

Модуляція клітинного складу регенераційної невроми дексаметазоном і гранулоцитарним колонієстимулювальним фактором

О. М. Грабовий¹, Н. М. Невмержицька^{1*}, О. Б. Альохін²,
Г. Б. Костинський³, Н. В. Ритікова¹

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, ²Маріупольський державний університет, м. Київ, Україна,
³Приватний заклад вищої освіти «Міжнародний європейський університет», м. Київ, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті;
F – остаточне затвердження статті

Ключові слова:
регенерація нерва,
дексаметазон,
гранулоцитарний
колоніє-
стимулювальний
фактор.

Патологія. 2023.
Т. 20, № 2(58).
С. 118-125

*E-mail:
natalianmu@ukr.net

Мета роботи – оцінити в регенераційній невромі сідничного нерва щура зміни кінетики вмісту мезенхімальних (віментин-позитивні) та репаративних шваннівських (*GFAP*-позитивні) клітин, враховуючи активність регуляції локального гомеостазу (експресія *CD73*) за умов дії дексаметазону та гранулоцитарного колонієстимулювального фактора (GCSF).

Матеріали та методи. У регенераційній невромі в 168 щурів самців лінії Вістар імуногістохімічно виявляли віментин-, *GFAP*- та *CD73*-позитивні клітини. Здійснили кількісне оцінювання, використали методи статистичного опрацювання даних.

Результати. Регенераційна неврома сідничного нерва характеризується стереотипною кінетикою клітинного складу. Дексаметазон на початковому етапі формування регенераційної невроми (1–7 доба) призводить до зменшення в ній запальної інфільтрації та накопичення мезенхімальних віментин+клітин, виразно прискорював накопичення нейрального *GFAP*+репаративних нейролемоцитів і пригнічував експресію *CD73*. Дія гранулоцитарного колонієстимулювального фактора (1–3 доба) у регенераційній невромі призводила до незначного зменшення запальної інфільтрації, збільшення кількості кровоносних судин, що проникають до неї. За цих умов виразно зростала швидкість і кількість накопичення віментин+клітин та експресія *CD73*, а також швидкість накопичення *GFAP*+клітин. Відхилення експресії віментину, *GFAP* і *CD73* у невромі під дією речовин, що вивчали, поступово зменшувалися і через 8 тижнів дослідження істотно не відрізнялися від контрольних. При сумісній дії дексаметазон і гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор потенціювали ефекти один одного та зумовлювали тривале збереження високої експресії *CD73*. За цих умов спостерігали найвиразніше наближення будови новоутвореної ділянки нерва до будови інтактного нервового стовбура.

Висновки. Одночасна дія дексаметазону та GCSF на початкових етапах формування регенераційної невроми, на відміну від їхньої ізольованої дії, спричиняє не тільки зміни динаміки накопичення мезенхімальних і нейрального клітин, але й модифікує новоутворену ділянку нерва, наближаючи її будову до інтактної. Це супроводжується феноменом зростання реактивності нейролемоцитів на етапі проростання осевих циліндрів через регенераційну неврому.

Key words:
nerve regeneration,
dexamethasone,
granulocyte colony-
stimulating factor.

Pathologia, 2023.
20(2), 118-125

Modulation of the tissue composition of regenerative neuroma by dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor

O. M. Grabovyi, N. M. Nevmerzhytska, A. B. Alyokhin, H. B. Kostynskyi, N. V. Rytikova

Aim. To evaluate the change of the content of mesenchymal (vimentin-positive) and reparative Schwann (*GFAP*-positive) cells in the regenerative neuroma of the rat sciatic nerve, taking into account the activity of local homeostasis regulation (*CD73* expression) under the influence of dexamethasone (Dex) and granulocyte colony-stimulating factor (GCSF).

Materials and methods. Vimentin-, *GFAP*-, and *CD73*-positive cells were detected immunohistochemically in the regenerative neuroma of 168 male Wistar rats, and their presence was quantified using statistical methods.

Results. The regenerative neuroma of the sciatic nerve is characterized by a stereotypical cellular composition kinetics. Dexamethasone, during the initial stage of neuroma formation (1–7 days), led to a reduction in inflammatory infiltration and accumulation of vimentin+ mesenchymal cells. It significantly accelerated the accumulation of neural *GFAP*+ reparative Schwann cells and suppressed the expression of *CD73*. The granulocyte colony-stimulating factor (1–3 days) in the regenerative neuroma resulted in a slight reduction in inflammatory infiltration and an increase in the number of blood vessels penetrating into it. Under these conditions, the speed and quantity of vimentin+ cell accumulation and *CD73* expression noticeably increased, as well as the speed of *GFAP*+ cell accumulation. The deviations in the expression of vimentin, *GFAP*, and *CD73* in the neuroma under the administration of the mentioned substances gradually decreased and, after 8 weeks of the experiment, did not differ significantly from the control. When combined, dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor potentiated each other's effects and, in addition, led to long-term maintenance of high *CD73* expression. At the same time, the most pronounced approximation of the structure of the newly formed part of the nerve to the structure of the intact nerve trunk was observed.

Conclusions. The simultaneous action of Dex and GCSF during the initial stages of regenerative neuroma formation, in contrast to their individual actions, not only alters the dynamics of mesenchymal and neural cell accumulation but also modifies the newly formed part of the nerve, bringing its structure closer to the intact state. This phenomenon is accompanied by increased reactivity of neurolemocytes during the axial cylinder germination stage of neuroma regeneration.

