

# Дексаметазон і гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор змінюють представництво клітинних патернів і невротизацію регенераційної невроми

О. М. Грабовий<sup>1</sup>, Н. М. Невмержицька<sup>1\*</sup>, О. Б. Альохін<sup>2</sup>,  
Г. Б. Костинський<sup>3</sup>, Г. Ю. Кондаурова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, <sup>2</sup>Маріупольський державний університет, м. Київ, Україна, <sup>3</sup>Приватний 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, № 3(59).  
С. 222-230

\*E-mail:  
natalianmu@ukr.net

**Мета роботи** – оцінити зміни загальної клітинності (*Nuc*) регенераційної невроми (RegN) сідничного нерва щурів і представництва в ній *CD90*, *CD44*, *CD146*, *CD133* позитивних клітин, а також її невротизацію за умов дії дексаметазону (Dex) та гранулоцитарного колонієстимулювального фактора (GCSF).

**Матеріали та методи.** За умов дії дексаметазону та гранулоцитарного колонієстимулювального фактора у 168 щурів-самців лінії Вістар у регенераційній невромі імуногістохімічно виявляли *CD90*, *CD44*, *CD146* і *CD133* позитивні клітини, визначали її загальну клітинність і невротизацію. Виконали статистичне опрацювання результатів, що одержали.

**Результати.** Виявили, що дексаметазон і гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор змінюють представництво клітинних патернів і невротизацію регенераційної невроми.

**Висновки.** Обсяг невротизації регенераційної невроми безпосередньо залежить від питомої кількості шваннівських клітин у її складі. Dex і GCSF, незважаючи на різні механізми дії, призводять до зростання вмісту нейролемоцитів у RegN. GCSF призводить до збільшення у складі RegN кількості мезенхімальних клітин, які експресують маркери, що є прямим (*CD90/Thy1*) і додатковими (*CD44*, *CD146* і *CD133*) критеріями стовбуровості. При невеликому діастазі між кінцями перетнутого нерва помірне зменшення або збільшення кількості клітин мезенхімального ряду не впливає на невротизацію невроми. Dex затримує диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин, що мігрували в невромі; це призводить до їх персистенції. GCSF сприяє накопиченню мезенхімальних стовбурових клітин у RegN. Дія Dex або GCSF результується підвищенням функціональної активності клітин мезенхімального ряду та нейролемоцитів у складі RegN. Dex і GCSF потенціюють ефекти один одного, що спричиняє значне збільшення об'єму невротизації RegN.

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

Pathologia, 2023.  
20(3), 222-230

## Dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor alter the representation of cellular patterns and neurotisation of regenerative neuroma

O. M. Grabovyi, N. M. Nevmerzhitska, O. B. Aliokhin, H. B. Kostynskyi, H. Yu. Kondaurova

**Aim.** To evaluate the changes in the total cellularity (*Nuc*) of the rat sciatic nerve regenerative neuroma (RegN) and its representation of CD90, CD44, CD146, and CD133 positive cells, as well as its neurotization under the conditions of dexamethasone (Dex) and granulocyte colony-stimulating factor (GCSF).

**Materials and methods.** After injections of dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor in the regenerative neuroma of 168 male Wistar rats, CD90, CD44, CD146 and CD133 positive cells were detected immunohistochemically in the regenerative neuroma. Its total cellularity and neurotization were determined and statistical processing of the obtained data was performed.

**Results.** It was found that dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor change the representation of cellular patterns and neurotization of regenerative neuroma.

**Conclusions.** The amount of neurotization of the regeneration neuroma directly depends on the specific amount of Schwann cells in its composition. Dex and GCSF, despite different mechanisms of action, lead to an increase in the content of neuroleumocytes in RegN.

Ціллю регенерації пошкодженого периферичного нерва є відновлення невротизації його периферичної частини внаслідок росту відростків нейронів. Це можливо, якщо є відповідне тканинне середовище. У разі повного перетину таке середовище має утворитися *de novo* між відрізками пошкодженого нерва. Обов'язкова умова для проростання нервових волокон – на-

явність шваннівських клітин [1]. Зауважимо, що для їхньої життєдіяльності необхідне сполучнотканинне середовище з кровоносними мікросудинами [2]. Це середовище є дуже гетерогенним за клітинним складом, а також зазнає динамічних змін під час регенерації нерва [3]. Відповідно, можна припустити, що клітини мезенхімального походження різного імунофенотипу

будуть по-різному впливати на регенерацію нервових волокон, й окремі прояви таких впливів можна оцінити, змінюючи клітинний склад регенераційної неврони (PerN) [4].

У цьому контексті кортикостероїди можуть бути дослідницьким інструментом [4], що має суттєво змінювати клітинні реакції при перебігу репаративних процесів [5]. Втім, вони мають неоднозначні ефекти щодо регенерації нервів [6]. Інші агенти, що діють на процеси проліферації, міграції та диференціювання клітин мезенхімального ряду, – фактори росту, які привертають до себе увагу при впливі на регенерацію периферичних нервів [7,8]. Гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор (GCSF) серед них потребує особливої уваги, оскільки активує та мобілізує мезенхімальні стовбурові клітини [9]. Його застосування при пошкодженні периферичних нервів спричиняє низку позитивних ефектів щодо їх відновлення [10,11].

## Мета роботи

Оцінити зміни загальної клітинності регенераційної неврони сідничного нерва щурів і представництва в ній *CD90*, *CD44*, *CD146*, *CD133* позитивних клітин, а також її невротизацію за умов дії дексаметазону та гранулоцитарного колонієстимулювального фактора.

## Матеріали і методи дослідження

Дослідження здійснили на 168 щурах-самцях лінії Вістар масою 220–250 г, яких 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 для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), та 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 від 23.12.2019 № 128.

Оперативне втручання виконали під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг внутрішньоочеревинно). На правому стегні щурів видалили шерсть, обробили шкіру 5 % розчином йоду та зробили розріз шкіри по задній поверхні. Тупим шляхом роз'єдали м'язи, перерізували сідничний нерв на рівні середини стегна. Рану зашили пошарово, операційне поле обробили 5 % розчином йоду.

