

Морфологическое исследование процессов валлеровской дегенерации в седалищном нерве крысы после механического повреждения

Е.С. Петрова, Е.А. Колос

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Введение. Травма периферических нервных проводников является важной социально значимой проблемой. Для разработки новых способов стимуляции регенерации поврежденных нервов необходимы углубленные фундаментальные исследования молекулярно-клеточных механизмов, регулирующих дегенеративные и репаративные процессы, возникающие в нервном стволе в ответ на повреждение. Цель настоящей работы – используя иммуногистохимические и гистохимические методы исследования, изучить структурные изменения, происходящие в дистальном сегменте седалищного нерва крысы в ранние сроки после травмы.

Материалы и методы. Седалищный нерв крысы повреждали путем наложения лигатуры в течение 40 секунд. Через 7, 21, 60 суток изучали изменения нервных волокон с помощью иммуногистохимической (ИГХ) реакции на альфа-тубулин и окраски на миелин люксолевым прочным синим. Для исследования клеток периневрия применяли антитела к белку плотных контактов клаудину-1. Шванновские клетки (нейролеммоциты) идентифицировали проведением ИГХ реакции на GFAP, макрофаги — на белок Iba-1.

Результаты. Показано, что через 7 суток после наложения лигатуры в эндоневрии дистального сегмента седалищного нерва крысы происходят дегенерация большинства нервных волокон, распад миелиновых оболочек, нарушение гематоневрального барьера, миграция гематогенных макрофагов и дедифференцировка шванновских клеток. Через 21 сутки наблюдаются рост нервных волокон из проксимального сегмента нерва и их ремиелинизация. Через 60 суток их количество достигает наибольшей величины по сравнению с показателями предыдущих сроков.

Заключение. Впервые на модели повреждения нерва путем наложения лигатуры (40 секунд) проведена оценка процессов валлеровской дегенерации, используя гистохимические и иммуногистохимические методы. Установлена зависимость между степенью распада миелина и количеством Iba-1⁺ макрофагов. В дистальном сегменте нерва отмечено нарушение состояния периневрия, выявлены дедифференцированные митотически делящиеся шванновские клетки.

Ключевые слова: валлеровская дегенерация, поврежденный нерв крысы, люксолевый прочный синий, клаудин-1, белок Iba-1, GFAP, иммуногистохимия

Для корреспонденции: Елена Сергеевна Петрова. E-mail: iempes@yandex.ru

Для цитирования: Петрова Е.С., Колос Е.А. Морфологическое исследование процессов валлеровской дегенерации в седалищном нерве крысы после механического повреждения. Клини. эксп. морфология. 2023;12(4):62–70. DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.62-70.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Института экспериментальной медицины (№ FGWG-2022-0002).

Статья поступила 07.12.2022. Получена после рецензирования 22.12.2022. Принята в печать 10.04.2023.

Morphological analysis of Wallerian degeneration in the rat sciatic nerve following mechanical damage

E.S. Petrova, E.A. Kolos

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Introduction. Peripheral nerve injury is an important social problem. Fundamental research on mechanisms regulating degenerative and reparative processes that occur in the nerve following injury is necessary to find new ways of improving nerve regeneration. The purpose was to study the structural changes in the distal segment of the rat sciatic nerve at early stages following injury (ligature) using immunohistochemical and histochemical methods.

Materials and methods. The rat sciatic nerve was subjected to mechanical trauma through ligation for a duration of 40 seconds. After days 7, 21, and 60, we analyzed changes in the nerve fibers using immunohistochemical reactions for alpha-tubulin and Luxol Fast Blue stains for myelin. Antibodies to tight junction protein claudin-1 were used to study perineurial cells. We identified Schwann cells (neurolemmocytes) and macrophages with the reaction for GFAP and the Iba-1 protein IHC reaction, respectively.

Results. After 7 days, we observed degeneration of most nerve fibers, disintegration of myelin sheaths, disruption of the blood-neural barrier, migration of hematogenous macrophages, and dedifferentiation of Schwann cells in the endoneurium of the rat sciatic nerve distal segment. However, after day 21, the growth of nerve fibers from the proximal segment of the nerve and their remyelination were observed. The density of nerve fibers reached its highest value 60 days after the injury.

Conclusion. We evaluated the relationship between the degree of myelin breakdown and the number of Iba-1⁺ macrophages, detected changes in the perineurium in the distal segment of the nerve, and identified dedifferentiated mitotically dividing Schwann cells.

Keywords: Wallerian degeneration, damaged rat nerve, Luxol Fast Blue, claudin-1, Iba-1 protein, GFAP, immunohistochemistry

Corresponding author: Elena S. Petrova. E-mail: iempes@yandex.ru

For citation: Petrova E.S., Kolos E.A. Morphological analysis of Wallerian degeneration in the rat sciatic nerve following mechanical damage. *Clin. exp. morphology.* 2023;12(4):62–70 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2023.12.4.62-70.

Funding. The study was carried out within the framework of State Assignment to Institute of Experimental Medicine (No. FGWG-2022-0002).

Received 07.12.2022. **Received in revised form** 22.12.2022. **Accepted** 10.04.2023.

Введение

Травма периферических нервных проводников является важной социально значимой проблемой [1–3]. В зависимости от степени повреждения нервов в результате переломов, ушибов, сдавления при разрастании близлежащей опухоли потенциал восстановления нервных волокон различен. Нередко повреждение нерва приводит к инвалидизации, в связи с чем особенно актуален поиск способов стимуляции регенерации нервных проводников.

