

8. Сафронова Э. А., Рябова Л. В. Оценка популяционного и субпопуляционного спектра лимфоцитов у пациентов с острым коронарным синдромом // Российский иммунологический журнал. — 2022. — Т. 25. — № 3. — С. 313–320.
9. Борисова Л. В., Пушкин А. С., Ким С. В., Арутюнян А. В., Козина Л. С. Роль гематологических индексов в прогнозировании исходов у больных с острым коронарным синдромом // Лабораторная служба. — 2018. — № 7(2). — С. 49–55.
10. Шишко В. И., Карпович О. А., Виноградова Т. А., Лазаревич С. Н. Клиническое значение лимфоцитарного индекса при назначении антибактериальной терапии пациентам с пневмонией, ассоциированной с COVID-19 // Актуальные проблемы медицины: материалы науч.-практич. конф. — Гродно, 2022. — С. 286–290.
11. Сакович А. Р. Гематологические лейкоцитарные индексы при остром гнойном синусите // Медицинский журнал. — 2012. — № 4(42). — С. 88–91.
12. Блох А. И., Панюшкина И. И., Пахтусова П. О., Сергеева И. В., Левахина Л. И., Бурашниковая И. П., Анпилова Н. Г., Пеньевская Н. А., Пасечник О. А., Рудаков Н. В. Оценка уровня сероконверсии к SARS-CoV-2 у персонала медико-санитарной части // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2021. — № 20(5). — С. 32–38. — DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-5-32-38>
13. Приймак А. Б., Корпачева О. В., Таран Н. И., Золотов А. Н. Реакция системы крови в остром посттравматическом периоде ушиба сердца у крыс с различной стрессоустойчивостью // Современные проблемы науки и образования. — 2022. — № 1.
14. Ланичева А. Х., Вихарева Л. В., Семченко В. В. Лимфоцитарные индексы периферической крови у половозрелых крыс в восстановительном периоде после высококинетического повреждения мягких тканей бедра // Функциональная морфология и интегративная антропология. — 2023. — № 2. — С. 31–35.

УДК 611.832

*Петрова Е. С., Колос Е. А.*

## **ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ НА ПРОЦЕССЫ ВАЛЛЕРОВСКОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ В ДИСТАЛЬНОМ СЕГМЕНТЕ ПОВРЕЖДЕННОГО СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ**

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

---

**Аннотация.** Цель работы состояла в изучении структурных изменений, происходящих в дистальном сегменте седалищного нерва крысы в ранние сроки после травмы и введения нейрогенных и мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

**Методика работы.** Для исследования миелиновых волокон дистального сегмента седалищного нерва крысы ( $n = 15$ ), поврежденного путем наложения лигатуры (40 секунд), использовали гистохимический метод окраски миели-

на раствором люксолевого прочного синего. Для идентификации макрофагов применяли иммуногистохимическую реакцию к белку Iba-1.

Основные результаты показали, что плотность распределения макрофагов в дистальном сегменте поврежденного нерва через 7 суток после наложения лигатуры возрастает. Применение однократного субперинеурального введения мезенхимальных стволовых клеток приводит к снижению числа макрофагов в этот срок и к задержке демиелинизации поврежденных нервных волокон. В этот же срок после введения под перинеурий нерва реципиента суспензии нейральных стволовых/прогениторных клеток плотность распределения миелина в дистальном сегменте нерва не отличается у контрольных (лигатура) и подопытных (лигатура и введение НСПК) животных. Молекулярные механизмы отмеченных изменений в ранние сроки после повреждения и введения МСК требуют дальнейших исследований.

*Ключевые слова:* нерв крысы, регенерация, МСК, НСПК, люксолевый прочный синий, макрофаги, белок Iba-1, иммуногистохимия.

*Petrova E. S., Kolos E. A.*

## **EFFECT OF CELL THERAPY ON WALLERIAN DEGENERATION IN THE DISTAL SEGMENT OF DAMAGED RAT SCIATIC NERVE**

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

---

*Abstract.* The aim of the work was to study the structural changes occurring in the distal segment of the rat sciatic nerve in the early stages after trauma and transplantation of neurogenic and mesenchymal stem cells (MSK).

