

УДК 611.892

БЕЛОК ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ КОННЕКСИН-43 В ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ГАНГЛИЯ КРЫСЫ

© 2023 г. Е. А. Колос¹, *, Д. Э. Коржевский¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*E-mail: koloselena1984@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.06.2023 г.

После доработки 28.07.2023 г.

Принята к публикации 31.07.2023 г.

Цель настоящего исследования состояла в изучении динамики распределения и локализации белка щелевых контактов коннексина-43 (Cx43) в клетках ганглия заднего корешка спинного мозга (dorsal root ganglion, DRG) крысы на разных этапах постнатального онтогенеза для оценки морфологических признаков возрастных изменений межклеточных взаимодействий. Работа выполнена на крысах Вистар в возрасте 4 и 18 мес с помощью иммуногистохимических методов. Глиальные клетки выявляли с применением антител к глутаминсинтетазе, макрофаги — с применением маркера Iba-1. Установлено, что коннексин-43-содержащие структуры идентифицируются преимущественно в сателлитных глиальных клетках молодых и стареющих животных. Чувствительные нейроны, а также макрофаги DRG крыс исследованных возрастных групп коннексин-43 не содержат. При анализе возрастных изменений межклеточных контактов в DRG крыс было установлено, что зоны, обогащенные коннексином-43, соответствующие бляшкам (plaques) белковых каналов, обеспечивающие метаболическое взаимодействие сателлитных клеток в ганглиях задних корешков спинного мозга, с возрастом становятся более многочисленными. Данный факт может свидетельствовать об активации взаимодействия между глиальными клетками в чувствительных узлах крыс при старении.

Ключевые слова: старение, ганглий заднего корешка спинного мозга, иммуногистохимия, белок Iba-1, коннексин-43, щелевые каналы, межклеточные взаимодействия

DOI: 10.31857/S0041377123060056, **EDN:** QPQWCJ

Сложные взаимодействия между нейронами и глиоцитами нервной системы, включающие множество механизмов прямой и обратной связи, обеспечивают слаженное функционирование нейронных цепей, а также обуславливают проявления соответствующей реакции на патологическое воздействие (Kettenmann et al., 1996; Meyer, Kaspar, 2017; Adamczyk, 2023). В последнее десятилетие наблюдается рост числа научных работ, посвященных исследованию межглиальных и нейрон-глиальных взаимодействий, в которых рассматривается как влияние глиоцитов непосредственно на нейроны, так и их опосредованное влияние на нервные клетки путем изменения коммуникаций между глиальными клетками (Almad et al., 2016; Kim et al., 2020; Miyazaki, Asanuma, 2020).

Клеточные коммуникации в норме и при патологии обеспечивают различные типы контактов, в том числе щелевые. Щелевые контакты образованы коннексинами белками, объединенными в парные гексамерные комплексы (коннексоны). Непарные

коннексоны образуют открытые гемиканалы с особыми коммуникативными функциями. Одним из наиболее распространенных белков щелевых контактов в ЦНС является коннексин-43 (Jacobas et al., 2003; Chew et al., 2010; Basu, Das Sarma, 2018). Обширные исследования коннексин-43-содержащих щелевых контактов в центральной нервной системе (ЦНС) в норме и при повреждении проводились различными исследовательскими группами в течение нескольких последних десятилетий. Показано, что к увеличению экспрессии коннексина-43 в глиоцитах приводит ишемия ЦНС, травма спинного и головного мозга, вирусные инфекции (Fukuda, 2007; Chew et al., 2010; Orellana et al., 2012, 2016; Brocardo et al., 2019). На моделях различных нейродегенеративных заболеваний установлено, что экспрессия коннексина-43 возрастает в различных областях головного мозга лабораторных животных при развитии нейродегенеративных процессов (Huang et al., 2021). Большое внимание исследователи уделяют изучению нейропротекторной или нейротоксической роли таких изменений в системе щелевых контактов глиальных клеток (Fukuda, 2007; Chew et al., 2010; Orellana et al., 2012, 2016; Brocardo et al., 2019).

Принятые сокращения: ПНС — периферическая нервная система; Cx43 — коннексин-43; DRG — ганглий заднего корешка спинного мозга (dorsal root ganglion).

При этом сведения о роли белков семейства коннексинов во взаимодействии глиоцитов и нейронов периферической нервной системы (ПНС) немногочисленны и оставляют много вопросов. В частности не ясно, присутствуют ли коннексин-43-опосредованные коммуникации между нейронами и глиоцитами ганглия заднего корешка спинного мозга (DRG) и изменяются ли они при патологических нарушениях в ПНС. Вопрос возрастных количественных изменений коннексин-43-содержащих щелевых каналов в DRG также остается открытым. Вовлеченность щелевых контактов и полуканалов в межглиальные и нейрон-глиальные взаимодействия, а также изменения свойств таких межклеточных контактов в онтогенезе требует дополнительных исследований. Несмотря на большой интерес исследователей к проблемам старения нервной системы, в публикациях мало внимания уделяется изменениям межклеточных коммуникаций в ПНС в возрастном аспекте. В литературе представлено мало информации о возрастных изменениях глиальных щелевых контактов периферической нервной системы (Huang et al., 2006; Martinelli et al., 2004, 2005, 2006; Procacci et al., 2008). Основная масса исследований, касающихся реорганизации щелевых контактов в ПНС была выполнена с применением методов, не позволяющих четко визуализировать распределение структурных белков каналов в клетках (Huang et al., 2006; Martinelli et al., 2004, 2005, 2006; Hanani et al., 2023). Особенности возрастных межклеточных взаимодействий в DRG изучали главным образом с применением электронной микроскопии (Huang et al., 2006; Martinelli et al., 2004, 2005), а также путем внутриклеточного введения специфических флуоресцентных красителей (Huang et al., 2006; Hanani et al., 2023). Результаты таких исследований показывают, что количество щелевых контактов между глиоцитами при старении возрастает, но тип образующих их коннексинов остается неизвестным. Лишь в единичных исследованиях с применением иммуногистохимических маркеров проводится оценка распределения коннексинов в ганглии заднего корешка спинного мозга (dorsal root ganglion, DRG) на разных сроках постнатального развития мышей (Procacci et al., 2008).