Регенераційна неврома (РегН) утворюється на місці ушкодження периферичного нерва в результаті активації резидентних клітин його тканин, а також міграції з крові лейкоцитів і мезенхімальних стовбурових клітин. З-поміж клітин, що беруть участь у формуванні регенерату, розрізняють гематогенні клітини запальної інфільтрації, мезенхімальні (резидентні та нерезидентні клітини-попередники, фібробласти) та нейральні (нейролемоцити). Безпосередньо у новоутворенні зруйнованої ділянки нерва братимуть участь мезенхімальні та нейральні клітини, створюючи умови для наступного відновлення невротизації периферичного відрізка нерва. Мезенхімальний компонент невроми (молода сполучна тканина, що регенерує, з кровонесними судинами) спочатку заповнює тканинний дефект, який утворився після травми, і стає субстратом, по якому можуть мігрувати репаративні нейролемоцити [1]. Нейролемоцити формують шляхи для проростання осьових циліндрів [2]. На пізніших етапах формування сполучнотканинних волокон у невромі (особливо у разі надмірного) або при затримці міграції нейролемоцитів ці фактори стають негативними щодо проростання осьових циліндрів і відновлення функції пошкодженого нерва. Кооперативні зв'язки мезенхімальних і нейральних елементів на початку регенерації нерва з часом набувають ознак конкурентних і при дисбалансі можуть погіршити її результати. Отже, розуміння міжтканинних зв'язків під час регенерації периферичних нервів може стати підґрунтям для розроблення засобів та інструментів її менеджменту, стимуляції.

Один із факторів, що суттєво впливає на процеси запалення та наступні репарації, – дія кортикостероїдів. Їхній вплив на регенерацію нервів активно вивчали, але досі немає однозначної позиції щодо її покращення [3].

Інший клас речовин, що діють на процеси проліферації, міграції та диференціювання клітин, – фактори росту, зокрема під час регенерації периферичних нервів [4]. Серед цих факторів особливу увагу привертає гранулоцитарний колоніестимулювальний фактор (GCSF), що використовують для активації та мобілізації мезенхімальних стовбурових клітин [5]. Його застосування при пошкодженні периферичних нервів має низку позитивних ефектів [6,7].

Мета роботи

Оцінити в регенераційній невромі сідничого нерва щура зміни кінетики вмісту мезенхімальних (віментин-позитивні) та репаративних шваннівських (GFAP-позитивні) клітин, враховуючи активність регуляції локального гомеостазу (експресія CD73) за умов дії дексаметазону та гранулоцитарного колоніестимулювального фактора.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 168 щурах самцях лінії Вістар, маса тіла – 220–250 г. Тварин утримували у звичайних умовах віварію на стандартному раціоні при вільному доступі до їжі та води. Експеримент здійснили відповідно до принципів Європейської конвенції

про захист хребетних тварин, що використовуються з дослідними та іншими науковими цілями (Страсбург, 1986 р.), а також закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Одержали експертний висновок комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О. О. Богомольця № 160 від 26.09.2022 р.

Оперативне втручання виконали під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг внутрішньоочеревинно). Після видалення шерсті та обробки шкіри 5 % розчином йоду щурам виконали розріз шкіри та фасції по задній поверхні правого стегна. Тупим шляхом роз'єдали м'язи та перерізали сідничний нерв на рівні середини стегнової кістки. Рану зашили пошарово, операційне поле обробили 5 % розчином йоду.

Тварин випадково поділили на 4 групи (по 42 щура):

1 група (контроль, С) – щурам з 1 до 5 дня після операції підшкірно вводили 0,5 мл 0,9 % розчину NaCl;

2 група (Dex) – у ті самі терміни підшкірно вводили дексаметазон (Dex, 10 мг/кг);

3 група (GCSF) – на 1, 2 і 3 день досліду тваринам підшкірно вводили гранулоцитарний колоніестимулювальний фактор (Граноцит® 34, Санофі-Авентіс, Франція), 50 мкг/кг;

4 група (GCSF + Dex) – на 1, 2 і 3 день досліду щурам підшкірно вводили GCSF (50 мкг/кг) та на 1–5 дні досліду вводили Dex (10 мг/кг).

Евтаназію тварин здійснили введенням овердозу тіопенталу натрію (200 мг/кг).

Фрагмент нерва з регенераційною невромом для дослідження брали через 1, 3, 7, 14, 28 і 56 днів після невротомії (по 7 тварин на кожен строк), фіксували в 10 % забуференому формаліні (рН 7.4; 40 °С, 48 годин), ущільнювали в парапласт і виготовляли зрізи завтовшки 4 мкм. Забарвлювали гематоксиліном та еозинном, виконували імуногістохімічні (ІГХ) реакції відповідно до протоколів виробників антитіл. Застосували такі первинні антитіла: мишине моноклональне антитіло до віментину (Vim, V9, MA5-11883 Thermo Fisher), розведення 1:250; мишине моноклональне антитіло до гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP, ASTRO6, MA5-12023, Thermo Fisher) розведення 1:200; кроляче поліклональне антитіло до CD73 (Ab175396; Abcam), розведення 1:200. Продукти реакції візуалізували за допомогою системи детекції на основі діамінобензидину (EnVision FLEX, Dako, Данія). Препарати досліджували та фотографували за допомогою мікроскопа Olympus B53 із цифровою фотокамерою SP180. На цифрових зображеннях 400 (300 × 225 мкм; 1224 × 920 пікселів RGB, режим освітлення – фото, стандартизована експозиція). Експресію ІГХ-маркерів визначали напівкількісним методом, використовуючи програмне забезпечення ImageJ 1.46 (Wayne Rasband, NIH, USA) для деконволюції та наступного аналізу з вимірюванням площі ІГХ-забарвлення [8]. Вимірювання здійснили в 7 тестових точках в матеріалі від кожної експериментальної тварини.