The methodology of the work. The histochemical method of staining myelin with Luxol Strong Blue was used to study the myelin fibers of the distal segment of the damaged (ligature, 40 s) rat sciatic nerve (n = 15). To identify macrophages, an immunohistochemical reaction to the Iba-1 protein was used.

The main results showed that the distribution density of macrophages in the distal segment of the injured nerve increased 7 days after the ligation. It was found that a single subperineural transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells leads to a decrease in the number of macrophages during this period and delays the demyelination of damaged nerve fibers. It was shown that the same period after subperineural injection of a suspension of neural stem/progenitor cells into the recipient's nerve, the density of myelin distribution in the distal segment of the nerve did not differ in control (ligature) and experimental (ligature and injection of NSPCs) animals. Further studies are required to elucidate the molecular mechanisms of the noted changes in the early stages after nerve injury and MSC administration.

*Keywords:* rat nerve, regeneration, MSCs, NSPCs, Luxol Fast Blue, macrophages, Iba-1, immunohistochemistry.

## ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых способов стимуляции восстановления периферических нервных проводников является актуальной проблемой современности [1] несмотря на то, что разработки в этом направлении ведутся много десятилетий. Механическая травма нервов нередко приводит к инвалидности. Традиционные хирургические методы соединения проксимального и дистального сегментов поврежденного нерва не всегда приводят к его полному функциональному восстановлению. Это связано с недостатком фундаментальных знаний о молекулярно-клеточных механизмах процессов дегенерации и регенерации нервных волокон, которые происходят в дистальном сегменте нерва после травмы. В начале двадцатого века А. Валлером [2] были описаны структурные изменения, происходящие в дистальном сегменте поврежденного нерва, эти изменения в дальнейшем получили название «валлеровская дегенерация» (ВД). Они включают в себя дегенерацию нервных волокон, их демиелинизацию, дедифференцировку шванновских клеток (ШК) и другие процессы [3–5]. Почти одновременно из проксимального сегмента нервного ствола на периферию начинается рост вновь регенерирующих нервных волокон, которые впоследствии подвергаются ремиелинизации. Малоизученными остаются вопросы клеточных коммуникаций в дистальном сегменте поврежденного нерва в процессе де- и регенерации [5]. В настоящей работе для изучения клеточных взаимодействий в регенерирующем нерве использовали модель субпериневральной трансплантации стволовых клеток разного происхождения.

Цель работы состояла в изучении структурных изменений, происходящих в дистальном сегменте седалищного нерва крысы в ранние сроки после травмы и введения нейрогенных и мезенхимальных стволовых клеток.

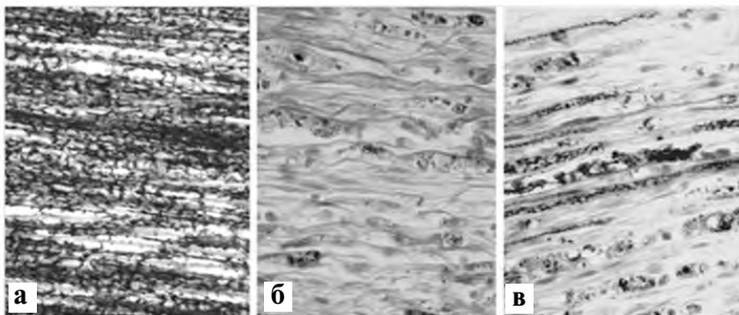
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали крыс линии Вистар-Киото массой 200–250 г ( $n = 15$ ). При работе с животными руководствовались международными правилами Европейского сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными. Исследование было одобрено этическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (протокол № 2/22 от 06.04.2022). Седалищный нерв крыс повреждали путем наложения лигатуры в течение 40 секунд. Одной части крыс субпериневрально вводили взвесь МСК костного мозга крыс, второй — взвесь нейральных стволовых/прогениторных клеток (НСПК), полученных в результате диссоциации фрагментов эмбрионального спинного мозга крысы по ранее описанному методу [6]. Каждому животному однократно были трансплантированы 50000 клеток в объеме 5 мкл среды. Контрольной группой служили животные с лигатурой и субпериневральным введением 5 мкл среды без клеток. Через 7 суток после операции фрагменты седалищного нерва в области повреждения выделяли и фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида [7]. После соответствующей гистологической обработки материал заливали в парафин. Для идентификации макрофагов использовали поликлональные козы антитела к антигену Iba-1 (AbCam, Великобритания). При выявлении комплекса антиген-антителo применяли вторичные антикозы биотинилированные антитела и стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой, из набора Anti-Goat HRP-DAB Cell