Цель настоящего исследования состояла в оценке динамики распределения и локализации белка щелевых контактов коннексина-43 (Cx43) в клетках ганглия заднего корешка спинного мозга крысы на разных этапах постнатального онтогенеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на самцах крыс Вистар в возрасте 4 мес ($n = 6$) и 18 мес ($n = 6$). Все манипуляции с животными 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 молодых и стареющих животных выделяли ганглии заднего корешка спинного мозга на уровне $C_{III}-C_V$ сегментов. В качестве фиксатора использовали раствор цинк-этанол-формальдегида, разработанный в Отделе общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ» Д.Э. Коржевским для проведения иммуногистохимических реакций на парафиновых срезах (Korzhevskii et al., 2014, 2015; Grigorev, Korzhhevskii, 2018), обезжизняли в спиртах, заливали в парафин и изготавливали серийные срезы толщиной 5 мкм и 3 мкм. Полученные срезы обеспарафинивали и регидратировали, производили тепловое демаскирование антигена в течение 25 мин (99.5°C) в предварительно разогретом до 60°C 10%-ном водном растворе тиосульфата натрия. Для блокировки сайтов неспецифического связывания на срезы наносили блокировочный раствор Protein block (Spring Bioscience, США). Иммуногистохимическую реакцию на белок коннексин-43 (Cx43) проводили с использованием мышинных моноклональных антител (sc-271837, клон F-7, разведение 1 : 600, Santa Cruze Biotechnology, США). Время инкубации для первичных антител составило 24 ч при температуре 27°C . Кроме того, с целью установления типа клеток, синтезирующих белок щелевых контактов в ганглиях заднего корешка спинного мозга, на последовательных срезах толщиной 3 мкм проводили иммуногистохимическую реакцию на Cx43 и фермент глутаминсинтетазу — маркер глиальных клеток, позволяющий идентифицировать сателлитные глиальные клетки чувствительного ганглия (Hanani, Spray, 2012; Kolos, Korzhhevskii, 2018). Для этого применяли антитела к коннексину-43 и моноклональные мышинные антитела к глутаминсинтетазе в разведении 1 : 800 (MAB302, клон GS-6, Chemicon, США). В качестве вторичных реагентов был использован набор UltraVision Quanto Detection System HRP (TL-060-QN; Thermo Fisher Scientific, США), обладающий специфичностью к мышинным и к кроличьим первичным антителам. Для предотвращения перекрестного связывания вторичных реагентов с собственными иммуноглобулинами крысы, к раствору вторичных антител добавляли нормальную крысиную сыворотку. Так как в областях глиальной оболочки нейронов кроме сателлитных глиальных клеток могут присутствовать также макрофаги, для их идентификации на последовательных срезах толщиной 3 мкм были проведены иммуногистохимические реакции на коннексин-43 и кальций-связывающий белок Iba-1, являющийся микроглиально-макрофагальным маркером (Ohsawa et al., 2000; Pierezan et al., 2014). Для идентификации макрофагов применяли поликлональные козы антитела (ab5076, разведение 1 : 1000, AbCam, Великобритания). В качестве вторичных антител применяли антитела из набора VECTA-STAIN® Universal Quick kit (PK-8800; Vector Labora-

tories Inc, США) с добавлением нормальной мышечной сыворотки (Dako, Дания).

Во всех протоколах иммуногистохимических реакций для визуализации продукта реакции применяли хромоген 3',3'-диаминобензидин из набора DAB+ (Dako, Дания). После проведения реакции часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином Карazzi (Биовитрум, Россия) и 0.1%-ным водным раствором толуидинового синего по Нисслю (Sigma, США). В настоящем исследовании нейрональные элементы идентифицировали по морфологическим критериям после окраски толуидиновым синим или гематоксилином. Совместную локализацию исследуемых белков в пределах клетки определяли на последовательных срезах толщиной 3 мкм, позволяющих проследить топографию клеток в DRG.

Все полученные препараты анализировали с использованием светового микроскопа Leica DM750 (Германия), микрофотографии получали с применением камеры ICC50 (Leica, Германия) и программного обеспечения LAS EZ (Leica, Германия). Оценку возрастных морфологических и количественных изменений популяции сателлитных глиальных клеток проводили на препаратах, окрашенных с помощью антител к глутаминсинтетазе и гематоксилином. Для оценки возрастных изменений сателлитных глиальных клеток при старении производили фотосъемку исследуемых областей, расположенных близко друг к другу, но без перекрытия. Анализ изображений проводили с применением программы ImageJ (NIH, США). Проводили подсчет числа сателлитных клеток в глиальной оболочке каждого исследуемого чувствительного нейрона, учитывая сателлитные глиальные клетки, ядра которых располагаются в плоскости среза. Фрагменты цитоплазмы, не содержащие ядро в плоскости среза, при количественной оценке не учитывали.

С целью выявления изменений межклеточных взаимодействий, ассоциированных с возрастом, подсчитывали число Sx43-иммунопозитивных точек в пределах сателлитной оболочки каждого нейрона. Для анализа использовали срезы без дополнительного окрашивания гематоксилином, так как в этом случае Sx43-иммунопозитивные структуры выглядят более контрастными и четче визуализируются.

Количественный анализ проводили на изображениях, полученных при увеличении объектива 100×. Подсчет проводили для 100 чувствительных нейронов каждого животного. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$. Данные гистограмм приведены в форме среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Специфичность иммуногистохимической реакции на коннексин-43, глутаминсинтетазу и белок Iba-1 оценивали при постановке отрицательного и положительного контролей. Для положительного контроля использовали архивные срезы спинного мозга взрослых крыс, фиксированные и обработанные та-

ким же образом, как и исследуемые чувствительные ганглии. При постановке отрицательного контроля исключали инкубацию с первичными антителами. На срезы ганглия заднего корешка спинного мозга крыс наносили разбавитель для антител (S0809; Dako, Дания).

При постановке отрицательного контроля для иммуногистохимического выявления коннексина-43, глутаминсинтетазы и белка Iba-1 на срезах ганглиев задних корешков спинного мозга молодых и стареющих животных зон иммунореактивности не обнаружено.

При проведении положительного иммуногистохимического контроля для коннексина-43 на срезах спинного мозга в сером веществе идентифицируется интенсивное точечное окрашивание нейропиля, обусловленное экспрессией белка астроглией. В области пограничной глиальной мембраны, образованной ножками астроцитов, также присутствует точечное окрашивание. Кроме того, интенсивное окрашивание присутствует в клетках оболочек спинного мозга, а также точечные иммунопозитивные структуры присутствуют в эпендимных клетках. При постановке положительного иммуногистохимического контроля для глутаминсинтетазы отмечено присутствие фермента в отростчатых клетках серого вещества спинного мозга, имеющих морфологические признаки астроцитов, а также в мелких округлых клетках — олигодендроцитах спинного мозга. Присутствие белка Iba-1 в спинном мозге крыс при постановке положительного контроля отмечено в клетках с округлым или веретеновидным телом и длинными тонкими ветвящимися отростками — микроглиоцитах спинного мозга. Таким образом, результаты положительного иммуногистохимического контроля для всех маркеров свидетельствуют в пользу высокой специфичности использованных протоколов окрашивания.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ганглиях задних корешков спинного мозга нервные и глиальные клетки располагаются особым образом. Клеточные тела первичных сенсорных нейронов локализируются по периферии органа, их отростки располагаются преимущественно в центральной части узла. Окрашивание гистологических срезов ганглия гематоксилином или толуидиновым синим по Нисслю позволяет легко идентифицировать нейроны и сателлитную глию. Нейроны чувствительного ганглия идентифицируются как округлые или овальные клетки с крупным светлым ядром и темным компактным ядрышком. Цитоплазма таких клеток содержит интенсивно окрашенные гранулы хроматофильной субстанции (вещество Ниссля). Тело каждого нейрона окружено тонкой оболочкой, образованной уплотненными глиальными клетками с темными мелкими ядрами эллиптической формы — сателлитными глиальными клетками (рис. 1а). Таким образом, в чувствительных ганглиях глиальные