Усіх тварин рандомізовано поділили на 4 групи (по 42 щури):

1 група (контроль, **C**) – з 1 по 5 день після операції підшкірно тваринам вводили 0,5 мл 0,9 % розчину NaCl;

2 група (**Dex**) – у ці самі строки підшкірно вводили дексаметазон (Dex, 10 мг/кг);

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

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

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

Фрагмент нерва з регенераційною невромою для дослідження забирали через 1, 3, 7, 14, 28 і 56 діб після невротомії (по 7 тварин на кожен строк), фіксували в 10 % формаліні (рН 7,4; 40 °С, 48 годин), ущільнювали в парапласт і виготовляли зрізи завтовшки 4 мкм і 10 мкм. Для виявлення осьових циліндрів зрізи завтовшки 10 мкм депарафінували й імпрегнували сріблом, надалі обробляли хлорним золотом. Питому довжину нервових волокон, що регенерували, у PerN визначали за методом лінійного інтегрування [12].

Зрізи завтовшки 4 мкм забарвлювали гематоксином та еозином, а також виконали імуногістохімічні (ІГХ) реакції відповідно до протоколів виробників антитіл. Використали такі первинні антитіла: мишає моноклональне до *CD90/Thy1* (MRC OX-7, Abcam, UK), розведення 1:200; мишає моноклональне до *CD44* (OX49, Abcam, UK), розведення 1:500; кроляче поліклональне до *CD146* (Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen)), розведення 1:400; кроляче поліклональне до *CD133* (Thermo Fisher Scientific Inc. (Invitrogen)), розведення 1:250. Продукти реакції візуалізували за допомогою системи детекції на основі діамінобензидину (EnVision FLEX, Dako, Данія).

Отримані препарати досліджували та фотографували за допомогою мікроскопа Olympus B53 з цифровою фотокамерою SP180. На цифрових зображеннях ×400 (300 × 225 мкм; 1224 × 920 пікселів RGB, режим освітлення – фото, стандартизована експозиція) визначали експресію ІГХ-маркерів, які досліджували, напівкількісним методом із використанням програмного забезпечення ImageJ 1.46 (Wayne Rasband, NIH, USA) для проведення деконволюції [13]. Вимірювання здійснили в 7 тестових точках у матеріалі від кожної експериментальної тварини.

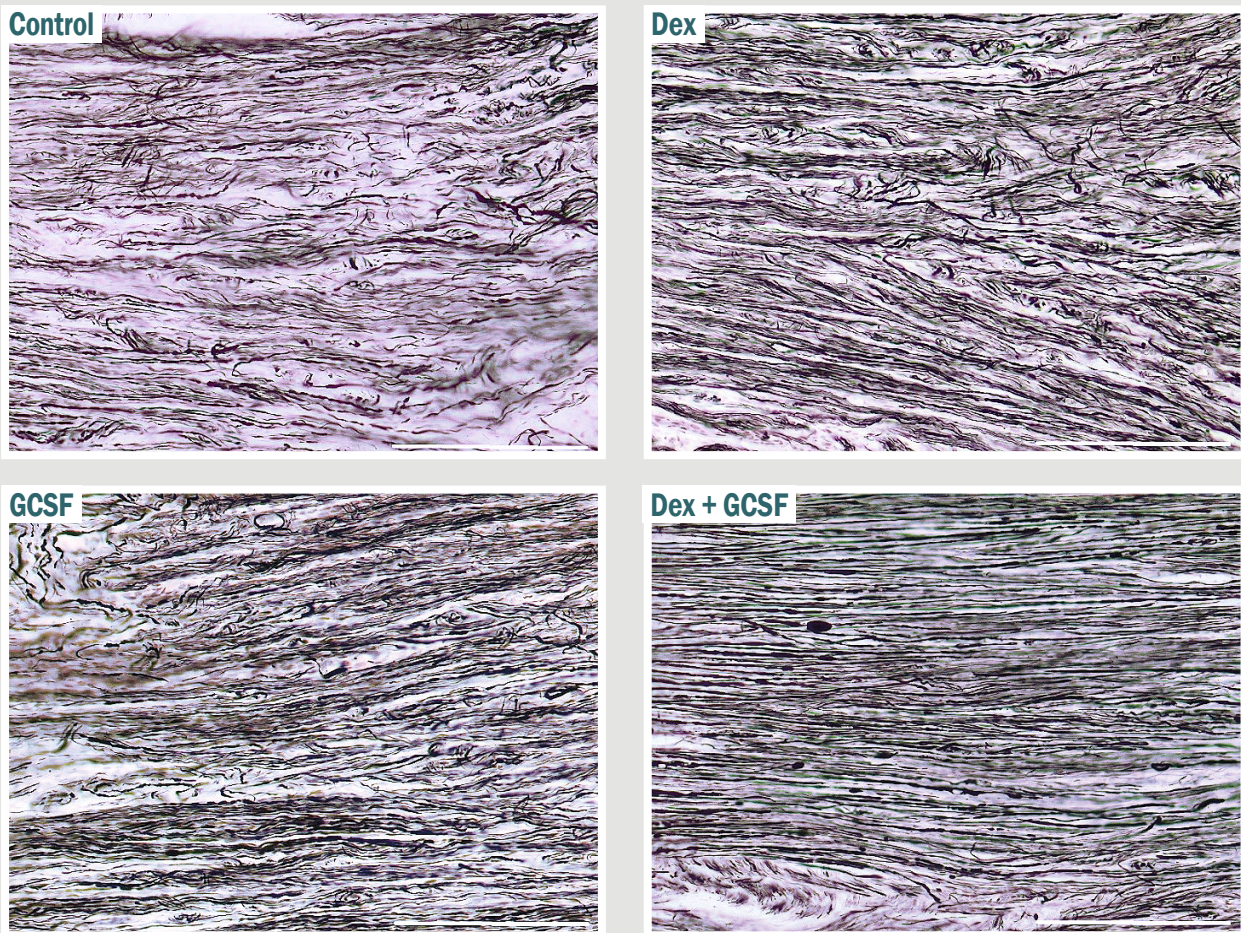
Числові дані (часові ряди) опрацювали з використанням стандартних статистичних методів, обчислили середнє арифметичне значення, стандартне відхилення та стандартну помилку середнього. Точний тест Колмогорова–Смирнова показав, що всі показники відповідають закону нормального розподілу. Для оцінювання значущості міжгрупових відмінностей використали критерій Стюдента. Відмінності між показниками вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

Під час аналізу загальної подібності отриманих часових рядів як міру подібності використали кореляцію Пірсона. Поглиблений порівняльний аналіз динамічних рядів здійснили шляхом аналітичного вирівнювання часових рядів за допомогою логістичної кривої (формула (1)),

$$f(t) = \frac{L}{1 + e^{-k(t-t_0)}}, \quad (1)$$

де  $L$  – максимально можливе значення функції  $f(t)$ ;  $k$  – швидкість росту (кількість клітин);  $t$ ,  $t_0$  – час і величина зміщення кривої вздовж осі абсцис щодо початку координат, лінійного регресійного аналізу зв'язків між спостережуваними змінними та змістовної інтерпретації їхніх параметрів.





