лицензионной программы ZEN 2.3. (Германия).

Основные результаты работы содержат сведения о том, что на препаратах всегда удается обнаружить место, где заканчивается многослойный плоский эпителий и начинается эпителий кишечного типа. Обнаружено, что характер взаимоотношений гистогенетически различных эпителиев в этом месте может быть разным. Взаимодействия эпителиев в выстилке анальной области у зародышей