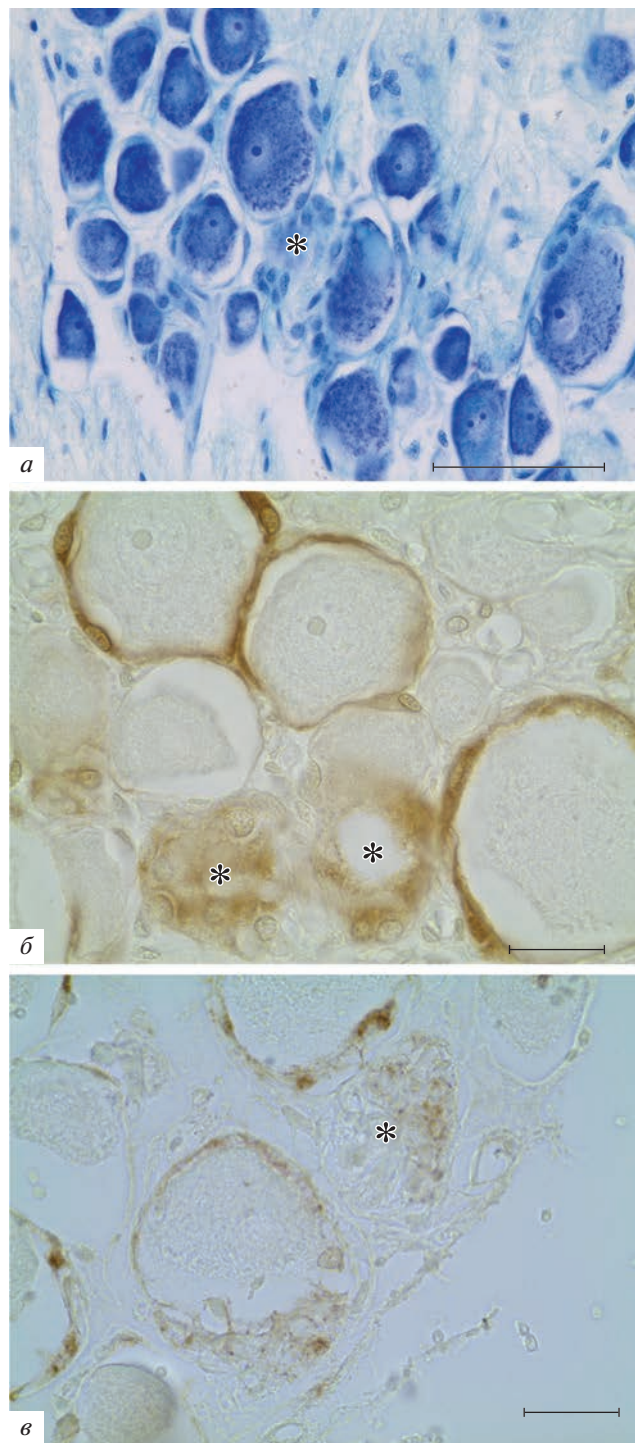


Рис. 1. Клетки ганглия заднего корешка спинного мозга крыс в возрасте 4 мес. *а* — Окраска толуидиновым синим по Нисслю, *б* — иммуногистохимическая реакция на глутаминсинтетазу, *в* — иммуногистохимическая реакция на коннексин-43. Звездочки — узелки Нажотта. Масштабные отрезки: *а* — 50 мкм, *б*, *в* — 20 мкм.

клетки легко отличимы от тел нервных клеток по их форме, положению и морфологическим характеристикам ядер.

При исследовании межклеточных контактов в ганглии молодых животных коннексин-43-иммунопозитивные структуры были выявлены вокруг тел как мелких, так и крупных сенсорных нейронов. Для установления локализации зон иммунореактивности была проведена подкраска срезов гематоксилином, а также на последовательных срезах толщиной 3 мкм была проведена иммуногистохимическая реакция на Сх43 и фермент глутаминсинтетазу, являющийся маркером сателлитной глии. При выявлении Сх43 в сателлитных глиальных клетках идентифицируется диффузное окрашивание цитоплазмы низкой интенсивности, преимущественно в околоядерной зоне, а также интенсивно окрашенные мелкие точки, локализованные на поверхности глиоцитов в области их контактов друг с другом. Данные точки представляют собой бляшки (plaques) белковых каналов (коннексонов) (рис. 2*а*). Диффузное иммуномечение цитоплазмы, вероятно, связано с диффузным цитоплазматическим распределением коннексина-43 в клетках, обусловленным активным транспортом Сх43-содержащих везикул к формирующимся бляшкам щелевых контактов с участием микротрубочек. Однако данное предположение требует дополнительных исследований. Большое количество иммунопозитивных точек и диффузное окрашивание цитоплазмы присутствует в структурах, образованных компактно сгруппированными глутаминсинтетаза-иммунопозитивными мелкими клетками с округлыми ядрами (рис. 1*б*, *в*). Такие структуры представляют собой скопления сателлитных глиальных клеток, называемые “остаточными узелками” или узелками Нажотта (Nageotte nodules) (рис. 1*а*, *б*, *в*). Установлено, что основное количество коннексин-43-иммунопозитивных структур обнаруживается в пределах глиальной оболочки чувствительных нейронов, образованной глутаминсинтетаза-содержащими клетками. В ходе исследования не было обнаружено окрашивания и иммунопозитивных точечных структур в области тел нейронов ганглия заднего корешка спинного мозга молодых крыс.

В DRG стареющих животных идентифицируется большое количество Сх43-иммунопозитивных точек в пределах глиальной оболочки каждого нейрона (рис. 2*б*). Также большое количество коннексин-позитивных точек идентифицируется в остаточных узелках Нажотта. При иммуногистохимическом выявлении коннексина-43 и глутаминсинтетазы на серийных последовательных срезах DRG стареющих животных установлено, что большинство Сх43-иммунореактивных точек локализовано в области глутаминсинтетаза-положительных сателлитных клеток (рис. 3*а*, *б*). Также как у молодых животных, при старении не было обнаружено коннексин-43-иммунопозитивных точечных структур в области тел нейронов.