Совершенствование методов улучшения восстановления нервных проводников проводится в течение многих десятилетий. В настоящее время такие экспериментальные разработки ведутся в нескольких направлениях: применяется электростимуляция [4], создаются специальные футляры (кондуиты), соединяющие проксимальный и дистальный концы поврежденных нервных стволов [5–7], совершенствуются хирургические методы [8], разрабатываются способы клеточной [9–12] и генной [13, 14] терапии. Для развития перечисленных методов необходимы глубокие фундаментальные знания механизмов дегенеративных и репаративных процессов, происходящих в нервных проводниках после травмы. Еще в начале прошлого века английский исследователь А. Валлер описал изменения, происходящие в дистальном сегменте поврежденного нерва, и 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, 15]. Из проксимального сегмента нервного ствола на периферию (после

разветвления) начинается рост вновь образовавшихся нервных волокон, подвергающихся впоследствии ремиелинизации. Малоизученными остаются вопросы клеточных коммуникаций в дистальном сегменте поврежденного нерва в процессе де- и регенерации [15].

Цель настоящей работы – используя иммуногистохимические и гистохимические методы исследования, изучить структурные изменения, происходящие в дистальном сегменте седалищного нерва крысы в ранние сроки после травмы.

Материалы и методы

Работа выполнена на крысах-самцах линии Вистар-Киото массой 200–250 граммов (n=30) с соблюдением правил Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 1986) и одобрена локальным этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 2/22 от 06.04.2022).

Седалищный нерв крыс повреждали путем наложения лигатуры (40 секунд). В разные сроки после операции сегменты нерва в области повреждения выделяли и фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида. После соответствующей гистологической обработки материал заливали в парафин. Для изучения нервных структур применяли мышинные моноклональные антитела к альфа-тубулину (клон DM-1A, BioGenex, США). В качестве вторичных реагентов для выявления мышинных антител использовали набор Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (SPD-015, Spring Bioscience, США). Для идентификации клеток периневральной оболочки применяли

поликлональные кроличьи антитела к клаудину-1 (Cldn-1) (Spring Bioscience, США), для нейролеммоцитов – поликлональные кроличьи антитела к глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP) (Agilent, США). Для детекции первичных кроличьих антител в качестве вторичных реагентов пользовались набором Reveal Polyvalent HRP/DAB Detection System kit (Spring Bioscience, США). Для идентификации макрофагов использовали поликлональные козы антитела к антигену Iba-1 (Abcam, Великобритания) [16]. Флуоресцентное выявление GFAP осуществляли с помощью вторичных антител, конъюгированных с TRITC (Dako, Дания). Для идентификации ядер клеток использовали ядерный краситель DAPI (Invitrogen, США). Для изучения состояния миелиновых волокон препараты окрашивали люксоловым прочным синим (Luxol Fast Blue, LFB), позволяющим проводить количественную оценку клиренса миелина. Анализ полученных препаратов осуществляли с помощью светового микроскопа Leica DM750 (Leica Microsystems, Германия) и цифровой фотокамеры ICC50 (Leica Microsystems, Германия), а также флуоресцентного микроскопа Leica DM2500 и фотокамеры Leica DFC420 (Leica Microsystems, 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 изображениях площадью 82365,2 мкм² (от 4 до 5 изображений на животное) ($\times 400$). Оценку плотности распределения макрофагов проводили при $\times 100$. Количественные данные приведены как среднее значение в группе со стандартной ошибкой.

В связи с тем, что распределение в группах отличается от нормального, при проведении статистического анализа применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса с дальнейшим сравнением групп с помощью критерия Данна. Значимыми считали различия групп при $p < 0,05$. При оценке первого параметра (миелиновые волокна) – $p = 0,0009$; второго параметра (осевые цилиндры) – $p = 0,0025$; третьего параметра (макрофаги) – $p = 0,0142$.

Результаты

Состояния миелиновых оболочек в нерве крысы изучали с помощью их окрашивания LFB. Гистологический анализ продольных срезов седалищного нерва показал, что в нервных стволах интактных крыс большинство нервных волокон является миелиновыми и окрашивается LFB в бирюзовый цвет. На препаратах видно, что распределение липопротеинов в миелиновом волокне неодинаково и образует своеобразную сеточку. Установлено, что в разные сроки после повреждения миелиновые волокна выглядят по-разному. Через 7 суток после наложения лигатуры в проксимальном сегменте нерва плотность распределения миелиновых волокон не отличается от таковой в интактном нерве

(рис. 1, 2 А). Нервные волокна дистального сегмента подвергаются ВД (рис. 2 В). LFB-позитивными являются небольшие фрагменты распавшихся миелиновых волокон. В течение последующих двух недель в дистальном сегменте осуществляется процесс ремиелинизации вновь регенерировавших аксонов, растущих на периферию из проксимального конца. Через 21 сутки процент миелинизации значительно возрастает относительно такового на предыдущем сроке (рис. 2, табл.). По сравнению с миелиновыми волокнами проксимального сегмента эти волокна располагаются более разреженно, и процент миелинизации не достигает процента миелинизации проксимального сегмента. Через 60 суток процент миелинизации возрастает, но по-прежнему сохраняется меньшим, чем в интактном нерве (табл.).