**Рис. 1.** Осьові циліндри у складі регенераційної невромі сідничного нерва щура через 56 днів після нейротомії. Імпрегнація азотнокислим сріблом, хлорне золото. **Control:** умовно інтактні тварини; **Dex:** тварини, що зазнали дії Dex; **GCSF:** тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex і GCSF. 36. ×400.

## Результати

У тварин групи контролю регенерація перетнутого сідничного нерва відбувалася за стереотипною кінетикою. У дефект між відрізками нерва, заповнений фібринозно-кров'янистим згустком, проникали лейкоцити, фібробласти та тонкостінні кровоносні судини. З часом у регенераційній невромі, що формувалася, зменшувалася інфільтрація лейкоцитами, збільшувався вміст клітин фібробластичного ряду, починали накопичуватися шваннівські клітини. Саме вони пізніше формували бюгнеровські смужки.

Разом з тим, виявляли пучки (як правило, тонкі) колагенових волокон, що були нерівномірно розподілені в регенераті. Загальна щільність клітин у регенераті зростала протягом перших двох – чотирьох тижнів після невротомії, а потім відбувалося виразне зменшення клітинності новоутвореної ділянки нерва. Через 56 днів спостереження в регенераційній невромі виявляли чимало осьових циліндрів, більшість із них спрямовані в периферичний відрізок нерва (рис. 1, **Control**).

Дія Dex на регенерацію нерва (1–7 доба) призводила до різкого зменшення клітинної запальної інфільтрації, уповільнення, зменшення накопичення фібробластів, а також її васкуляризації. На цьому фоні дещо зростала швидкість накопичення в невро-

мі нейролемоцитів. Спостерігали зменшення обсягу утворення сполучнотканинних волокон і формування масивніших бюгнеровських стрічок. Під впливом Dex РегН загалом мала меншу клітинність, ніж у контролі. Але в ній, на відміну від контролю, з'являлися великі клітини з великим гомогенним округлим ядром. На 7 і 14 добу після невротомії вони подекуди формували скупчення. Як і в контролі, за умов впливу Dex через 56 днів після початку експерименту в новоутвореній ділянці нерва виявляли багато нервових волокон (рис. 1, **Dex**).

GCSF (1–3 доби) призводив до певного зменшення клітинної запальної інфільтрації РегН, прискорення та посилення мікроангіогенезу. Порівняно з групою **Dex**, у ній зростала кількість клітин неправильної / округлої форми з округлими гомогенними ядрами, але вони зазвичай мали менші розміри. Загалом РегН характеризувалася вищою клітинністю та формуванням масивніших пучків нейролемоцитів. Через 56 днів після початку дослідження в РегН виявили чимало новоутворених нервових волокон (рис. 1, **GCSF**).

При одночасній дії Dex і GCSF спостерігали різке зменшення явищ запалення, уповільнення та зменшення у РегН обсягів накопичення фібробластів і колагеногенезу. Виявили, що регенерат в інтервалі