Стоит отметить, что в ходе исследования DRG молодых и стареющих животных в области глиальной оболочки отдельных чувствительных нейронов были обнаружены глутаминсинтетаза-иммунопози-

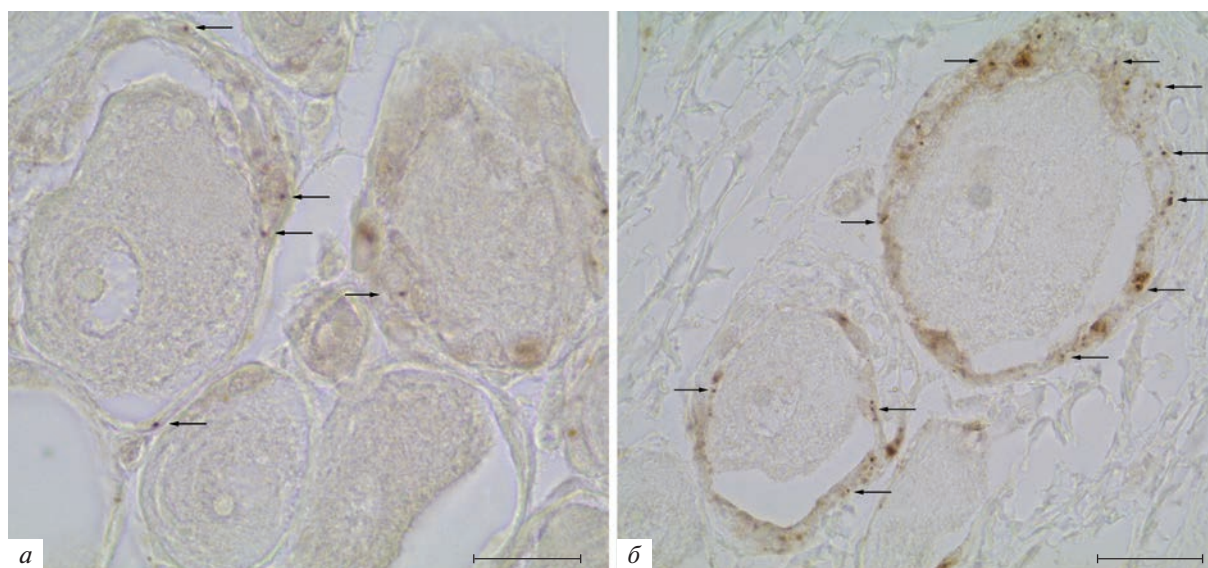


Рис. 2. Коннексин-43 в сателлитных глиальных клетках спинномозгового ганглия молодых (4 мес, *а*) и стареющих (18 мес, *б*) крыс. Стрелки — коннексин-43-иммунопозитивные точки в сателлитных глиальных клетках. Иммуногистохимическая реакция на коннексин-43. Масштабный отрезок — 20 мкм.

тивные клетки, не проявляющие иммунореактивность при реакции на коннексин-43. Такие клетки располагаются во внешних слоях многослойной глиальной оболочки нейронов в области расположения отростков нейронов (рис. 3*в, г*).

В результате количественной оценки среднего числа сателлитных глиальных клеток, образующих оболочку одного нейрона было установлено, что данный показатель значимо не отличается в исследованных возрастных группах и составляет для крыс в возрасте 4 и 18 мес 3.31 ± 0.34 и 3.35 ± 0.13 соответственно ($p > 0.05$). При этом среднее число Сх-43-иммунопозитивных точек в глиальных оболочках стареющих животных в два раза превышает аналогичный показатель у молодых крыс ($p < 0.05$) (рис. 4).

При проведении реакции на белок Iba-1 в DRG крыс двух исследованных возрастных групп были выявлены иммунопозитивные клетки неправильной амебоидной формы. У молодых животных такие клетки располагаются преимущественно в соединительной ткани между глиальными оболочками соседних нейронов. Отмечено, что у стареющих животных нередко Iba-1-иммунопозитивные клетки проникают между сателлитными глиальными клетками, а их толстые отростки достигают поверхности чувствительного нейрона (рис. 5). При анализе распределения Сх43 и белка Iba-1 на последовательных серийных срезах толщиной 3 мкм DRG животных обеих возрастных групп не было обнаружено зон совместной локализации исследуемых маркеров в одной клетке, что свидетельствует об отсутствии коннексин-43-содержащих контактов между макрофагами и глиальными клетками DRG.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время убедительно показано, что в передаче сигналов в центральной нервной системе принимают участие не только нейроны, но и глиальные клетки, включая астроциты, олигодендроциты и микроглию, которые оказывают влияние на синаптическую активность нервных клеток (Tsuda et al., 2005; Ji et al., 2006; Kettenmann et al., 2011). Структурной особенностью чувствительных узлов периферической нервной системы является отсутствие синаптических контактов между сенсорными нейронами в пределах ганглия (Pannese, 1981). Напротив, тело каждого сенсорного нейрона изолировано слоем сателлитных глиальных клеток и заключено в оболочку из соединительной ткани, образуя структурную единицу ганглия заднего корешка спинного мозга. Такое структурированное расположение нейрональных и глиальных элементов DRG указывает на то, что их взаимодействие является ключевым фактором, регулирующим нейронную активность. Одним из способов коммуникации сателлитных глиальных клеток друг с другом являются щелевые контакты. Показано, что щелевые каналы и гемиканалы, образованные белком коннексином-43, и паннексоны, расположенные в сателлитных глиальных клетках, играют важную роль в паракринной коммуникации между глиальными клетками и сенсорными нейронами (Procacci et al., 2008; Huang et al., 2010; Retamal et al., 2017; Hanani, Spray, 2020; Xing et al., 2023). Таким образом, межглиальные и нейрон-глиальные взаимодействия имеют основополагающее значение для нормального функционирования периферической нервной системы. Однако точные механизмы такой связи до сих пор неясны. С применением электронной микроскопии было показано, что в интактном