Числові дані (відповідні часові ряди) опрацювали, застосувавши стандартні статистичні методи, з обчисленням середнього арифметичного, стандартного відхилення та стандартної помилки середнього. Точ-

ний тест Колмогорова–Смирнова показав, що всі дані вимірювань не суперечать нормальному розподілу. Для оцінювання значущості міжгрупових відмінностей використали критерій Стьюдента. Відмінності між показниками вважали статистично значущими при $p < 0,05$. Зв'язки між показниками, що досліджували, оцінювали за кореляцією Пірсона; величину запізнення / випередження у часі (часові лаги) однієї змінної щодо іншої оцінювали методом крос-кореляційного аналізу [9].

Результати

Спостереження показали, що у тварин контрольної групи відновлення перерізаного нерва відбувалося за стереотипною кінетикою. У кров'янисто-фібринозні маси між відрізками нерва відбувалася інвазія клітини запальної інфільтрації, фібробластів і кровоносних судин. Поступово зменшувалася запальна інфільтрація, зростала питома кількість фібробластоподібних клітин. У молодий сполучнотканинний регенерат проникали нейроремоцити, що згодом формували бюгнерівські смужки. Також формувалися колагенові волокна, що нерівномірно розподілялися в невромі. На другому місяці після невротомії відбувалося виразне зменшення її клітинності.

На початковому етапі (1–7 доба) регенерації нерва під впливом високих доз Dex передусім спостерігали різке зменшення запальної клітинної інфільтрації. В регенераті накопичувалося менше фібробластичних елементів, затримувалася васкуляризація. Разом із тим, кількість шваннівських клітин у невромі дещо зростала. У складі регенерату формувалося менше колагенових волокон, і вони мали виразнішу повздожню орієнтацію. Тяжі нейроремоцитів, що формувалися у РегН, виглядали більш компактними та мали виразнішу тенденцію до повздожнього розташування. Зазначимо, що в невромі, починаючи з 3 доби досліді, з'являлися великі округлі або неправильної форми клітини з крупним гомогенно забарвленим ядром. Їхня кількість зростала до 7–14 доби, коли вони утворювали скупчення, після чого візуальна верифікація ставала складною.

Дія GCSF (1–3 доба) спричиняла у РегН незначне зменшення запальної інфільтрації, збільшення кількості кровоносних судин, що проникають до неї. Порівняно і з С, і Dex у ній зростала кількість клітин неправильної або округлої форми з округлими гомогенними ядрами та гомогенною цитоплазмою. Надалі РегН характеризувалася вищим питомим вмістом клітин і формуванням масивніших порівняно з С пучків нейроремоцитів.

Одночасне застосування Dex і GCSF призводило до різкого зниження запальної клітинної інфільтрації РегН, уповільнення накопичення в ній клітин фібробластичного ряду і зменшення об'єму утворення сполучнотканинних волокон. Разом з тим у невромі активно накопичувалися клітини округлої або неправильної форми, що на 7 і 14 добу могли утворювати скупчення. Регенерат загалом мав меншу питому щільність клітин, ніж у групі GCSF. На 28 і 56 добу в новоутвореному фрагменті нерва виявляли менше клі-

тин фібробластичного ряду, ніж у С, а нейроремоцити мали дещо менші розміри та формували пучки різної товщини. Порівняно з іншими експериментальними групами новоутворений фрагмент за будовою найбільше наближався до інтактного нерва.

ІГХ-дослідження показали: експресія маркерів, які досліджували, загалом відповідає стереотипній кінетиці процесу регенерації перерізаного нерва. Вона зростала, демонструючи надмірність і сягаючи максимуму між 14 і 28 днями досліджень. Експресію *Vim* виявляли в фібробластоподібних, відростчатих і неправильної форми клітинах. Крім того, імунореактивність до *Vim* властива великим клітинам округлої або неправильної форми з округлими гомогенними ядрами. Поліморфноядерні лейкоцити фактично *Vim*-негативні. Іноді траплялися *Vim*+ дрібні лімоцитоподібні клітини. Експресію *GFAP* виявляли частіше у порівняно великих клітинах із крупними овальними ядрами з дрібнодраглистим хроматином. *CD73* різною мірою експресувався у клітинах майже всіх морфологічних форм. Застосування Dex, GCSF та їх поєднання змінювало рівень експресії досліджених маркерів (рис. 1).

Кількісне оцінювання експресії *Vim* у клітинах РегН сідничого нерва показало, що відмінність дії препаратів виявляли насамперед за зміною швидкості накопичення цих клітин (рис. 2, Vimentin). Характер власне траєкторій показника чисельності популяції залишався майже незмінним (мав S-подібний вигляд). Аналіз подібності відповідних часових рядів, використовуючи як міру подібності кореляцію Пірсона, підтвердив це спостереження. Так, кореляція між Dex, GCSF, Dex + GCSF і контрольною кривою С становила 0,978, 0,920 та 0,987 відповідно (табл. 1). За даними, що наведені на рис. 2 (Vimentin), застосування Dex спричинило зниження темпів росту клітин *Vim*+ та їхньої фінальної кількості порівняно з С. Застосування GCSF найбільше стимулювало зростання питомої кількості цих клітин, а в групі Dex + GCSF спостерігали динаміку, що майже не відрізняється від такої у контрольній групі, хоча й на вищому рівні.