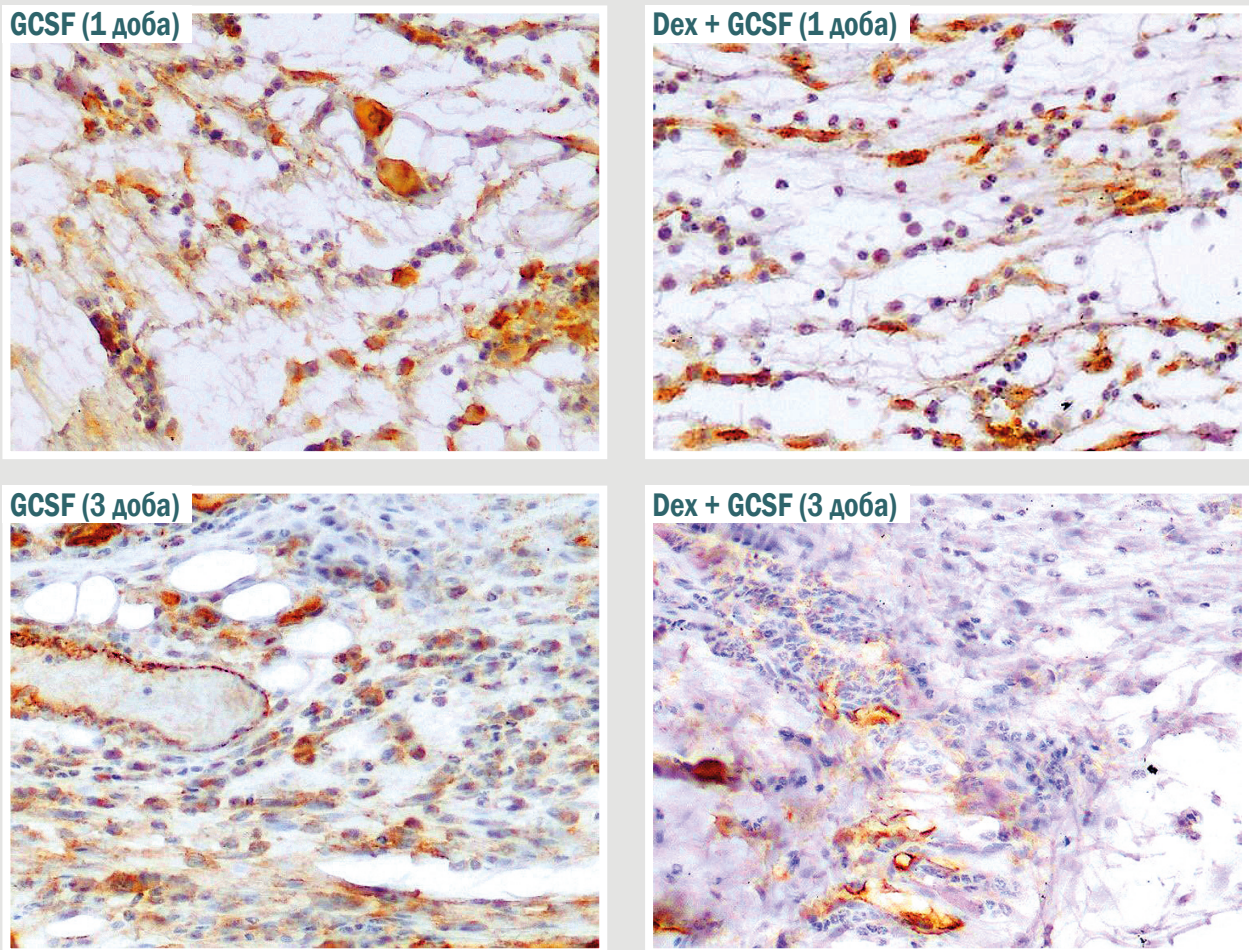


Рис. 2. Експресія *CD90* у клітинах регенераційної невромі сідничного нерва щура через 1 і 3 доби після нейротомії. ІГХ. Мікрофото, об. 40, ок. 10. **GCSF**: тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF**: тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

1–7–14–(28) днів досліджу мав меншу клітинність, ніж у контролі. Разом із тим, у ньому накопичувалися клітини неправильної / округлої форми, що на 7 і 14 доби могли утворювати скупчення. Нейролемоцити накопичувалися у невромі швидше, ніж у контролі, мали менші розміри та формували компактні пучки. Порівняно з іншими дослідними групами щурів, будова новоутвореного фрагмента найбільш подібна до такої в інтактного нерва. Наприкінці спостережень у РегН виявляли нервові волокна, щільність сітки яких візуально сприймалася як більша, ніж у контролі (рис. 1, **Dex + GCSF**).

ІГХ-дослідження дали змогу оцінити участь у регенерації нерва окремих патернів клітин, передусім мезенхімальних.

Так, експресію *CD90* виявили в поодиноких клітинах РегН тільки у групах **GCSF**, **Dex + GCSF** і лише через 1 і 3 (в меншій кількості) доби після невротомії. Зауважимо, що Dex зменшував імунореактивність до *CD90*, яку потенціював GCSF (рис. 2).

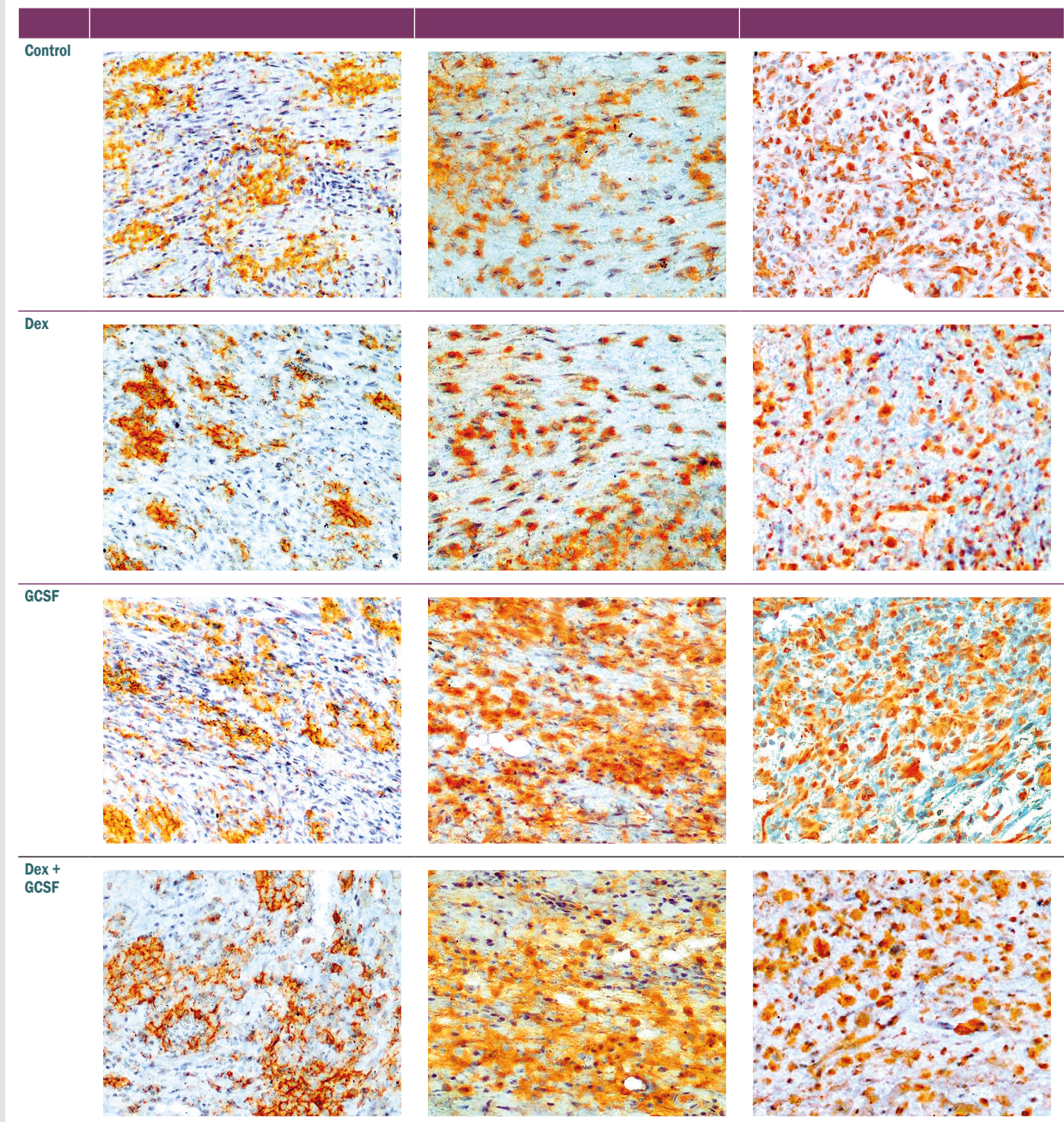
Більшість клітин мезенхімального типу в РегН, що формувалася, мали низьку або середню цитоплазматичну експресію *CD44*. На ранніх етапах (1 і 3 доби) іноді виявляли клітини лімфоїдної морфології з високою мембранною експресією цього маркера. Застосування