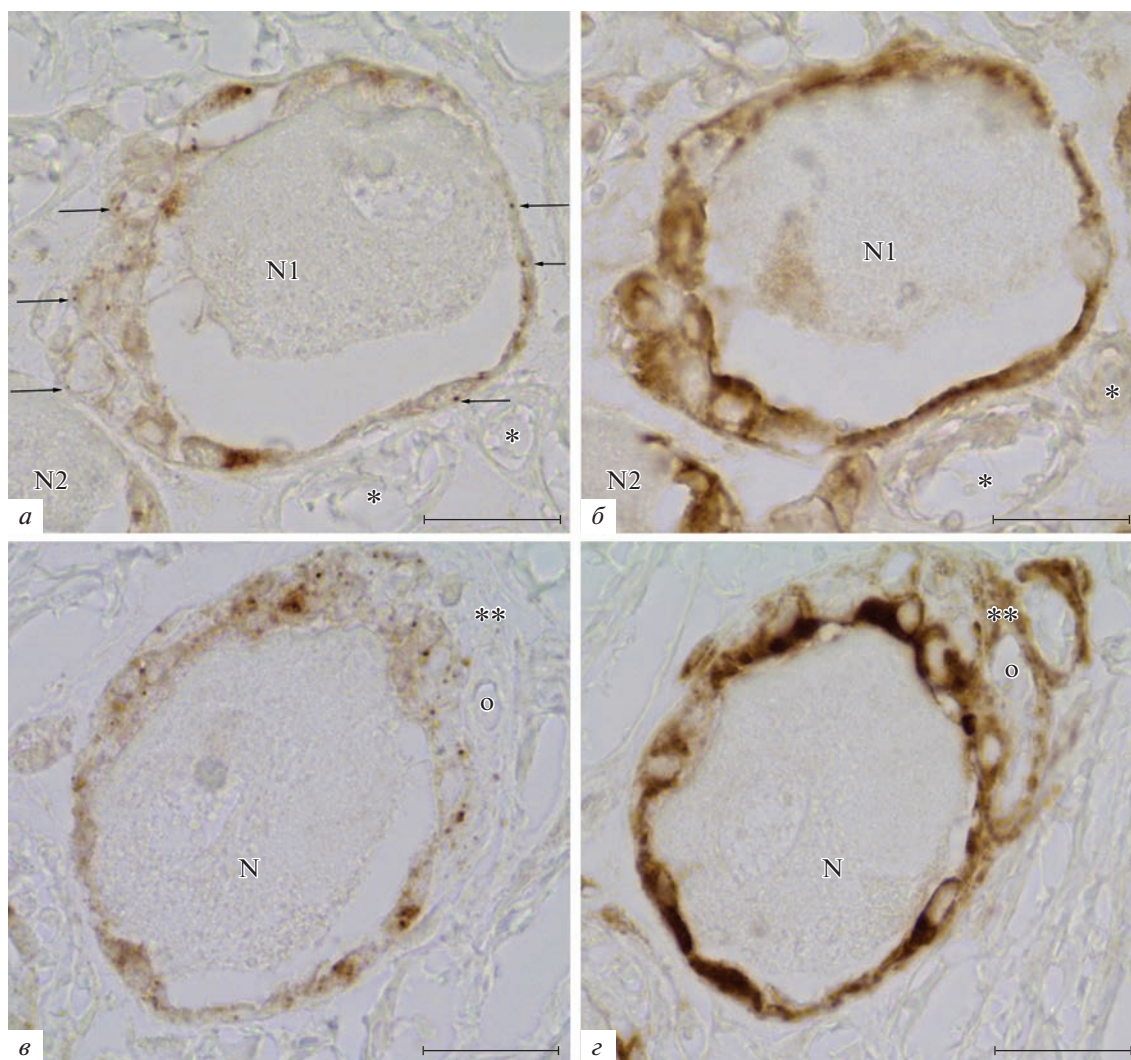


Рис. 3. Совместная иммуногистохимическая локализация коннексина-43 (а, в) и глутаминсинтетазы (б, г) в глиальной оболочке чувствительного нейрона крысы в возрасте 18 мес на последовательных срезах. * – топографические маркеры, указывающие на кровеносные капилляры на рис. а и б. О – топографические маркеры, указывающие на отросток чувствительного нейрона на рис. в и г. ** – область локализации сателлитных глиальных клеток, не экспрессирующих коннексин-43. N, N1 и N2 – чувствительные нейроны. Стрелки – коннексин-43-иммунопозитивные точки в сателлитных глиальных клетках. Иммуногистохимическая реакция на коннексин-43 (а, в) и глутаминсинтазу (б, г). Масштабный отрезок – 20 мкм.

DRG щелевые контакты присутствуют лишь между соседними сателлитными глиальными клетками в оболочке, окружающей один нейрон. Щелевые контакты между соседними глиальными оболочками отсутствуют (Huang et al., 2006; Pannese, 2010). Однако взаимодействия между соседними нейронами в пределах одного ганглия в определенных условиях все же существуют, вероятно, за счет формирования новых щелевых каналов между глиальными клетками соседних нейронов (Hanani et al., 2002; Pannese et al., 2003; Huang et al., 2010; Pannese, 2010), а также формирования гемиканалов на цитоплазматической мембране сенсорных нейронов (Retamal et al., 2017). В настоящем исследовании мы не обнаружили присутствия коннексина-43 и кластеров коннексин-43-

содержащих каналов на поверхности чувствительных нейронов ни у молодых, ни у стареющих животных.

При патологических процессах в ПНС изменяется степень межглиальной коммуникации в пределах сателлитной оболочки каждого нейрона, что было показано в исследованиях повреждения периферического нерва, системного и локального воспаления, хронической боли. Показано, что экспериментально индуцированные болевые состояния и перерезка нерва приводят к увеличению экспрессии Сх-43 в сателлитной глии, а ингибитор щелевых контактов вызывает обезболивание при различных моделях боли (Lin et al., 2002; Hanani et al., 2002; Pannese et al., 2003; Dublin, Hanani, 2007; Wu et al., 2012; Hanani, 2015; Schmitt et al., 2020). Характер изменений нейрон-глиальных и межглиальных взаимодействий в

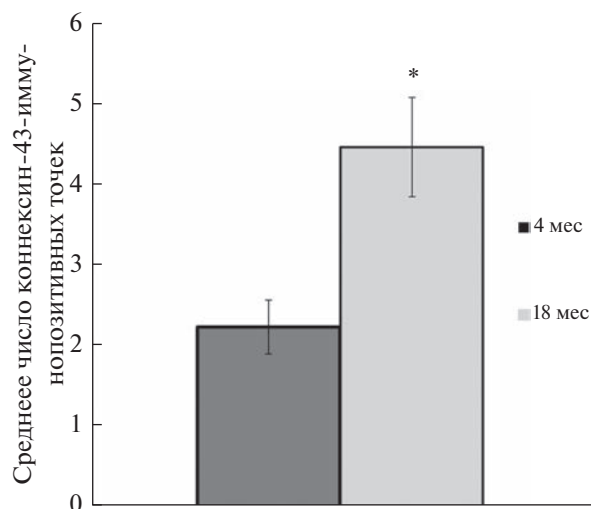


Рис. 4. Изменение среднего числа коннексин-43-иммунопозитивных точек в пределах глиальных оболочек чувствительных нейронов молодых (4 мес) и стареющих крыс (18 мес). * $p < 0.05$

DRG при старении изучен фрагментарно. Ряд исследований, выполненных на мышах, показывает, что при старении усиливается распространение флуоресцентного красителя между сателлитными глиальными клетками в пределах одной глиальной оболочки, кроме того, возрастает количество щелевых контактов между глиоцитами (Huang et al., 2006; Hanani et al., 2023). В исследованиях на кроликах установлена аналогичная закономерность (Martinelli et al., 2004, 2005). Однако, как отмечено ранее, методы исследования, использованные в данных работах, не позволяют определить структурные особенности вновь образованных при старении каналов и тип белков, участвующих в их формировании. При этом в литературе присутствуют данные количественной оценки реорганизации межклеточных взаимодействий при старении, согласно которым среднее количество Cx43-иммунопозитивных щелевых контактов в перинеурональных сателлитных клетках мышей значительно снижается при старении (Procacci et al., 2008).