На початковому етапі формування РегН (1 і 3 доби) найбільше на накопичення у ній *GFAP*+клітин впливали Dex і Dex + GCSF, дещо менше – GCSF (порівняно з контрольною групою С) (рис. 2, GFAP). Відмінності впливу речовин, що вивчали, були особливо помітні в наступні 4 доби, коли під їхнім впливом через 7 діб досліді майже завершувалася фаза прискореного накопичення цих клітин. На відміну від цього, фаза зростання кількості *GFAP*+клітин у групі GCSF, як і в групі С, тривала значно довше (до 28 доби). Піковий рівень кількості клітин *GFAP*+ у всіх дослідних групах майже однаковий, його досягнуто в ті самі строки. Відмінності за впливом препаратів виявили й на завершальній стадії спостережень, коли зниження кількості *GFAP*+регенераторних шваннівських клітин у Dex + GCSF виявилось найменшим, а в Dex – найбільшим. Це свідчить, що головна відмінність дії препаратів, що досліджували, полягає в характері переходу популяції клітин *GFAP*+ із початкового стану на фінальний, тобто в характері динаміки (траєкторій) зростання їхнього клітинного пулу (рис. 2, GFAP).

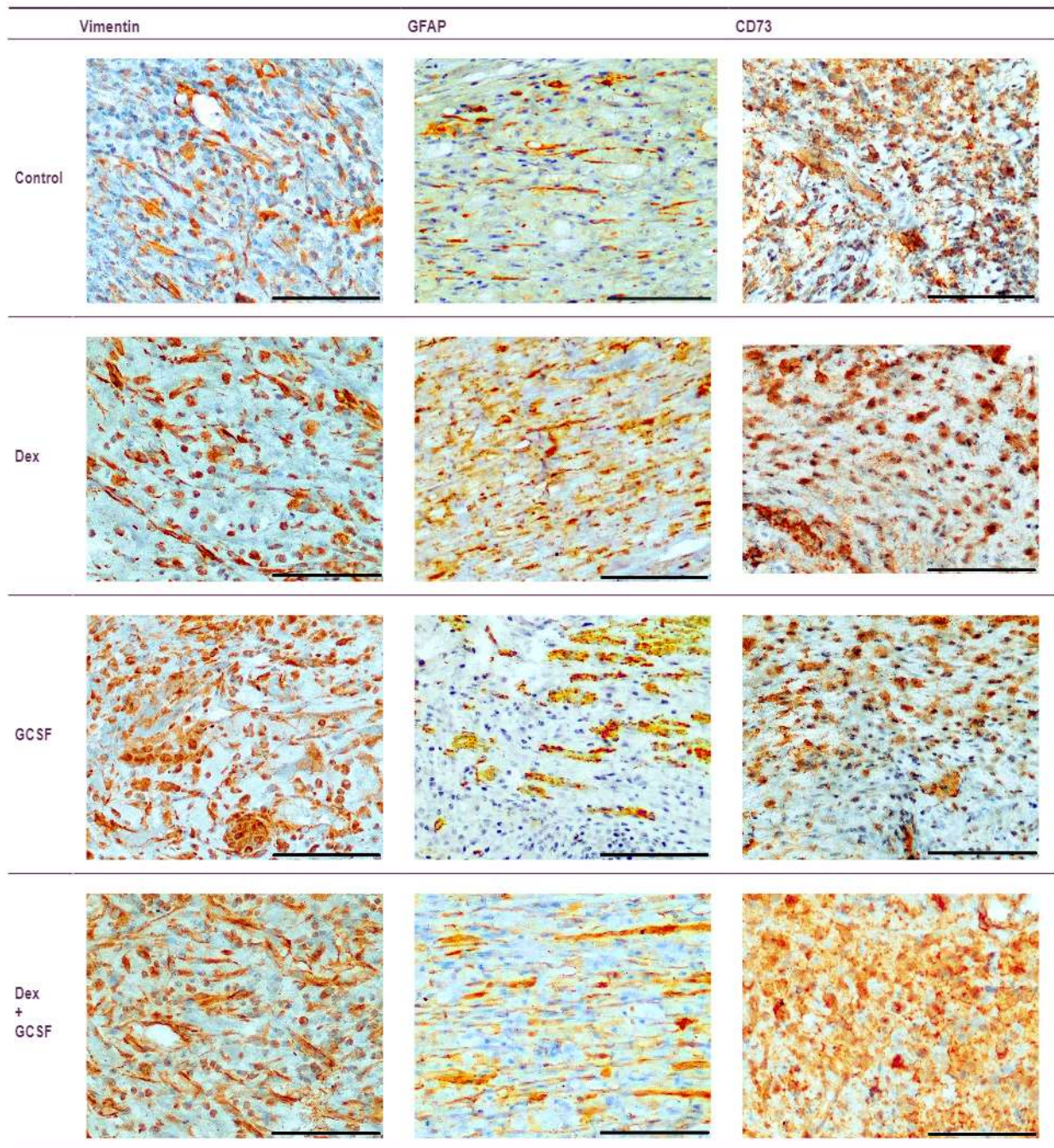


Рис. 1. Експресія *Vim*, *GFAP* і *CD73* у клітинах регенераційної невромі сідничного нерва щурів через 7 днів після нейротомії. ІГХ. Мікрофото, об. 40, ок. 10. **Control:** умовно інтактні тварини; **Dex:** тварини, що зазнали дії дексаметазону; **GCSF:** тварини, що зазнали дії гранулоцитарного колонієстимулювального фактора; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex і GCSF. Зб. $\times 400$. Шкала 100 мкм.