антитіла проти *CD44* у більшому розведенні (1:500) дало змогу підвищити чіткість візуалізації патерну клітин із середньою і високою імунореактивністю до *CD44*. Клітини, що морфологічно верифікували як шваннівські, не мали переконливих ознак експресії *CD44*. Під впливом Dex частина клітин показала високий рівень цитоплазматичної та мембранної експресії *CD44*. Часто такі клітини мали великі розміри та велике округле ядро. Через 7 і 14 днів після невротомії вони могли формувати скупчення. GCSF призводив також до збільшення кількості *CD44*+-клітин із цитоплазматичною експресією в термін 1–7 діб досліджу. У групі **Dex + GCSF** спостерігали збільшення кількості клітин із високою експресією *CD44*+, їх виявляли й на 14 добу після невротомії. Чимала частка таких клітин мала доволі великі розміри, неправильну / округлу форму та велике гомогенне ядро.

Експресія *CD146* у невромі пов'язана і з мезенхімоподібними клітинами, і з нейролемоцитами, а її динаміка збігалася з загальною клітинністю регенерату.

Патерн *CD133*+клітин у РегН протягом усього періоду спостережень за обсягом конкурував із *CD44*+, але за рівнем експресії суттєво переважав (рис. 3). Загалом експресія цього маркера пов'язана з поліморфними клітинами мезенхімального ряду. Часто



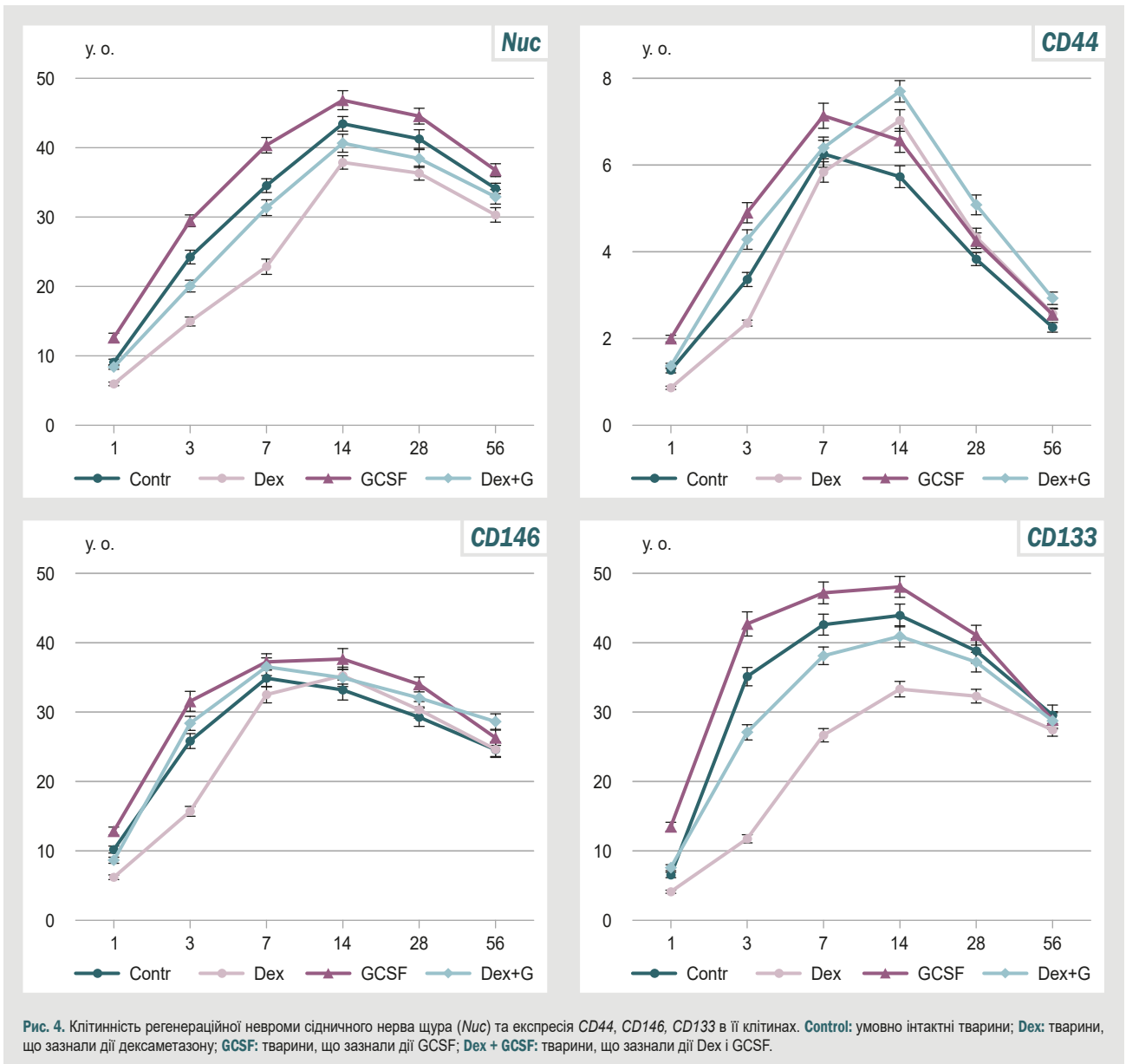


**Рис. 3.** Експресія *CD44*, *CD146* і *CD133* у клітинах регенераційної невроми сідничного нерва щура через 7 днів після невротомії. ІГХ. Мікрофото, об. 40, ок. 10. **Control:** умовно інтактні тварини; **Dex:** тварини, що зазнали дії Dex; **GCSF:** тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

вони комплексувалися з кровоносними мікросудинами. Клітини, які морфологічно верифікували як шваннівські, не мали переконливих ознак експресії *CD133*.