Одним из основных процессов ВД является деградация нервных волокон в дистальном сегменте нерва. При применении иммуногистохимической (ИГХ) реакции на альфа-тубулин (αT) было установлено, что в интактном нерве крысы выявляются осевые цилиндры волокон разного диаметра: от 0,7 мкм до 7–8 мкм (рис. 3). Через 7 суток после наложения лигатуры в дистальном конце встречаются отдельные тонкие волокна. Спустя 21 сутки и 60 суток их число и диаметр увеличиваются, но остаются меньше показателей интактного нерва (табл.).

Наряду с демиелинизацией и разрушением аксонов в ранние сроки после травмы в поврежденном нерве наблюдается изменение состояния периневральной оболочки. Клетки периневрия, непосредственно прилежащие к эндоневрию, участвуют в формировании гематоневрального барьера. С помощью ИГХ маркера клеток периневрия, белка плотных контактов Cldn-1,

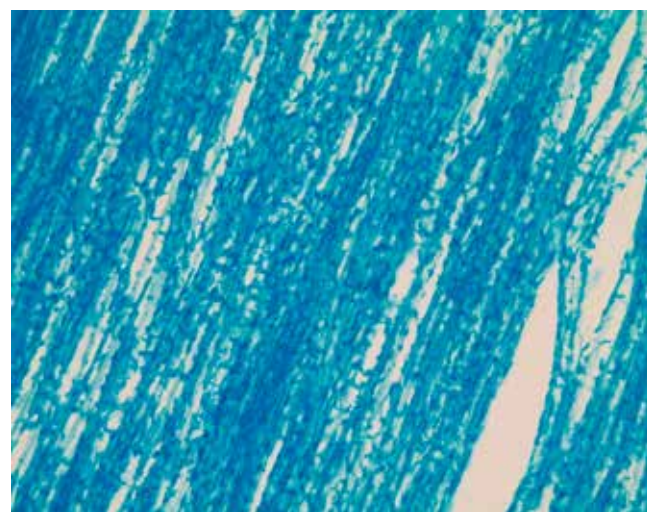


Рис. 1. Миелиновые нервные волокна в седалищном нерве интактной крысы. Окраска люксоловым прочным синим, $\times 400$

Fig. 1. Myelinated nerve fibers in the sciatic nerve of an intact rat. Luxol Fast Blue staining, $\times 400$

Изменение процессов валлеровской дегенерации в дистальном сегменте поврежденного нерва крысы |
Changes in the processes of Wallerian degeneration in the distal segment of the damaged rat nerve

Параметры Parameters	Интактный нерв Intact nerve	Время после наложения лигатуры (суток) Time following the ligation (days)		
		7	21	60
Миелиновые нервные волокна (площадь LFB ⁺ структур, %) Myelinated nerve fibers (area of LFB ⁺ structures, %)	67,3±5,6	16,3±1,5*	43,3±2,4**	35,8±4,1*
Осевые цилиндры нервных волокон (площадь αT ⁺ структур, %) Axial cylinders nerve fibers (area αT ⁺ structures, %)	12,9±0,7	1,4±0,1*	8,2±1,5**	9,1±0,8*
Макрофаги (площадь Iba-1 ⁺ структур, %) Macrophages (area of Iba-1 ⁺ structures, %)	1,4±0,3	4,9±0,4*	1,4±0,2**	1,2±0,1

* p<0,05 (сравнение с интактным нервом | compared to intact nerve)