В настоящем исследовании, проведенном на крысах, было показано, что среднее число бляшек (plaques) Cx43-содержащих каналов в пределах сателлитной оболочки чувствительного нейрона у стареющих животных в два раза превышает аналогичный показатель у молодых животных. Нами отмечено, что причиной таких количественных изменений не является возрастная глиоз в ганглии заднего корешка спинного мозга животных в возрасте 18 мес. При подсчете среднего количества клеток в глиальной оболочке каждого чувствительного нейрона нами не было отмечено значимого изменения количества сателлитных глиальных клеток при старении. Не выявлено также морфологических признаков апоптоза нейронов и нейродегенерации. Обнаружен-

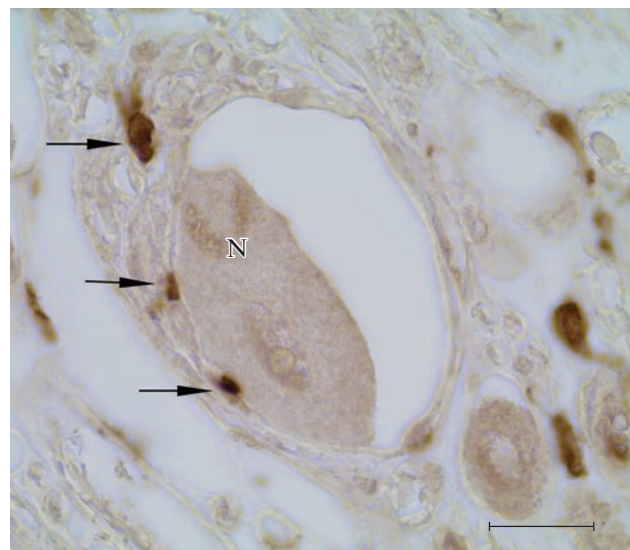


Рис. 5. Макрофаги в ганглии заднего корешка спинного мозга крысы в возрасте 18 мес. Иммуногистохимическая реакция на Iba-1. N — чувствительный нейрон. Стрелки — Iba-1-иммунопозитивные клетки, проникающие между сателлитными глиальными клетками. Масштабный отрезок — 20 мкм.

ные нами узелки Нажотта, представляющие собой области компактного расположения сателлитных глиальных клеток, занимающих область локализации дегенерировавших нейронов (Marshall, Duchon, 1975), присутствовали как у стареющих, так и у молодых животных. Бляшки (plaques) коннексин-43-содержащих каналов также присутствовали в “остаточных узелках” ганглиев задних корешков спинного мозга животных обеих возрастных групп. Однако в области многослойной глиальной оболочки чувствительных нейронов при старении отмечено значительное увеличение количества коннексин-позитивных точек, что свидетельствует о возрастной реструктуризации межклеточных контактов в пределах субъединиц DRG, вероятно, ведущей к активации связей между глиальными клетками. В сенсорных ганглиях каждый нейрон окружен отдельной сателлитной оболочкой, граничащей с соединительной тканью, содержащей капилляры, а сателлитные глиальные клетки экспрессируют белки-транспортёры различных нейроактивных молекул (Hanani, 2005; Jasmin et al., 2010). Таким образом, глиальная оболочка нейрона выполняет функции избирательного барьера между фенестрированными капиллярами ганглия и нейронами, регулирует транспорт веществ к нейронам и выполняет нейропротекторную функцию. Установленный в настоящем исследовании факт увеличения количества коннексин-43-содержащих структур между сателлитными глиальными клетками при старении может свидетельствовать об изменении функционирования барьера.

Известно, что кроме тела чувствительного нейрона сателлитные глиальные клетки также покрывают

начальную область нейрита каждой клетки. В настоящем исследовании в составе глиальных оболочек чувствительных нейронов животных двух возрастных групп были обнаружены глутаминсинтетаза-иммунопозитивные клетки, не содержащие коннексин-43. Такие клетки локализируются в области расположения нейритов чувствительных клеток, в поверхностных слоях глиальной оболочки. Таким образом, в составе сателлитной глиальной оболочки нами обнаружены клетки, не проявляющие при старении изменений межклеточных коммуникаций, опосредованных белком коннексином-43. В настоящее время выдвинуто предположение, что в составе глиальной оболочки DRG присутствует особый тип клеток — глиоциты, экспрессирующие рецептор нейротрофина р75, локализующиеся вдоль аксо дендрита и окружающие как миелинизированные, так и немиелинизированные области отростка чувствительных нейронов (Koike et al., 2019). Вопрос принадлежности данного типа глиоцитов к сателлитам или новому типу периферической глии широко обсуждается (Obata et al., 2006; Li et al., 2009; Nadeau et al., 2014; Koike et al., 2019). Установленное нами различие глиоцитов, образующих оболочку чувствительных нейронов, по типу белка, обеспечивающего межклеточные коммуникации, может внести вклад в исследование данного вопроса. Однако данный факт требует дополнительного изучения.

Следует отметить, что в пределах глиальной оболочки каждого нейрона DRG кроме сателлитных глиальных клеток могут присутствовать также макрофаги, которые по данным многочисленных исследований способны экспрессировать коннексин-43 (Rodjakovic et al., 2021). Сх43 участвует в межклеточной коммуникации макрофагов не только в физиологических условиях, но и при патологии (Rodjakovic et al., 2021). Однако в ходе настоящего исследования мы не обнаружили коннексина-43 в цитоплазме макрофагов DRG двух исследованных возрастных групп животных, а также не обнаружили формирования кластеров Сх43-содержащих каналов макрофагами глиальной оболочки чувствительных нейронов при старении. Данный факт свидетельствует о том, что такие коннексин-43-содержащие каналы формируются лишь между глиальными клетками ганглия заднего корешка спинного мозга и возрастные изменения межклеточной коммуникации, опосредованной данным белком, затрагивают лишь глиоциты чувствительного ганглия. Межклеточные коммуникации в DRG, по-видимому, важны в патогенезе ряда патологических состояний: в поддержании хронической боли, гипералгезии и патологий, связанных с системным воспалением. В связи с этим, можно предположить, что Сх43-содержащие каналы, экспрессируемые сателлитными глиальными клетками, могут стать новой фармакологической мишенью для лечения хронической боли, нередко развивающейся в пожилом возрасте.