& Tissue Staining Kit (R&D Systems, США). Для изучения состояния миелиновых волокон использовали гистохимическое окрашивание срезов раствором люксолевого прочного синего (Luxol Fast Blue, LFB), позволяющее проводить количественную оценку клиренса миелина [8]. Гистологические препараты анализировали с использованием светового микроскопа и цифровой фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Измерение площади, занятой окрашенными специфическими маркерами структурами, осуществляли, используя программу ImageJ (NIH, США). Положительное окрашивание миелина выражали в процентах от общей исследованной площади. Измерения проводили на 4–5 изображениях площадью  $82365,2 \text{ мкм}^2$ , выполненных при увеличении микроскопа  $\times 400$  (для нервных волокон). Оценку плотности распределения макрофагов проводили при увеличении микроскопа  $\times 100$ . Количественные данные приведены как среднее значение в группе со стандартной ошибкой. Различия определяли по t-критерию при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используя гистохимическое окрашивание миелина раствором люксолевого прочного синего, исследовали состояние миелиновых нервных волокон на продольных гистологических срезах через дистальный сегмент поврежденного нерва. В нерве интактных крыс большинство нервных волокон являются миелиновыми и окрашиваются LFB (*рис. 1, а*). Через 7 суток после наложения лигатуры нервные волокна дистального сегмента подвергаются валлеровской дегенерации (ВД) (*рис. 1, б*). LFB-позитивными являются небольшие фрагменты распадающихся миелиновых волокон. Площадь LFB+ структур в интактном нерве составляет  $67,3 \pm 5,6\%$ , а в поврежденном нерве —  $16,3 \pm 1,5\%$  ( $p < 0,05$ ). Оказалось, что после применения субпериневрального введения суспензии МСК в дистальном сегменте поврежденного нерва сохраняется больше миелиновых волокон. Показано, что плотность распределения миелина в этот срок у подопытных животных выше, чем у контрольных (повреждение нерва без введения МСК), более чем в полтора раза ( $27,0 \pm 1,8\%$ ) ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что после применения субпериневрального введения суспензии НСПК в дистальном сегменте поврежденного нерва плотность распределения миелина достоверно не отличается от контрольной группы.



*Рис. 1.* Изменение состояния миелиновых нервных волокон в седалищном нерве крысы: а — интактный нерв; б — дистальный сегмент нерва через 7 суток после наложения лигатуры; в — дистальный сегмент нерва через 7 суток после наложения лигатуры и введения МСК.

Окраска люксолевым прочным синим. Ув. 400

Одним из наиболее важных процессов, сопровождающих ВД, является миграция в эндоневрий дистального сегмента нерва гематогенных моноцитов/макрофагов, которые участвуют в процессе фагоцитирования продуктов распада миелина. Используя макрофагальный маркер, кальций-связывающий белок Iba-1, в настоящей работе установлено, что через 7 суток после наложения лигатуры в дистальном сегменте нерва значительно увеличивается количество макрофагов (рис. 2). Заметное снижение плотности распределения популяции Iba-1+ макрофагов наблюдается в дистальном сегменте крыс, которым трансплантировали МСК. Таким образом, в подопытной группе животных, которым была произведена трансплантация МСК, в ранние сроки после наложения лигатуры, в период ВД, наблюдается снижение миграции гематогенных макрофагов в эндоневрий дистального сегмента нерва реципиента. Кроме того, наблюдается замедление процесса демиелинизации в дистальном сегменте нерва, часть тонких миелиновых волокон сохраняется, не подвергаясь ВД. Отмеченный факт подтверждает результаты японских исследователей, которые изучали влияние однократного введения МСК на поврежденный седалищный нерв и соответствующие спинномозговые ганглии крысы и установили, что клеточная терапия может способствовать сохранности миелиновых волокон в дистальном сегменте нерва после повреждения [9].