** p<0,05 (сравнение с предыдущим сроком | compared to previous time period)

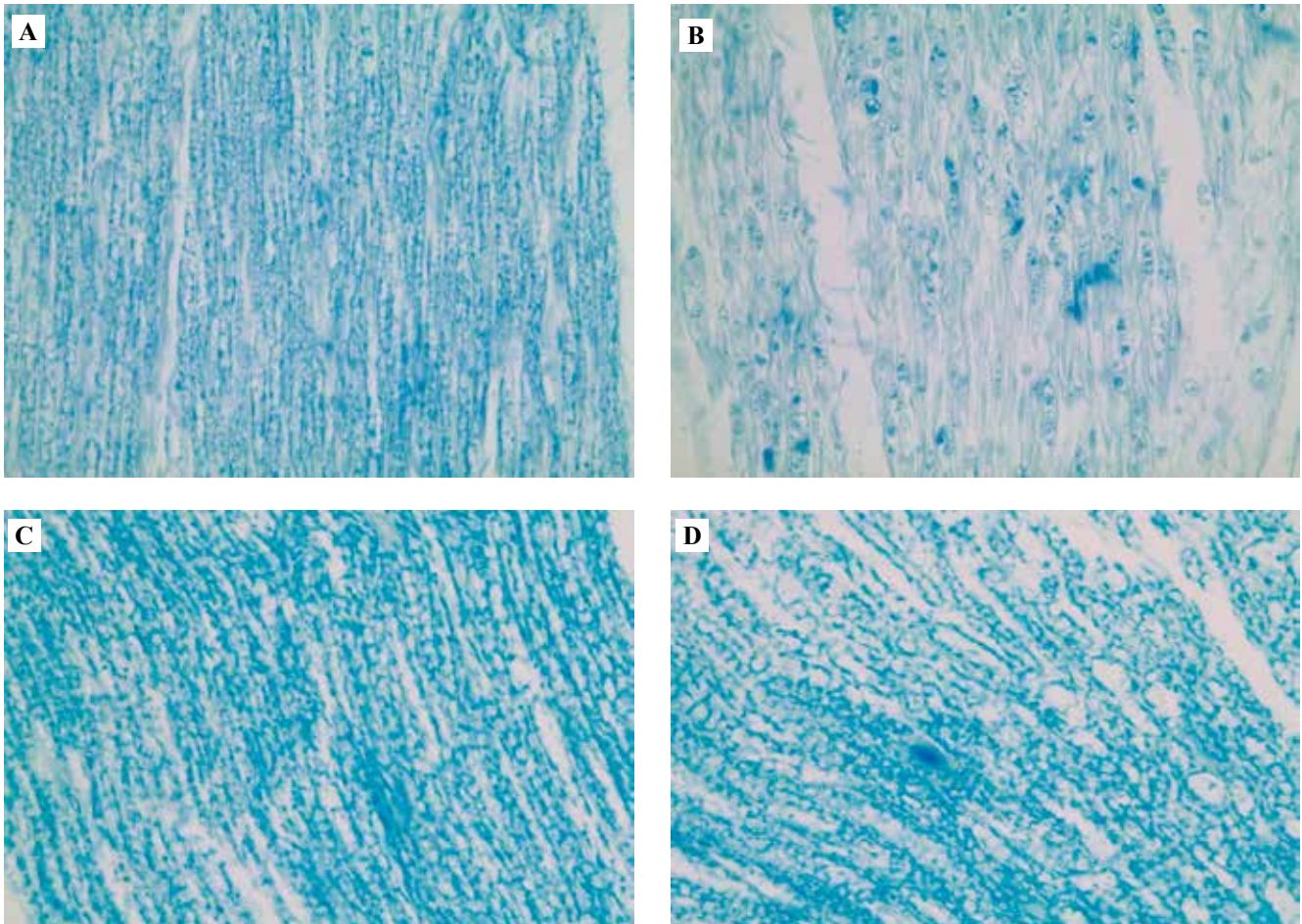


Рис. 2. Изменение плотности распределения миелиновых нервных волокон в седалищном нерве крысы в разные сроки после наложения лигатуры.

А, С – проксимальный сегмент нерва, В, D – дистальный сегмент нерва. А, В – через 7 суток после травмы, С, D – через 21 сутки после травмы. Окраска люксоловым прочным синим, ×400

Fig. 2. Changes in the density of myelinated nerve fibers in the rat sciatic nerve at different time periods following the ligation. А, С – proximal segment of the nerve, В, D – distal segment of the nerve. А, В – 7 days after the injury, С, D – 21 days after the injury. Luxol Fast Blue staining, ×400

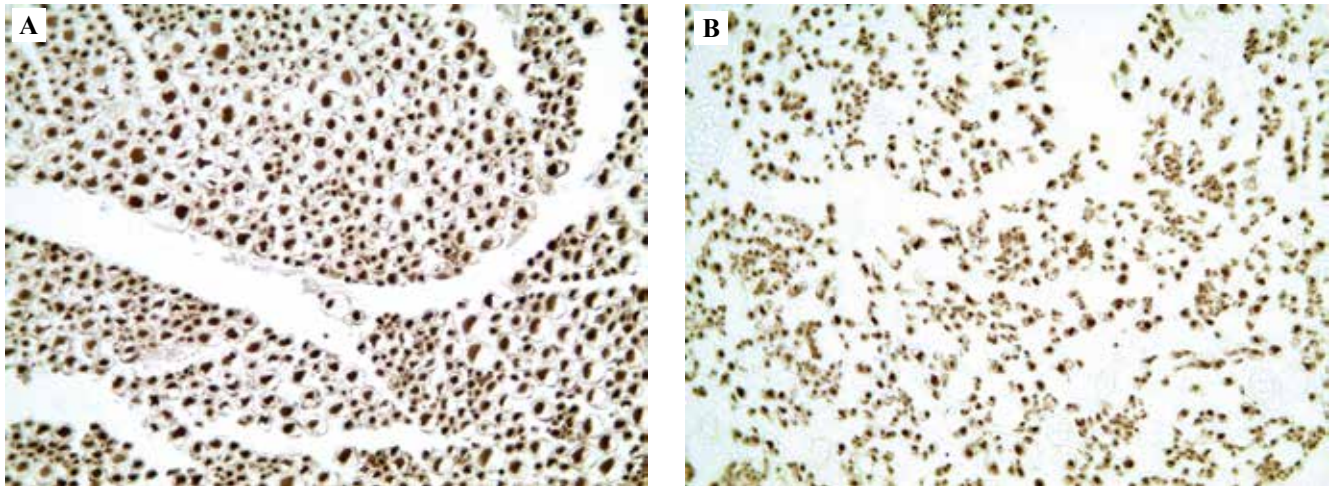


Рис. 3. Изменение плотности распределения нервных волокон после повреждения седалищного нерва путем наложения лигатуры.

А – поперечный срез через intactный нерв, В – поперечный срез через дистальный сегмент поврежденного нерва через 21 сутки после травмы. ИГХ реакция на альфа-тубулин, $\times 400$

Fig. 3. Change in the density of nerve fibers after the ligature-induced injury in the sciatic nerve.

А – transverse section through the intact nerve, В – transverse section through the distal segment of the nerve 21 days after the injury. IHC assay to alpha-tubulin, $\times 400$

нами было показано, что в intactном нерве в области границы периневрия с эндоневрием Cldn-1⁺ структуры располагаются на всем протяжении исследуемого фрагмента нерва непрерывно. После наложения лигатуры наблюдается разреженность плотного слоя клеток периневрия, и Cldn-1⁺ структуры фрагментарны (рис. 4).