Таким образом, данные полученные в настоящем исследовании могут указывать на динамические из-

менения межклеточных взаимодействий в ганглии заднего корешка спинного мозга крысы при старении. Установлено, что щелевые контакты, сформированные белком коннексином-43, образуют преимущественно сателлитные глиальные клетки чувствительных ганглиев животных разных возрастных групп. Бляшки (plaques) коннексин-43-содержащих белковых каналов, обеспечивающих метаболическое взаимодействие сателлитных клеток в ганглиях задних корешков спинного мозга, с возрастом становятся более многочисленными. Эти данные могут свидетельствовать об активации функциональной связи между сателлитными глиальными клетками в чувствительных узлах крыс при старении. Увеличение количества щелевых контактов с возрастом предположительно приводит к реорганизации глиального барьера в ганглиях задних корешков спинного мозга.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с животными проводили 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).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Колос: разработка плана исследования, постановка иммуногистохимических реакций, проведение анализа материала, написание текста статьи; Д.Э. Коржевский: редактирование текста статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adamczyk A. 2023. Glial–neuronal interactions in neurological disorders: Molecular mechanisms and potential points for intervention. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24. P. 6274. <https://doi.org/10.3390/ijms24076274>
- Almad A.A., Doreswamy A., Gross S.K., Richard J.P., Huo Y., Haughey N., Maragakis N.J. 2016. Connexin 43 in astrocytes contributes to motor neuron toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia*. V. 64. P. 1154. <https://doi.org/10.1002/glia.122989>
- Basu R., Das Sarma J. 2018. Connexin 43/47 channels are important for astrocyte/oligodendrocyte cross-talk in myelin-

- ation and demyelination. *J. Biosci.* V. 43. P. 1055.
<https://doi.org/10.1007/s12038-018-9811-0>
- Brocardo L., Acosta L.E., Piantanida A.P., Rela L. 2019. Beneficial and detrimental remodeling of glial connexin and pannexin functions in rodent models of nervous system diseases. *Front. Cell Neurosci.* V. 13: 491.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00491>
- Chew S.S., Johnson C.S., Green C.R., Danesh-Meyer H.V. 2010. Role of connexin 43 in central nervous system injury. *Exp. Neurol.* V. 225. P. 250.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.07.014>
- Dublin P., Hanani M. 2007. Satellite glial cells in sensory ganglia: Their possible contribution to inflammatory pain. *Brain Behav. Immun.* V. 21. P. 592.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.11.011>
- Fukuda T. 2007. Structural organization of the gap junction network in the cerebral cortex. *Neuroscientist.* V. 13. P. 199.
<https://doi.org/10.1177/1073858406296760>
- Grigorev I.P., Korzhhevskii D.E. 2018. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). *Modern Technologies in Medicine.* V. 10. № 2. P. 156.
<https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19>
- Hanani M., Huang T.Y., Cherkas P.S., Ledda M., Pannese E. 2002. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. *Neuroscience.* V. 114. P. 279.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00279-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00279-8)
- Hanani M. 2005. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* V. 48. P. 457.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.09.001>
- Hanani M., Spray D.C. 2012. Glial cells in autonomic and sensory ganglia. In: *Neuroglia*. New York, Oxford Academic, 3 edn, 122–134.
<https://doi.org/10.1093/med/9780199794591.003.0011>
- Hanani M. 2015. Role of satellite glial cells in gastrointestinal pain. *Front. Cell Neurosci.* V. 9: 412.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00412>
- Hanani M., Spray D.C. 2020. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* V. 21. P. 485.
<https://doi.org/10.1038/s41583-020-0333-z>
- Hanani M., Spray D.C., Huang T.Y. 2023. Age-related changes in neurons and satellite glial cells in mouse dorsal root ganglia. *Int. J. Mol. Sci.* V. 24: 2677.
<https://doi.org/10.3390/ijms24032677>
- Huang T.Y., Hanani M., Ledda M., De Palo S., Pannese E. 2006. Aging is associated with an increase in dye coupling and in gap junction number in satellite glial cells of murine dorsal root ganglia. *Neuroscience.* V. 137. P. 1185.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.020>
- Huang T.Y., Belzer V., Hanani M. 2010. Gap junctions in dorsal root ganglia: possible contribution to visceral pain. *Eur. J. Pain.* V. 14. P. 49.e1.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2009.02.005>
- Huang X., Su Y., Wang N., Li H., Li Z., Yin G., Chen H., Niu J., Yi C. 2021. Astroglial connexins in neurodegenerative diseases. *Front. Mol. Neurosci.* V. 14: 657514.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.657514>
- Iacobas D.A., Urban-Maldonado M., Iacobas S., Scemes E., Spray D.C. 2003. Array analysis of gene expression in connexin-43 null astrocytes. *Physiol. Genomics.* V. 15. P. 177.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00062.2003>
- Jasmin L., Vit J.P., Bhargava A., Ohara P.T. 2010. Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control? *Neuron Glia Biol.* V. 6. P. 63.
<https://doi.org/10.1017/s1740925x10000098>
- Ji R.R., Kawasaki Y., Zhuang Z.Y., Wen Y.R., Decosterd I. 2006. Possible role of spinal astrocytes in maintaining chronic pain sensitization: review of current evidence with focus on bFGF/JNK pathway. *Neuron Glia Biol.* V. 2. P. 259.
- Kettenmann H., Faissner A., Trotter J. 1996. Neuron-glia interactions in homeostasis and degeneration. In: Greger, R., Windhorst, U. (eds) *Comprehensive Human Physiology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-60946-6_27
- Kettenmann H., Hanisch U.K., Noda M., Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol. Rev.* V. 91. P. 461.
- Kim Y.S., Choi J., Yoon B.-E. 2020. Neuron-glia interactions in neurodevelopmental disorders. *Cells.* V. 9: 2176.
<https://doi.org/10.3390/cells9102176>
- Koike T., Tanaka S., Hirahara Y., Oe S., Kurokawa K., Maeda M., Suga M., Kataoka Y., Yamada H. 2019. Morphological characteristics of p75 neurotrophin receptor-positive cells define a new type of glial cell in the rat dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.* V. 527. P. 2047.
<https://doi.org/10.1002/cne.24667>
- Kolos E.A., Korzhhevskii D.E. 2018. Glutamine synthetase-containing cells of the dorsal root ganglion at different stages of rat ontogeny. *Russ. J. Dev. Biol.* V. 49. P. 179.
<https://doi.org/10.1134/S1062360418030049>
- Korzhhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Gilerovich E.G., Petrova E.S., Kirik O.V., Grigorev I.P. 2014. Advantages and disadvantages of zinc-ethanol-formaldehyde as a fixative for immunocytochemical studies and confocal laser microscopy. *Neurosci. Behav. Physiol.* V. 44. P. 542.
<https://doi.org/10.1007/s11055-014-9948-8>
- Korzhhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. 2015. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur. J. Histochem.* V. 59. P. 233.
<https://doi.org/10.4081/ejh.2015.2530>
- Li F., Li L., Song X.Y., Zhong J.H., Luo X.G., Xian C.J., Zhou X.F. 2009. Preconditioning selective ventral root injury promotes plasticity of ascending sensory neurons in the injured spinal cord of adult rats—possible roles of brain-derived neurotrophic factor, TrkB and p75 neurotrophin receptor. *Eur. J. Neurosci.* V. 30. P. 1280.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06920.x>
- Lin S.H., Lu C.Y., Muhammad R., Chou W.Y., Lin F.C., Wu P.C., Lin C.R., Yang L.C. 2002. Induction of connexin 37 expression in a rat model of neuropathic pain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* V. 99. P. 134.
- Marshall A., Duchon L.W. 1975. Sensory system involvement in infantile spinal muscular atrophy. *J. Neurol. Sci.* V. 26. P. 349.
[https://doi.org/10.1016/0022-510x\(75\)90207-5](https://doi.org/10.1016/0022-510x(75)90207-5)
- Martinelli C., Sartori P., Ledda M., Pannese E. 2004. Gap junctions between perineuronal satellite cells increase in number with age in rabbit spinal ganglia. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* V. 36. P. 17.
- Martinelli C., Sartori P., De Palo S., Ledda M., Pannese E. 2005. Increase in number of the gap junctions between satellite neuroglial cells during lifetime: an ultrastructural study in rabbit spinal ganglia from youth to extremely advanced age. *Brain Res. Bull.* V. 67. P. 19.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.05.021>
- Martinelli C., Sartori P., De Palo S., Ledda M., Pannese E. 2006. The perineuronal glial tissue of spinal ganglia. Quantitative changes in the rabbit from youth to extremely advanced