Виконання деконволюції на цифрових фотографіях зрізів з ІГХ-реакціями дало змогу здійснити порівняльну кількісну характеристику питомої щільності ядер клітин у РегН, що є еквівалентом їхньої кількості (рис. 4). Динаміка показника загальної клітинності (*Nuc*) у всіх експериментальних групах характеризувалася надзвичайно високим рівнем подібності (ступінь близькості всіх кривих контролю перевищує 0,98, табл. 1). У контролі крива накопичення клітин у РегН

мала параболічну форму з максимумом (за лінією тренду) між 14 та 28 добами після невротомії. Dex змінював форму кривої, надаючи їй ознак S-подібної. Це пов'язано з істотним зменшенням швидкості накопичення клітин у регенераті протягом першого тижня досліду та зміщенням максимуму *Nuc* до 28 дня експерименту, супроводжувалося загальним зменшенням клітинності регенерату. Візуально це визначали на першому тижні досліду переважно за клітинами запальної інфільтрації, надалі – за фібробластоподібними клітинами. GCSF, не змінюючи форму кривої, фактично спричиняв збільшення клітинності регенерату протя-



гом усього періоду спостереження. При одночасній дії Dex і GCSF крива *Nuc* за формою відтворювала таку в контролі, але на нижчому рівні. Застосування GCSF не тільки максимально прискорило процес збільшення кількості клітин (значення параметра  $k$  максимальне, дорівнює 0,81, *табл. 2*), але й збільшило потенціал зростання ( $L$  також максимальне, становить 42,35). На відміну від групи **GCSF**, у групах **Dex** і **Dex + GCSF** зафіксували зворотний ефект, що зменшив обидва показники порівняно з контролем. Зауважимо, що для **Dex** це мало максимальний прояв щодо швидкості розподілу клітин – показник  $k$  знизився майже вдвічі.

Кількісний аналіз експресії *CD44* у клітинах RegH показав: найбільші зміни її динаміки викликав Dex, дещо менші – Dex + GCSF, найменші – GCSF (ступінь близькості відповідних рядів щодо контролю становить 0,942, 0,958 і 0,979 відповідно, *табл. 1*). При цьому Dex суттєво уповільнював збільшення кількості клітин ( $k = 1,03$ ,  $t_0 = 2,95$ , *табл. 2*), GCSF помітно його при-

скорював ( $k = 1,76$ ,  $t_0 = 1,25$ ), а Dex + GCSF впливав слабо ( $k = 1,20$ ,  $t_0 = 1,94$ ). У всіх експериментальних групах пікові значення показника *CD44* перевищили такий у контролі, а в разі застосування Dex без GCSF і в поєднанні з ним період зростання кількості клітин став тривалішим (*рис. 4*).

На динаміку *CD146* помітно впливав лише Dex, застосування якого призвело до уповільнення (порівняно з контролем) швидкості зростання кількості клітин на початковій стадії формування RegH (*рис. 4*). Втім, це не спричинило відхилення щодо досягнення пікових і фінальних значень порівняно з іншими групами дослідження.

Згідно з даними аналізу, ступінь близькості відповідної кривої з контрольною виявився найменшим (0,887, *табл. 1*) при дуже високому ступені близькості інших кривих (0,986 для **GCSF** і 0,989 для **Dex + GCSF**); швидкість збільшення кількості клітин у групі **Dex** найменша ( $k = 0,86$  мінімальна), а перебіг



**Таблиця 1.** Матриця близькості часових рядів клітинності (*Nuc*) регенераційної неврони та експресії *CD44*, *CD146*, *CD133* в її клітинах

Показник	Contr	Dex	GCSF	Dex + GCSF
<i>Nuc</i>	1,000	0,965	0,995	0,995
<i>CD44</i>	1,000	0,942	0,979	0,958
<i>CD146</i>	1,000	0,887	0,986	0,989
<i>CD133</i>	1,000	0,802	0,976	0,978

**Contr:** контрольна група щурів; **Dex:** тварини, що зазнали дії Dex; **GCSF:** тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex і GCSF.

**Таблиця 2.** Параметри логістичних функцій (1) як моделей часових рядів

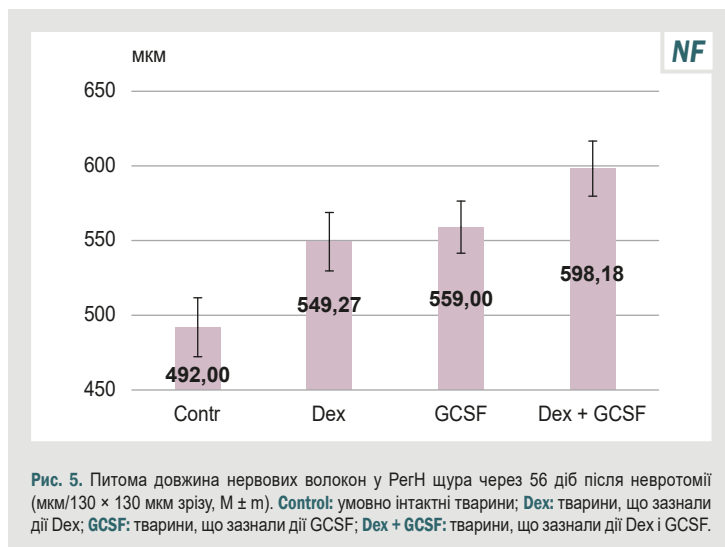
Показник	Contr			Dex			GCSF			Dex + GCSF		
	L	k	$t_0$	L	k	$t_0$	L	k	$t_0$	L	k	$t_0$
<i>Nuc</i>	38,88	0,70	2,48	34,82	0,37	4,52	42,35	0,81	2,02	37,05	0,52	3,00
<i>CD44</i>	4,51	1,11	1,91	4,95	1,03	2,98	5,13	1,76	1,25	5,52	1,20	1,94
<i>CD146</i>	15,24	1,22	1,57	15,40	0,86	2,83	16,90	1,57	1,31	16,52	1,43	1,73
<i>CD133</i>	19,36	1,94	1,82	15,48	0,61	3,88	20,79	5,22	1,14	18,13	1,22	2,10

**Contr:** контрольна група щурів; **Dex:** тварини, що зазнали дії Dex; **GCSF:** тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex і GCSF; **L:** максимально можливе значення функції  $f(t)$ ; **k:** швидкість росту (кількість клітин);  $t_0$ : час і величина зміщення кривої вздовж осі абсцис щодо початку координат.