Один из наиболее важных процессов, сопровождающих ВД, – миграция макрофагов, которые участвуют в утилизации продуктов распада миелина. Следствием нарушения гематоневрального барьера является миграция гематогенных макрофагов в эндоневрий поврежденного нервного ствола. Используя макрофагальный маркер, кальцийсвязывающий белок Iba-1, установлено, что через 7 суток после наложения лигатуры в дистальном сегменте нерва значительно

увеличивается количество макрофагов (рис. 5, табл.). Показано, что через 21 сутки плотность распределения макрофагов в эндоневрии заметно снижается. Через 60 суток отдельные клетки выявляются в эндоневрии и эпиневррии дистального сегмента поврежденного нерва, макрофаги эндоневрия при этом не содержат продуктов распада миелина.

Исследование нейролеммоцитов в дистальном сегменте поврежденного нерва с помощью ИГХ реакции на GFAP показало, что GFAP-содержащие нейролеммоциты, практически отсутствующие в intactном нерве, появляются в значительном количестве через 7 суток после повреждения (рис. 6). Установлено, что часть из них митотически делится (рис. 6 С). В более поздние сроки наблюдения число GFAP⁺ клеток снижается.

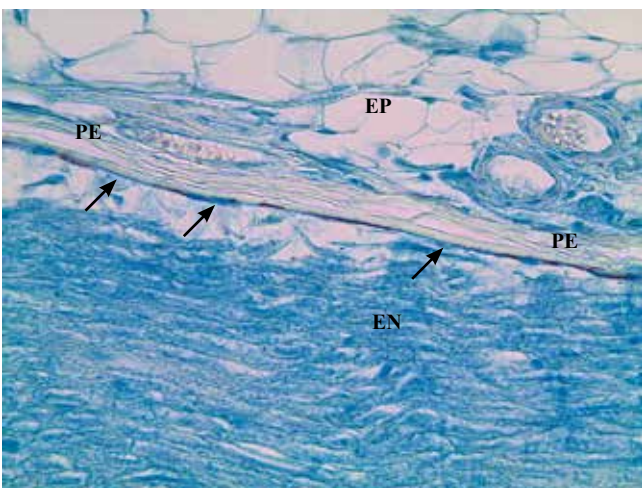


Рис. 4. Нарушение гематоневрального барьера в нерве крысы через 21 сутки после повреждения.

Стрелки – фрагменты периневрия, лишенные плотных контактов. EN – эндоневрий, EP – эпиневррий, PE – периневрий. ИГХ реакция на клаудин-1, подкрашивание астровым синим, $\times 400$

Fig. 4. Changes in the blood-nerve barrier of the rat nerve 21 days after the injury.

Arrows – perineurium fragments without tight contacts. EN – endoneurium, EP – epineurium, PE – perineurium. IHC assay to claudin-1, aster blue staining, $\times 400$

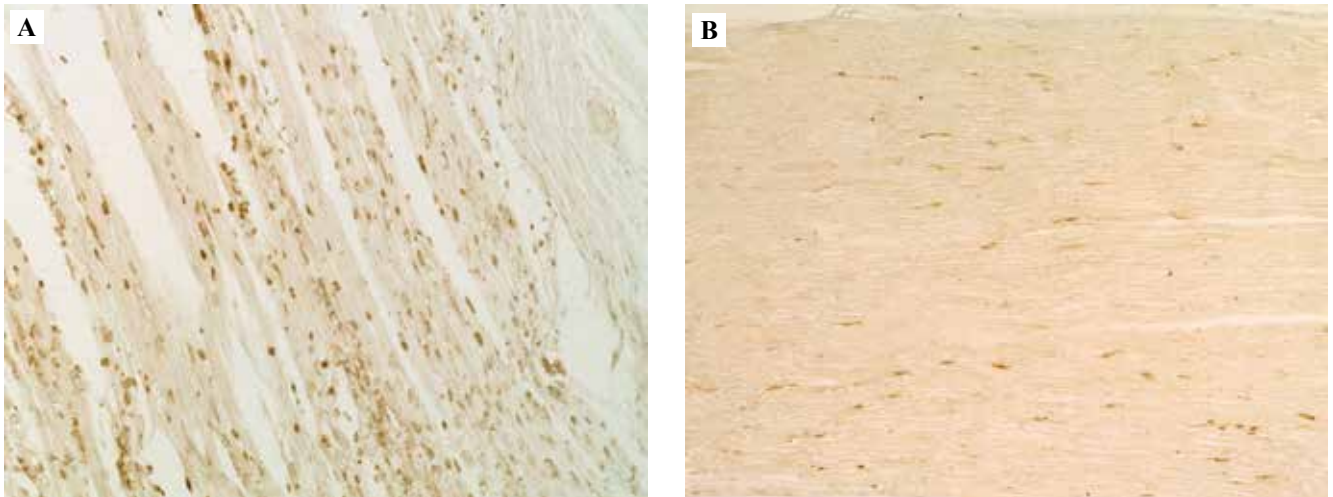


Рис. 5. Макрофаги в дистальном сегменте нерва через 7 суток (А) и 21 сутки (В) после повреждения. ИГХ реакция на белок Iba-1, $\times 100$