Таблиця 1. Матриця близькості (кореляція) часових рядів експресії *Vim*, *GFAP* і *CD73* у клітинах регенераційної невромі

Група	1-3-7-14-28-56			1-3-7			14-28-56		
	<i>Vim</i>	<i>GFAP</i>	<i>CD73</i>	<i>Vim</i>	<i>GFAP</i>	<i>CD73</i>	<i>Vim</i>	<i>GFAP</i>	<i>CD73</i>
C	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Dex	0,978	0,840	0,979	0,984	1,000	0,977	1,000	0,994	0,982
GCSF	0,920	0,915	0,988	0,990	0,948	0,995	0,998	0,708	0,995
Dex + GCSF	0,987	0,613	0,930	0,997	0,999	0,964	0,997	-0,345	-0,541

C: контрольні тварини; **Dex:** тварини, що зазнали дії дексаметазону; **GCSF:** тварини, що зазнали дії гранулоцитарного колонієстимулювального фактора; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex та GCSF; **1-3-7-14-28-56, 1-3-7, 14-28-56:** часові інтервали (доби після операції).

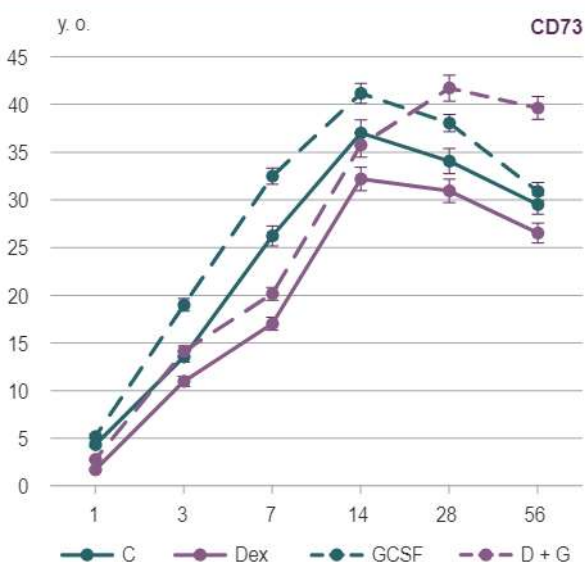
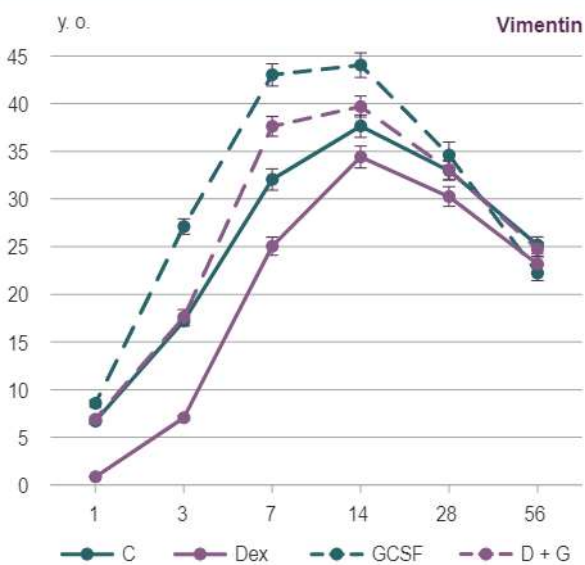


Рис. 2. Динаміка експресії *Vim*, *GFAP* і *CD73* у клітинах регенераційної невроми сідничого нерва щурів протягом 1–56 днів після нейротомії (y. o., M ± m).

C: контроль;
 Dex: тварини, що зазнали дії дексаметазону;
 GCSF: тварини, що зазнали дії гранулоцитарного колонієстимулювального фактора;
 D + G: тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

Аналіз кореляції між відповідними часовими рядами підтвердив виявлені закономірності. Так, коефіцієнт кореляції Пірсона між послідовностями C і GCSF, Dex і Dex + GCSF для траєкторій загалом становив 0,915, 0,840 і 0,613 відповідно; для початкових відрізків (1–3–7 доби) – 0,980, 1,000 та 0,999 відповідно; для кінцевих відрізків (14–28–56 доби) – 0,708, 0,994 та -0,345 відповідно (табл. 1).

Експресія *CD73* клітинами РегН загалом показала зв'язок із клітинністю, виявила типову кінетику і помірне зменшення рівня при дії Dex, збільшення – під впливом GCSF (рис. 2, *CD73*). Принципову відмінність динаміки експресії *CD73* визначили лише у групі Dex + GCSF на завершальній стадії експерименту. Коли в інших групах відбувалося зниження імунореактивності до *CD73*, у цій групі таке зниження почалося значно пізніше і відбувалося суттєво повільніше. Цей

феномен відразу позначився на показнику подібності відповідної траєкторії Dex + GCSF із C ($r = -0,541$).

Аналіз динаміки процесів, які вивчали, у межах кожної окремо взятої дослідної групи показав наявність певних часових лагів між процесами накопичення *Vim*⁺, *GFAP*⁺ клітин і рівнем експресії *CD73*, а також їхню залежність від умов експерименту (рис. 3, табл. 2).

На відміну від Dex, GCSF (рис. 3, табл. 2) активував процеси накопичення *Vim*⁺-клітин і підвищував загальний рівень експресії *CD73* (відповідні криві знаходяться помітно вище за такі в групах C і Dex), незначно впливав (порівняно з контролем) на процес накопичення *GFAP*⁺-регенераторних нейролемоцитів. Вплив GCSF на зростання числа *Vim*⁺-клітин помітно сильніший (більш крута крива) і випереджав не тільки збільшення кількості *GFAP*⁺-клітин у часі,