**Таблиця 3.** Значення коефіцієнтів при незалежній змінній рівнянь регресії між показниками *CD44*, *CD146*, *CD133* і *Nuc* у різних експериментальних групах щурів

Маркери	Contr		Dex		GCSF		Dex + GCSF	
	<i>Nuc</i>	<i>CD133</i>	<i>Nuc</i>	<i>CD133</i>	<i>Nuc</i>	<i>CD133</i>	<i>Nuc</i>	<i>CD133</i>
<i>CD44</i>	0,11	0,24	0,14	0,32	0,11	0,28	0,14	0,34
<i>CD146</i>	0,31	0,63	0,39	0,90	0,34	0,69	0,36	0,81
<i>CD133</i>	0,49	–	0,46	–	0,44	–	0,47	–

**Contr:** контрольна група щурів; **Dex:** тварини, що зазнали дії Dex; **GCSF:** тварини, що зазнали дії GCSF; **Dex + GCSF:** тварини, що зазнали дії Dex та GCSF. Індикатори шапки таблиці – незалежні змінні, а ІГХ-маркери – залежні змінні.



самого процесу на стадії зростання істотно уповільнений щодо такого в інших групах ( $k = 0,86$  – мінімальна, а  $t_0 = 2,83$  – максимальний).

На динаміку кількості *CD133*+клітин значущо впливав Dex. Так, ступінь близькості відповідної кривої до контролю становила 0,802 (табл. 1), а для інших кривих – 0,976 (для **GCSF**) і 0,978 (для **Dex + GCSF**). Зазначимо, що дія цього препарату позначилася на швидкості збільшення кількості клітин ( $k = 0,61$  – мінімальна, табл. 2) і загалом уповільнила процес ( $t_0 = 3,88$  максимальний). У групі **Dex + GCSF** зберігався цей ефект, але він менш виражений ( $k = 1,22$ ,  $t_0 = 2,10$ ).

На відміну від Dex, застосування GCSF призвело до збільшення швидкості зростання кількості клітин і прискорення процесу загалом ( $k = 5,222$ ,  $t_0 = 1,14$ , табл. 2).

Робасне оцінювання зміни клітинного складу тканини під впливом досліджених препаратів за допомогою лінійних регресійних моделей і порівняння їхніх коефіцієнтів дало змогу встановити низку закономірностей щодо змін клітинного складу РегН при дії Dex та GCSF (табл. 3).

Dex збільшив (порівняно з контролем) відсоткове співвідношення клітин типу *CD44*, *CD146* з *Nuc* (з 11 % до 14 %, з 31 % до 39 % відповідно, табл. 3) і дещо знизив частку клітин *CD133* (з 49 % до 46 %). Змінилося відсоткове співвідношення клітин перших двох типів до *CD133* (з 24 % до 32 % – для *CD44*, з 61 % до 90 % – для *CD146*).

GCSF не вплинув на пропорції між *CD44* і *Nuc* (11 % у цій і контрольній групі), майже не вплинув на співвідношення *CD146* і *Nuc* (34 % проти 31 % у контролі), але зменшив співвідношення *CD133* і *Nuc* (з 49 % до 44 %). При цьому дещо збільшилася пропорція між *CD44*, *CD146* і *CD133* (з 24 % до 28 % – для *CD44*, з 63 % до 69 % – для *CD146*).

Спільна дія Dex і GCSF для *CD44* щодо *Nuc* зберіглася на рівні, який характерний для впливу лише Dex (14 %, це вище за контроль на 11 %). Для *CD146* цей вплив виявився проміжним за силою порівняно з Dex або GCSF (36 % проти 30 % – для Dex, 34 % – GCSF, але вище за контроль у 31 %). Для *CD133* за силою впливу перевищено дію Dex і GCSF окремо (47 % при спільному застосуванні препаратів, 46 % – у разі використання тільки Dex, 44 % – лише GCSF;

контрольний рівень – 49 %). Співвідношення *CD44* і *CD133* при спільному застосуванні Dex і GCSF виявилося найвищим в усіх дослідних групах (34 %), дещо поступалося показнику в групі **Dex** (81 % проти 90 %).

Кількісне оцінювання невротизації новоутвореної ділянки нерва через 56 днів після невротомії показало (рис. 5): Dex і GCSF, застосовані окремо, збільшують цей показник на 11,6 % і 13,6 % відповідно. Одночасне використання засобів призводить до потенціювання ефекту, і рівень невротизації новоутвореної ділянки нерва на 21,58 % вищий, ніж у контролі.

## Обговорення

Отже, під час спостереження зафіксували феномен, який полягає в тому, що Dex і GCSF окремо, призводячи до зменшення або збільшення порівняно з контролем загальної клітинності PerH, зумовлюють зростання рівня її невротизації. Їхня одночасна дія в межах експерименту, що здійснили, спричинила певний від'ємний ефект щодо питомої кількості клітин невромі, а також до значущого збільшення в ній кількості нервових волокон, що регенерують.

Вплив GCSF призвів до появи у PerH шурів із груп **GSCF** та **Dex + GSCF** (у меншій кількості) клітин, що експресують *CD90/Thy1*; їх не виявили в групах контролю та **Dex**. Цей маркер є одним із найдостовірніших для мезенхімальних стовбурових клітин [4], а GSCF призводить до збільшення їхньої кількості у крові [9].

Dex суттєво зменшував швидкість накопичення клітин із високою експресією *CD44+*, а GCSF помітно її збільшував (табл. 2). Наголосимо, що Dex й ізольовано, і в поєднанні з GCSF призводив до появи в регенераті великих клітин із бластоподібним фенотипом, що часто мали високу імунореактивність до *CD44+*. Припускаємо, що це – мезенхімальні стовбурові клітини, а Dex гальмував їхнє диференціювання (передусім у клітини фібробластичного ряду). Якщо Dex і GCSF застосовували одночасно, другий призводив ще й до абсолютного та відносного збільшення вмісту цих клітин у PerH (табл. 2).