Fig. 5. Macrophages in the distal nerve segment 7 days (A) and 21 days (B) after the injury. IHC assay to the Iba-1 protein, $\times 100$

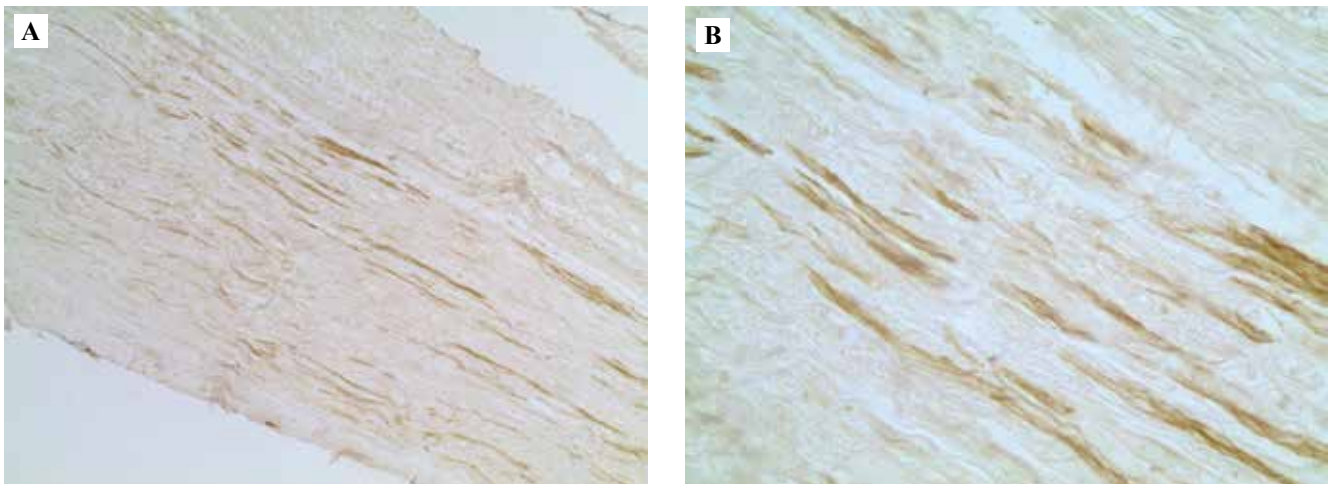


Рис. 6. Нейролеммоциты в дистальном сегменте поврежденного нерва крысы через 7 суток после операции.

А – общий вид дистального сегмента нерва, продольный срез, В – фрагмент эндоневрия с нейролеммоцитами, С – митотически делящиеся нейролеммоциты. Иммуногистохимическая реакция на GFAP. Визуализация с помощью флуорохрома TRITC (красный), подкрашивание ядер DAPI (синий), $\times 100$ (А), $\times 400$ (В), $\times 600$ (С)

Fig. 6. Neurolemmocytes in the distal segment of the injured rat nerve 7 days after the surgery.

А – general view of the distal segment of the nerve, longitudinal section, В – fragment of endoneurium with neurolemmocytes, С – mitotically dividing neurolemmocytes. Immunohistochemical reaction to GFAP. Visualization with TRITC fluorochrome (red), staining of nuclei with DAPI (blue), $\times 100$ (A), $\times 400$ (B), $\times 600$ (C)

Обсуждение

В настоящей работе изучены процессы ВД, происходящие в дистальном сегменте передавленного нерва, с применением современных морфологиче-

ских методов. Исследовано следующее: 1) процесс демиелинизации нервных волокон в дистальном конце нерва после наложения лигатуры; 2) регенерация нервных волокон; 3) изменение в периневраль-

ной оболочке; 4) дедифференцировка шванновских клеток.

Для выявления миелиновых оболочек ранее применяли методы их осмирования, в настоящее время проводят ИГХ реакции на основной белок миелина и ряд других маркеров. Мы использовали гистохимический краситель LFB, являющийся спирторастворимой аминовой солью сульфированного фталоцианина меди и позволяющий выявлять липопротеины, входящие в состав миелиновых оболочек. В последние годы количественную оценку клиренса миелина с помощью этого метода применяют на различных моделях механического повреждения нервных стволов грызунов [17].

В нашей работе установлено, что количество миелиновых волокон после травмы значительно снижается к 7 суткам и постепенно возрастает на 21–60-е сутки после наложения лигатуры. Полученные данные относительно динамики миелина согласуются с результатами исследований других авторов, выполненных на разных экспериментальных моделях механической травмы нерва [17].

Установлено, что снижение плотности распределения миелиновых волокон через 7 суток после операции и постепенное их увеличение в более поздние сроки коррелирует с изменениями в плотности распределения нервных волокон, изученных с помощью ИГХ реакции на альфа-тубулин – белок микротрубочек, являющийся маркером осевых цилиндров нервных волокон. Показано уменьшение аксонов в дистальном сегменте нерва через 7 суток после травмы, а затем по мере роста регенерирующих нервных волокон из проксимального сегмента на периферию постепенное увеличение их количества. Через 21–60 суток площадь, занимаемая нервными волокнами в дистальном сегменте поврежденного нерва, постепенно увеличивается. Оценка площади, занимаемой αT^+ структурами, показала, что в последний срок наблюдений (60 суток) плотность распределения нервных волокон не достигает уровня интактного нерва.