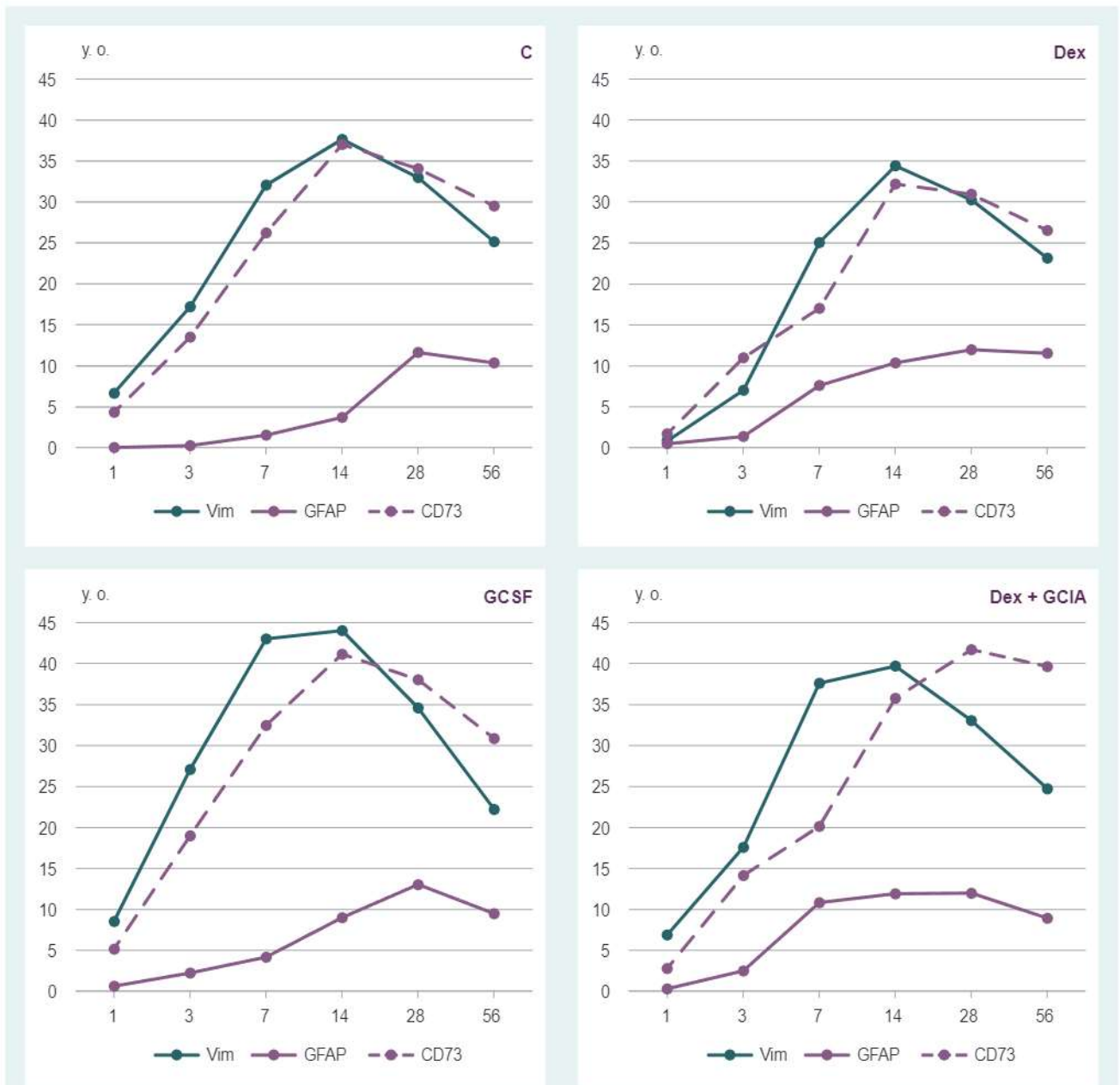


Рис. 3. Співвідношення експресії Vim, GFAP і CD73 у клітинах регенераційної невромі сидничого нерва щурів протягом 1–56 дб після нейротомії (у. о.). С: контроль; Dex: тварини, що зазнали дії дексаметазону; GCSF: тварини, що зазнали дії гранулоцитарного колонієстимулювального фактора; Dex + GCSF: тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

але і зростання експресії CD73, що, своєю чергою, випереджають перебіг процесу GFAP (рис. 3, GCSF).

Одночасне застосування Dex і GCSF (рис. 3, Dex + GCSF) спричинило комплексну реакцію. У цьому разі зберігався ефект від впливу GCSF (криві Vim і GFAP, рис. 3, Dex і GCSF), але, на відміну від інших дослідних груп, загальна експресія CD73 продовжувала зростати значно довше, а фаза її зниження істотно відтермінована й уповільнена (рис. 3, CD73, табл. 2).

Обговорення

Отже, Dex і GCSF суттєво впливають на вміст клітин мезенхімального (Vim+) та нейрального (GFAP+) пулів у PerH та їхні реактивні можливості. Розвиток PerH

після дії таких активних чинників, як Dex і GCSF на початкових етапах формування прагне повернутися до параметрів стереотипної кінетики, що притаманна С (рис. 2) [10]. Однак зміни, що відбуваються в разі їх застосування, характеризуються інертністю, спричиняючи певні зміни стану відновленого фрагмента нерва в віддалені строки після травми.