- age. *Anat. Embryol. (Berl)*. V. 211. P. 455.
<https://doi.org/10.1007/s00429-006-0097-x>
- Miyazaki I., Asanuma M. 2020. Neuron-astrocyte interactions in Parkinson's disease. *Cells*. V. 9: 2623.
<https://doi.org/10.3390/cells9122623>
- Meyer K., Kaspar B.K. 2017. Glia-neuron interactions in neurological diseases: Testing non-cell autonomy in a dish. *Brain Res.* V. 1656. P. 27.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.051>
- Nadeau J.R., Wilson-Gerwing T.D., Verge V.M. 2014. Induction of a reactive state in perineuronal satellite glial cells akin to that produced by nerve injury is linked to the level of p75NTR expression in adult sensory neurons. *Glia*. V. 62. P. 763.
<https://doi.org/10.1002/glia.22640>
- Obata K., Katsura H., Sakurai J., Kobayashi K., Yamanaka H., Dai Y., Fukuoka T., Noguchi K. 2006. Suppression of the p75 neurotrophin receptor in uninjured sensory neurons reduces neuropathic pain after nerve injury. *J. Neurosci.* V. 26. P. 11974.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.3188-06.2006>
- Ohsawa K., Imai Y., Kanazawa H., Sasaki Y., Kohsaka S. 2000. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J. Cell Sci.* V. 113. P. 3073.
<https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.3073>
- Orellana J.A., von Bernhardi R., Giaume C., Sáez J.C. 2012. Glial hemichannels and their involvement in aging and neurodegenerative diseases. *Rev. Neurosci.* V. 23. P. 163.
<https://doi.org/10.1515/revneuro-2011-0065>
- Orellana J.A., Retamal M.A., Moraga-Amaro R., Stehberg J. 2016. Role of astroglial hemichannels and pannexons in memory and neurodegenerative diseases. *Front. Integr. Neurosci.* V. 10: 26.
<https://doi.org/10.3389/fnint.2016.00026>
- Pannese E. 1981. The satellite cells of the sensory ganglia. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* V. 65. P. 1.
- Pannese E., Ledda M., Cherkas P.S., Huang T.Y., Hanani M. 2003. 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)*. V. 206. P. 337.
<https://doi.org/10.1007/s00429-002-0301-6>
- Pannese E. 2010. The structure of the perineuronal sheath of satellite glial cells (SGCs) in sensory ganglia. *Neuron Glia Biol.* V. 6. P. 3.
<https://doi.org/10.1017/S1740925X10000037>
- Pierezan F., Mansell J., Ambrus A., Hoffmann R.A. 2014. Immunohistochemical expression of ionized calcium binding adapter molecule 1 in cutaneous histiocytic proliferative, neoplastic and inflammatory disorders of dogs and cats. *J. Comp. Pathol.* V. 151. P. 347.
<https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.07.003>
- Procacci P., Magnaghi V., Pannese E. 2008. Perineuronal satellite cells in mouse spinal ganglia express the gap junction protein connexin43 throughout life with decline in old age. *Brain Res. Bull.* V. 75. P. 562.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.09.007>
- Retamal M.A., Riquelme M.A., Stehberg J., Alcayaga J. 2017. Connexin43 hemichannels in satellite glial cells, can they influence sensory neuron activity? *Front. Mol. Neurosci.* V. 10: 374.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00374>
- Rodjakovic D., Salm L., Beldi G. 2021. Function of connexin-43 in macrophages. *Int. J. Mol. Sci.* V. 22: 1412.
<https://doi.org/10.3390/ijms2203141>
- Schmitt L.-I., Leo M., Kutritz A., Kleinschnitz C., Hagenacker T. 2020. Activation and functional modulation of satellite glial cells by oxaliplatin lead to hyperexcitability of sensory neurons *in vitro*. *Mol. Cell. Neurosci.* V. 105: 103499.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103499>
- Tsuda M., Inoue K., Salter M.W. 2005. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci.* V. 28. P. 101.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.12.002>
- Wu A., Green C.R., Rupenthal I.D., Moalem-Taylor G. 2012. Role of gap junctions in chronic pain. *J. Neurosci. Res.* V. 90. P. 337.
<https://doi.org/10.1002/jnr.22764>
- Xing J., Wang H., Chen L., Wang H., Huang H., Huang J., Xu C. 2023. Blocking Cx43 alleviates neuropathic pain in rats with chronic constriction injury via the P2X4 and P38/ERK-P65 pathways. *Int. Immunopharmacol.* V. 114: 109506.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109506>

Gap Junction Protein Connexin-43 in Glial Cells of Rat Dorsal Root Ganglion

E. A. Kolos^{a,*} and D. E. Korzhevskii^a

^a*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: koloselena1984@yandex.ru

The aim of this study was to assess the dynamics of distribution and localization of the gap junction protein connexin-43 (Cx43) in rat dorsal root ganglion (DRG) cells at different stages of postnatal ontogenesis to assess the morphological signs of age-related changes in intercellular interactions. The work was performed on Wistar rats at the age of 4 months and 18 months using immunohistochemical methods. Glial cells were detected using antibodies to glutamine synthetase, macrophages – using the antibodies to calcium-binding protein Iba-1. The paper describes the features of connexin-43 distribution in the spinal ganglion of young and old rats. It has been established that connexin-43-containing structures are identified mainly in satellite glial cells of young and aging animals. Sensitive neurons, as well as DRG macrophages of both groups of animals, do not show immunoreactivity. Analysis of age-related changes in intercellular contacts in rat DRG showed that plaques of connexin-43-containing protein channels that provide metabolic interaction of satellite cells in the spinal ganglia become more numerous with age. This fact may indicate the activation of the interaction between glial cells in the DRG of rats during aging.

Keywords: aging, dorsal root ganglion, immunohistochemistry, Iba-1, connexin-43, gap junction, cell–cell communication