Дегенерация нервных волокон, происходящая в дистальном сегменте нерва после травмы, сопровождается нарушением целостности периневральной оболочки. Периневрий наряду с другими оболочками нерва – эпиневрием и эндоневрием, окружая нервные волокна, способствует их сохранности и регенерации. Кроме того, он выполняет важную барьерную функцию [18]. Периневрий является одним из компонентов гематоневрального барьера [19], регулирующего поток элементов интерстициальной жидкости между эпиневрием и эндоневрием. На сегодняшний день для идентификации клеток периневрия нет специального селективного маркера, поэтому для определения периневральных клеток в экспериментальных исследованиях используют ИГХ реакцию на белки плотных контактов (окклюдин, Cldn-1, Cldn-5, белки ZO-1 и ZO-2) [20]. Полученные в настоящем исследовании данные о нарушении клаудинсодержащих структур

в периневрии нерва после повреждения согласуются с данными других авторов [21]. Вторым компонентом гематоневрального барьера служит эндотелий эндоневральных микрососудов. В настоящем исследовании нам не удалось выявить Cldn-1-содержащие эндотелиальные клетки. Предположительно, в формировании межэндотелиальных плотных контактов принимают участие другие белки.

Дисфункция гематоневрального барьера, вызванная повреждением нерва, регулируется макрофагами [22]. Следствием нарушения гематоневрального барьера явилось увеличение в эндоневрии макрофагов гематогенного происхождения. Для верификации макрофагов мы использовали маркер мононуклеарных фагоцитов – белок Iba-1, который экспрессируется в микроглиальных клетках центральной нервной системы [23], а также макрофагах периферических органов, в том числе периферического нерва [16, 24]. В интактном нерве число макрофагов невелико: выявляется только популяция резидентных макрофагов. Резидентные макрофаги нерва имеют ряд особенностей. Считается, что они заселяют нервы в пренатальный период развития и сохраняют способность к пролиферации. Одной из их функций является уборка продуктов распада миелина в первые сутки после повреждения, до того момента, когда в эндоневрий начнут мигрировать гематогенные моноциты/макрофаги [25]. Через 7 суток число макрофагов заметно возрастает. Помимо участия в фагоцитозе продуктов распада миелина они вырабатывают ряд биологически активных веществ и создают необходимое микроокружение для регенерации нервных волокон. Отмечено, что максимальное увеличение числа макрофагов через 7 суток после операции соответствует минимальному содержанию миелина. Увеличение числа миелиновых волокон в процессе регенерации через 21 сутки и 60 суток приводит к снижению числа макрофагов. Известно, что макрофаги и ШК (основные миелинообразующие клетки периферической нервной системы) в регенерирующем нерве находятся в тесных взаимоотношениях. В литературе имеются данные о том, что ШК могут влиять на активацию макрофагов в нерве и на процесс их поляризации в провоспалительный фенотип M1 и противовоспалительный M2 [26], в то же время считается, что макрофаги регулируют динамику ШК после повреждения нервных проводников, в частности процесс их дедифференцировки. В нашем исследовании в срок, когда наблюдается пик миграции макрофагов (7 суток), в дистальном сегменте нерва обнаруживаются дедифференцированные ШК (нейролеммоциты), которые обладают характерными для них свойствами: не являются миелинизирующими, способны экспрессировать глиальный кислый фибриллярный белок и делиться. Выяснение особенностей взаимодействия ШК и макрофагов эндоневрия важно для понимания механизмов регуляции репаративных процессов в нервных проводниках после травмы и нуждается в дальнейшем исследовании.

Заключение

В настоящей работе впервые проведено комплексное исследование структурных изменений, происходящих в дистальном сегменте седалищного нерва крысы после наложения лигатуры (40 секунд). С использованием современных гистохимических и иммуногистохимических методов изучены следующие процессы валлеровской дегенерации: де- и ремиелинизация нервных волокон, динамика роста регенерирующих аксонов и плотность распределения макрофагов в разные сроки после повреждения. Впервые на данной модели повреждения нерва применен метод изучения клиренса миелина с помощью гистохимического окрашивания люксолевым прочным синим. Показано, что через 7 суток после повреждения большинство нервных волокон подвергается деструкции, а их миелиновые оболочки распаду. Эти процессы сопровождаются нарушением гематоневрального барьера и миграцией в эндоневрий нервного ствола гематогенных макрофагов. Шванновские клетки в этот срок дедифференцируются. Об этом свидетельствуют экспрессия ими маркера дедифференцировки шванновских клеток GFAP и их способность к митотическому делению. Через 21–60 суток наблюдается ремиелинизация регенерирующих из проксимального сегмента нервных волокон. Полученные результаты предполагается использовать в дальнейших исследованиях по поиску новых способов стимуляции поврежденных нервов с применением клеточной терапии.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.С. Петрова.
Сбор и обработка материала – Е.А. Колос, Е.С. Петрова.
Написание текста – Е.А. Колос, Е.С. Петрова.
Редактирование – Е.А. Колос, Е.С. Петрова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – E.S. Petrova.
Collected the data and performed the analysis – E.A. Kolos, E.S. Petrova.
Wrote the paper – E.A. Kolos, E.S. Petrova.
Edited the manuscript – E.A. Kolos, E.S. Petrova.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Литература/References