Очікувано Dex різко зменшував виразність запальної реакції, що є одним із провідних факторів ініціації репаративної регенерації. Відповідно, це призводило до уповільнення та зменшення об'єму накопичення Vim+клітин мезенхімального / фібробластичного ряду в невромі, а також утворення в ній меншого об'єму сполучнотканинних волокон. Такі дані одержали й в інших дослідженнях [11]. Особливу увагу привернула

Таблиця 2. Часові лаги (Δt) та взаємна кореляція (r) між траєкторіями показників експресії *Vim*, *GFAP* і *CD73* у клітинах регенераційної невромі

Групи Δt		Vim		GFAP		CD73	
		r	Δt	r	Δt	r	Δt
C	GFAP	1	0,774	0	1,000	1	0,811
	Vim	0	1,000	-1	0,774	0	0,960
	CD73	0	0,960	-1	0,811	0	1,000
Dex	GFAP	0	0,925	0	1,000	0	0,945
	Vim	0	1,000	0	0,925	0	0,944
	CD73	0	0,944	0	0,945	0	1,000
GCSF	GFAP	1	0,727	0	1,000	0	0,831
	Vim	0	1,000	-1	0,727	0	0,859
	CD73	0	0,859	0	0,831	0	1,000
Dex + GCSF	GFAP	0	0,953	0	1,000	0	0,849
	Vim	0	1,000	0	0,953	0	0,703
	CD73	0	0,703	0	0,849	0	1,000

C: контрольні тварини; Dex: тварини, що зазнали дії дексаметазону; GCSF: тварини, що зазнали дії гранулоцитарного колонієстимулювального фактора; Dex + GCSF: тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

поява в РегН із 3 доби досліджу *Vim*+ великих округлих або неправильної форми клітин із крупним гомогенно забарвленим ядром, що утворювали скупчення через 7 і 14 діб після невротомії. Щодо шваннівських клітин, то, незважаючи на пригнічення ініціуювального фактора запалення, спостерігали виразне зростання швидкості їх накопичення в невромі. Це збігається з результатами дослідження J. I. Lee et al. [12]: нейроремодулюючі рецептори до глюкокортикоїдів, що активують їхню проліферацію. Отже, виникає питання про те, яким чином регенераторні шваннівські клітини реагуюватимуть на Dex у період, коли їхня кількість у невромі досягає плато, а вони зазнають диференціювання.

Результати нашого дослідження (табл. 2) показали: пригнічення мезенхімальної реакції та прискорення накопичення регенераторних шваннівських клітин майже усувало відставання останніх у формуванні клітинного складу РегН.

Експресія *CD73*, який є одним із ключових регуляторів реактивності клітин внаслідок пуринергічної передачі [13], під впливом Dex знижувалася та залишалася такою до кінця спостережень. Імовірно, це пов'язано з загальним зменшенням клітинності РегН.

Дані, що одержали, свідчать: GCSF як активатор мезенхімальних стовбурових клітин [14] очікувано збільшував накопичення фібробластоподібних клітин у невромі, але не змінював його динамічний профіль (табл. 1). При цьому спостерігали певне зменшення запальної клітинної інфільтрації, що можна пов'язати з накопиченням у РегН мезенхімальних стовбурових клітин та їхніми протизапальними властивостями [14]. Разом з тим, у ній дещо зростала швидкість накопичення регенераторних нейроремодулюючих клітин (рис. 2). Це може бути пов'язано з впливом секретому мезенхімальних стовбурових клітин [14] та/або прямим впливом GCSF на нейроремодулюючі [4,6,7]. На цьому фоні спостерігали максимальну швидкість збільшення експресії *CD73*, що можна пояснити швидким зростанням клітинності РегН. Після 14 доби дослідження вона знижувалася значно повільніше, ніж у групах C і Dex. Це відрізнялося від зменшення кількості *Vim*+ клітин, але збігалось зі зростанням кількості нейроремодулюючих клітин. Припускаємо, це пов'язано з проростанням осьових циліндрів через біогенерівські стрічки [7].

Якщо загалом окреме застосування Dex і GCSF спричиняло прискорення або уповільнення накопичення у регенераті *Vim*+ мезенхімальних клітин, зумовлювало певне прискорення накопичення *GFAP*+ регенераторних шваннівських клітин та певною мірою змінювало їхнє співвідношення, то комплексне застосування цих препаратів (Dex + GCSF) змінило кінетику клітинного складу РегН. У результаті новоутворений фрагмент нерва за будовою найбільше наближався до інтактного порівняно з параметрами тварин із груп C, Dex і GCSF. Крім того, до 7 і 14 доби у регенераті накопичувалася значна кількість *Vim*+ великих округлих або неправильної форми клітин з крупним гомогенно забарвленим ядром. Імовірно, ці клітини є мезенхімальними стовбуровими клітинами, накопичення яких індуковано GCSF, а їх персистенція в регенераті зумовлена гальмуванням Dex їхнього диференціювання [15].

Крім того, результатом сумісної дії Dex + GCSF став феномен значного зростання експресії *CD73* у клітинах РегН під час її дозрівання (14–28–56 доби після невротомії, рис. 2, *CD73*, табл. 1). У цей час відбувається суттєва редукція надлишкової кількості фібробластичних елементів, диференціювання нейроремодулюючих клітин і проростання по біогенерівським смужкам осьових циліндрів [10]. Припускаємо, що за цих умов була модифікована реактивна здатність нейроремодулюючих клітин, які бурхливо відповідали на контакт з осьовими циліндрами, котрі вросли в РегН. Враховуючи, що *CD73* (5'-нуклеотидаза) – життєво важливий фермент для підтримання тканинної організації та сприяє відновлювальним процесам [13], її високу експресію можна оцінити як позитивний вплив на регенерацію нерва.

Висновки

1. Дія Dex на початкових етапах формування регенераційної невромі призводить до виразного пригнічення запальної реакції, зменшення швидкості накопичення мезенхімальних клітин і збільшення такої для регенераторних шваннівських клітин.

2. Дія GCSF на початкових етапах формування регенераційної невромі спричиняє незначне пригнічення запальної реакції, збільшення швидкості

накопичення мезенхімальних клітин і регенераторних шваннівських клітин.