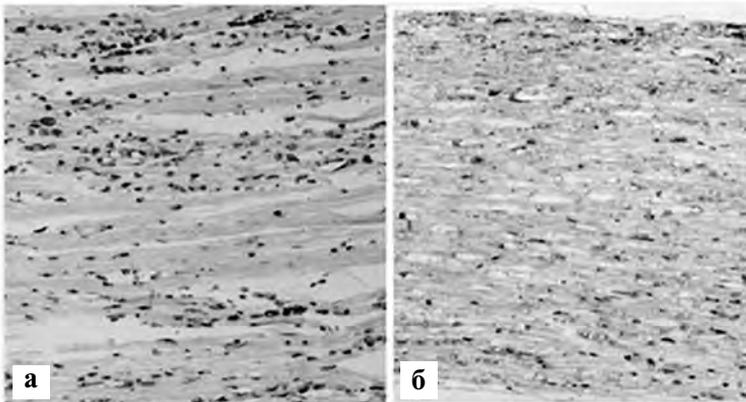


Рис. 2. Макрофаги в дистальном сегменте нерва через 7 суток после наложения лигатуры (а) и после лигатуры и трансплантации МСК (б). Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1. Ув. 100

По мнению авторов, экзогенные МСК могут влиять на демиелинизацию аксонов за счет уменьшения уровня провоспалительных цитокинов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что после однократной субпериневральной трансплантации МСК костного мозга крысы, но не стволовых клеток нейрогенного происхождения, в дистальном сегменте поврежденного нерва реципиента наблюдается задержка процесса демиелинизации поврежденных нервных волокон, а также снижение популяции мигрирующих Iba-1+ макрофагов. Механизмы отмеченных на ранних сроках после повреждения нерва изменений требуют дальнейших исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Щаницын И. Н., Иванов А. Н., Бажанов С. П. и др. Стимуляция регенерации периферического нерва: современное состояние, проблемы и перспективы // Успехи физиол. наук. 2017. Т. 48. № 3. С. 92–112.
2. Waller A. New method for the study of the nervous system. Lond. J. Med. 1852; 4(43):609–625.
3. Ноздрачев А. Д., Чумасов Е. И. Периферическая нервная система. СПб.: Наука, 1999. 281 с.
4. Koepfen A. H. Wallerian degeneration: history and clinical significance. Journal of the Neurological Sciences. 2004; 220:115–117. DOI: 10.1016/j.jns.2004.03.008
5. Kerns J. M., Walter J. S., Patetta M. J., et al. Histological assessment of Wallerian degeneration of the rat tibial nerve following crush and transection injuries. J Reconstr Microsurg. 2021; 37(5): 391–404.
6. Petrova E. S., Isaeva E. N. Study of effect of embryonic anlage allografts of the rat spinal cord on growth of regenerating fibers of the recipient nerve. Biology Bulletin. 2014; 41(6):479–485.
7. Grigorev I. P., Korzhevskii D. E. Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical analysis (review). Modern Technologies in Medicine. 2018; 10:156–165.
8. Niemi J. P., DeFrancesco-Lisowitz A., Roldán-Hernández L. A critical role for macrophages near axotomized neuronal cell bodies in stimulating nerve regeneration. J. Neurosci. 2013; 33(41):16236–16248.
9. Miyano K., Ikehata M., Ohshima K., et al. Intravenous administration of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and umbilical cord improves neuropathic pain via suppression of neuronal damage and anti-inflammatory actions in rats. PLoS ONE. 2022; 17(2):e0262892. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262892>

УДК 611.018

<sup>1</sup>Подсумкова Ю. М., <sup>2</sup>Федорова Е. А., <sup>2</sup>Разенкова В. А.**ВЫЯВЛЕНИЕ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В ПРЕПАРАТАХ ПОЧКИ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ**<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Российская Федерация<sup>2</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация

*Аннотация.* Тучные клетки являются важным показателем состояния внутренних органов человека, поэтому необходимо иметь способы их выявления в исследуемом материале.

*Целью работы* стал поиск красителя, способного четко выявить тучные клетки в препаратах почки человека.