Dex, незважаючи на значне зниження *CD146+* на першому тижні формування PerH (рис. 4), надалі спричиняв відносне збільшення представництва таких клітин у невромі. Це можна пояснити пригніченням накопичення мезенхімальних клітин на етапі формування сполучнотканинної основи PerH [1,14], а також стимульовальним впливом на розмноження шваннівських клітин [15], що також експресують *CD146* [16]. GCSF майже не впливав на пропорції вмісту *CD146+* клітин у невромі (табл. 3). Отже, кількість нейролемоцитів зростала пропорційно *Nuc* і вмісту мезенхімальних клітин у PerH. Імовірно, при затримці диференціювання та персистенції мезенхімальних стовбурових клітин у PerH їх секретом [4] у поєднанні з дією Dex [15] відбувається збільшення питомого вмісту шваннівських клітин, а також їхньої активності.

Зменшення / збільшення кількості *CD133+*-клітин збігалось передусім з обсягом васкуляризації регенерату протягом першого тижня спостережень. Це логічно пов'язано з накопиченням мезенхімальних клітин-попередників ендотеліоцитів [17], а на етапі

дозрівання PerH є показником активності поглинання глюкози та трансферину, аутофагії, міжмембранної взаємодії та функції матриксної металопротеїнази [18].

Отже, зіставивши посилення невротизації PerH з її клітинним складом при невеликому діастазі між центральним і периферичним відрізками нерва, вважаємо, що зміна її клітинності в межах норми реакції не впливає на регенерацію. Втім, за цих умов змінюється співвідношення в її складі нейральних і мезенхімальних компонентів, а також змінюється співвідношення деяких патернів мезенхімальних клітин і їхня активність. Незважаючи на різні механізми дії та різну спрямованість змін питомого вмісту клітин у PerH, Dex і GCSF призводять до збільшення абсолютного та відносного вмісту в ній шваннівських клітин, а їх наявність є обов'язковою умовою для проростання нервових волокон.

Крім того, зміни кількості та персистенції деяких патернів мезенхімальних клітин (*CD44+*) можна оцінювати як посилення забезпечення процесу регенерації ростовими / трофічними факторами шляхом секретому [4]. На підвищення функціональної / метаболічної активності клітин невромі опосередковано вказує відносне зростання експресії *CD146* і феномен збільшення експресії *CD73* [8], що особливо виразний для шваннівських клітин при одночасній дії Dex і GCSF. Це закономірно призводить до підвищення рівня невротизації PerH.

## Висновки

1. Обсяг невротизації регенераційної невромі безпосередньо залежить від питомої кількості шваннівських клітин у її складі.
2. Dex і GCSF, незважаючи на різні механізми дії, спричиняють збільшення вмісту нейролемоцитів у PerH.
3. GCSF призводить до збільшення у складі PerH кількості мезенхімальних клітин, які експресують маркери, що є прямим (*CD90/Thy1*) і додатковими (*CD44*, *CD146* і *CD133*) критеріями стовбуровості.
4. При невеликому діастазі між кінцями перетнутого нерва помірне зменшення або збільшення кількості клітин мезенхімального ряду не впливає на невротизацію невромі.
5. Dex затримує диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин, що мігрували в невромі, спричиняючи їх персистенцію.
6. GCSF сприяє накопиченню мезенхімальних стовбурових клітин у PerH.
7. Дія Dex або GCSF результується підвищенням функціональної активності клітин мезенхімального ряду та нейролемоцитів у складі PerH.
8. Dex і GCSF потенціюють ефекти один одного, спричиняючи істотне збільшення обсягу невротизації PerH.

## 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: 22.09.2023

Після доопрацювання / Revised: 09.10.2023

Схвалено до друку / Accepted: 31.10.2023

#### 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

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

ORCID ID: 0000-0002-5378-2267

Альоxин 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. Ю., 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

Кондаурова Г. Ю., канд. мед. наук, доцент каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-3908-3881

#### Information about authors:

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

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

Alyokhin O. 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.

Kondaurova H. Yu., MD, PhD, Associate Professor of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

#### References

- 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>
- 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>
- 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>
- Grabovyi, O. M., Nevmerzhytska, N. M., Yaremenko, L. M., Kostynskiy, H. B., Demydchuk, A. S., & Kondaurova, H. Yu. (2023). Mezenkhimaini stoburovi klityny: riznomanitnist [Mesenchymal stem cells: diversity]. *Pathologia*, 20(1), 76-84. [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2023.1.272938>
- Easterling, M. R., Engbrecht, K. M., & Crespi, E. J. (2019). Endocrine regulation of epimorphic regeneration. *Endocrinology*, 160(12), 2969-2980. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00321>
- Charoenlux, P., Utoomprurkpon, N., & Seresirikachorn, 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.bjorl.2021.09.005>

bjorl.2021.09.005

- Önger, 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>
- Grabovyi, O. M., Nevmerzhytska, N. M., Alyokhin, A. B., Kostynskiy, H. B., & Rytikova, N. V. (2023). Moduliatsiia klitynnoho skladu reheneratsiinoi nevromy deksametazonom i hranolutsytarnym koloniestymuliuvalnym faktorom [Modulation of the tissue composition of regenerative neuroma by dexamethasone and granulocyte colony-stimulating factor]. *Pathologia*, 20(2), 118-125. <https://doi.org/10.14739/2310-1237.2023.2.285124>
- 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.2018.18.03.00>
- 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*, 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>
- Grabovoi, A. N. (1999). Effects of noradrenaline and propranolol on the regeneration neuroma of the rat sciatic nerve (1999). *Neurophysiology*, 31(1), 71-73. <https://doi.org/10.1007/BF02515021>
- 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>
- 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>
- 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>
- Shen, Y., Zhu, J., Liu, Q., Ding, S., Dun, X., & He, J. (2021). Up-Regulation of CD146 in Schwann Cells Following Peripheral Nerve Injury Modulates Schwann Cell Function in Regeneration. *Frontiers in cellular neuroscience*, 15, 743532. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.743532>
- Rossi, E., Poirault-Chassac, S., Bieche, I. et al. (2019). Human Endothelial Colony Forming Cells Express Intracellular CD133 that Modulates their Vasculogenic Properties. *Stem Cell Rev and Rep*, 15, 590-600. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09881-8>
- Barzegar Behrooz, A., Syahir, A., & Ahmad, S. (2019). CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *Journal of drug targeting*, 27(3), 257-269. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1479756>