3. Одночасна дія Dex і GCSF на регенераційну неврову, що формується, не тільки призводить до зміни динаміки накопичення в ній мезенхімальних і нейральних клітин, але й модифікує новоутворену ділянку нерва, наближаючи її будову до інтактної.

4. Одночасна дія Dex і GCSF на регенераційну неврову супроводжується феноменом зростання реактивності нейроремоцитів на етапі проростання через неї осьових циліндрів.

Фінансування

Дослідження виконане в рамках НДР Національного медичного університету імені О. О. Богомольця: «Вивчити особливості відновлювальних процесів у головному мозку та нервовому стовбурі при модуляції накопичення та диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин» за програмою наукових досліджень та розробок, які фінансуються з державного бюджету, № держреєстрації 0123U101051 (2023–2025).

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 31.05.2023

Після доопрацювання / Revised: 26.06.2023

Схвалено до друку / Accepted: 05.07.2023

Відомості про авторів:

Грабовий О. М., д-р мед. наук, професор, в. о. зав. каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-5705-9909

Невмерзхитська Н. М., асистент каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-5378-2267

Альохін О. Б., д-р екон. наук, професор каф. системного аналізу та інформаційних технологій, Маріупольський державний університет, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-5209-8036

Костинський Г. Б., д-р мед. наук, професор каф. медико-біологічних дисциплін, Приватний заклад вищої освіти «Міжнародний європейський університет», м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-4984-9764

Ритикова Н. В., канд. мед. наук, доцент каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-6044-0433

Information about authors:

Grabovyi O. M., MD, PhD, DSc, Professor, Acting Head of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

Nevmerzhytska N. M., Teaching Assistant of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Alyokhin, A. B., PhD, DSc, Professor of the Department of System Analysis and Information Technologies, Mariupol State University, Kyiv, Ukraine.

Kostynskiy H. B., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of Medical and Biological Disciplines, Private Higher Education Institution "International European University", Kyiv, Ukraine.

Rytikova N. V., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

References

- Suzuki, T., Kadoya, K., Endo, T., & Iwasaki, N. (2023). Molecular and regenerative characterization of repair and non-repair Schwann cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 43(5), 2165-2178. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01295-4>
- Min, Q., Parkinson, D. B., & Dun, X. P. (2021). Migrating Schwann cells direct axon regeneration within the peripheral nerve bridge. *Glia*, 69(2), 235-254. <https://doi.org/10.1002/glia.23892>
- Charoenlux, P., Utoomprurkorn, N., & Seresinkachorn, K. (2023). The efficacy of corticosteroid after facial nerve neurotomy: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trial. *Brazilian journal of otorhinolaryngology*, 89(1), 79-89. <https://doi.org/10.1016/j.bjori.2021.09.005>
- Onger, M. E., Delibaş, B., Türkmen, A. P., Erener, E., Altunkaynak, B. Z., & Kaplan, S. (2017). The role of growth factors in nerve regeneration. *Drug discoveries & therapeutics*, 10(6), 285-291. <https://doi.org/10.5582/ddt.2016.01058>
- Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos University medical journal*, 18(3), e264-e277. <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>
- Jia, H., Wang, Y., Chen, J., Li, J. P., Han, H. Q., Tong, X. J., He, Z. Y., & Ma, W. Z. (2019). Combination of BMSCs-laden acellular nerve xenografts transplantation and G-CSF administration promotes sciatic nerve regeneration. *Synapse (New York, N. Y.)*, 73(7), e22093. <https://doi.org/10.1002/syn.22093>
- Frost, H. K., Kodama, A., Ekström, P., & Dahlin, L. B. (2016). G-CSF prevents caspase 3 activation in Schwann cells after sciatic nerve transection, but does not improve nerve regeneration. *Neuroscience*, 334, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.045>
- Crowe, A. R., & Yue, W. (2019). Semi-quantitative Determination of Protein Expression using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio-protocol*, 9(24), e3465. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3465>
- (2017). Learn about time series cross-correlations in SPSS with data from the USDA feed grains database (1876-2015). In *Sage Research Methods Datasets Part 1*. SAGE Publications, Ltd. <https://doi.org/10.4135/9781473995765>
- Wang, M. L., Rivlin, M., Graham, J. G., & Beredjikian, P. K. (2019). Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. *Connective tissue research*, 60(1), 3-9. <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1489381>
- Li, Q., Li, T., Cao, X. C., Luo, D. Q., & Lian, K. J. (2016). Methylprednisolone microsphere sustained-release membrane inhibits scar formation at the site of peripheral nerve lesion. *Neural regeneration research*, 11(5), 835-841. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.182713>
- Lee, J. I., Hur, J. M., You, J., & Lee, D. H. (2020). Functional recovery with histomorphometric analysis of nerves and muscles after combination treatment with erythropoietin and dexamethasone in acute peripheral nerve injury. *PLoS one*, 15(9), e0238208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238208>
- Minor, M., Alcedo, K. P., Battaglia, R. A., & Snider, N. T. (2019). Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73). *American journal of physiology. Cell physiology*, 317(6), C1079-C1092. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00285.2019>
- Grabovyi, O. M., Nevmerzhytska, N. M., Yaremenko, L. M., Kostynskiy, H. B., Demydchuk, A. S., Kondaurova, H. Yu. (2023). Mезенхімальні стовбурові клітини: різноманітність [Mesenchymal stem cells: diversity]. *Pathologia*, 20(1), 76-84. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2023.1.272938>
- Han, L., Wang, B., Wang, R., Gong, S., Chen, G., & Xu, W. (2019). The shift in the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells mediated by glucocorticoid receptor. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 377. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1498-0>