1. Sarhane KA, Qiu C, Harris TGW, Hanwright PJ, Mao HQ, Tuffaha SH. Translational bioengineering strategies for peripheral nerve regeneration: opportunities, challenges, and novel concepts. *Neural Regen Res.* 2023;18(6):1229–34. DOI: 10.4103/1673-5374.358616.
2. Литвиненко И.В., Одинак М.М., Живолупов С.А., Булатов А.Р., Рашидов Н.А., Бардаков С.Н. Клинико-инструментальные характеристики травматических поражений периферических нервов конечностей. *Вестник Российской Военно-медицинской академии.* 2018;3(63):50–56. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=37298620> (получено 01.12.2022).
Litvinenko IV, Odinak MM, Zhivolupov SA, Bulatov AR, Rashidov NA, Bardakov SN. Clinical and instrumental characteristics of traumatic lesions of peripheral nerves of limbs. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy.* 2018;3(63):50–56 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=37298620> (accessed 01.12.2022).
3. Нуут А.Ю., Фомин Н.Ф. Нерешенные проблемы реконструктивной хирургии периферических нервов. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии.* 2019;12(2):127–133. DOI: 10.18499/2070-478X-2019-12-2-127-133.
Nisht AYu, Fomin NF. Unsolved problems of peripheral nerves reconstructive surgery. *Journal of Experimental and Clinical Surgery.* 2019;12(2):127–133 (In Russ.). DOI: 10.18499/2070-478X-2019-12-2-127-133.
4. Chu XL, Song XZ, Li Q, Li YR, He F, Gu XS et al. Basic mechanisms of peripheral nerve injury and treatment via electrical stimulation. *Neural Regen Res.* 2022;17(10):2185–93. DOI: 10.4103/1673-5374.335823.
5. Тутуров А.О., Пятин В.Ф., Сергеев С.М. Перспективы развития технологий восстановления протяженных дефектов нервов с помощью кондуитов. *Политравма.* 2019;2:95–101. Доступно по адресу: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38557462> (получено 01.12.2022).
Tuturov AO, Pyatin VF, Sergeev SM. Prospects for development of technologies for restoration of extended nerve defects with use of conduits. *Polytrauma.* 2019;2:95–101 (In Russ.). Available from: <https://elibrary.ru/item.asp?id=38557462> (accessed 01.12.2022).
6. Sarker MD, Naghieh S, McInnes AD, Schreyer DJ, Chen X. Regeneration of peripheral nerves by nerve guidance conduits: Influence of design, biopolymers, cells, growth factors, and physical stimuli. *Prog Neurobiol.* 2018;171:125–50. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2018.07.002.
7. Parker BJ, Rhodes DI, O'Brien CM, Rodda AE, Cameron NR. Nerve guidance conduit development for primary treatment of peripheral nerve transection injuries: a commercial perspective. *Acta Biomater.* 2021;135:64–86. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.08.052.
8. Нуут А.Ю., Чирский В.С., Фомин Н.Ф. Морфологическая характеристика изменений периферических нервов и тканей целевых зон при соединении периферических нервов по типу «конец в бок» в эксперименте. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2020;9(1):40–48. DOI: 10.31088/CEM2020.9.1.40-48.
Nisht AYu, Chirskij VS, Fomin NF. Morphological characteristics of changes in peripheral nerves and tissues of target zones after the “end to side” neurotomy in an experiment. *Clinical and experimental morphology.* 2020;9(1):40–48 (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2020.9.1.40-48.
9. Mathot F, Shin AY, van Wijnen AJ. Targeted stimulation of MSCs in peripheral nerve repair. *Gene.* 2019;710:17–23. DOI: 10.1016/j.gene.2019.02.078.
10. Kubiak CA, Grochmal J, Kung TA, Cederna PS, Midha R, Kemp SWP. Stem-cell-based therapies to enhance peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve.* 2020;61(4):449–59. DOI: 10.1002/mus.26760.
11. Siemionow M, Strojny MM, Kozłowska K, Brodowska S, Grau-Kazmierczak W, Cwykiel J. Application of human epineural conduit supported with human mesenchymal stem cells as a novel therapy for enhancement of nerve gap regeneration. *Stem*

- Cell Rev Rep. 2022;18(2):642–59. DOI: 10.1007/s12015-021-10301-z.
12. *Петрова Е.С., Колос Е.А.* Регенерация нервных волокон седалищного нерва крысы после повреждения и введения мезенхимных стволовых клеток. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2020;106(9):1059–1068. DOI: 10.31857/S0869813920070055.
Petrova ES, Kolos EA. Regeneration of nerve fibers of the rat sciatic nerve after damage and injection of MSCs. Russian Journal of Physiology. 2020;106(9):1059–1068 (In Russ.). DOI: 10.31857/S0869813920070055.
 13. *Masgutov R, Zeinalova A, Masgutova G, Salafutdinov I, Garantina E, Syromiatnikova V et al.* Angiogenesis and nerve regeneration induced by local administration of plasmid *pBud-coV-EGF165-coFGF2* into the intact rat sciatic nerve. Neural Regen Res. 2021;16(9):1882–9. DOI: 10.4103/1673-5374.306090.
 14. *Idrisova KF, Zeinalova AK, Masgutova GA, Bogov AA, Allegrucci C, Syromiatnikova VY et al.* Application of neurotrophic and proangiogenic factors as therapy after peripheral nervous system injury. Neural Regen Res. 2022;17(6):1240–7. DOI: 10.4103/1673-5374.327329.
 15. *Kerns JM, Walter JS, Patetta MJ, Sood A, Hussain AK, Chung JJ 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. DOI: 10.1055/s-0040-1716870.
 16. *Петрова Е.С., Колос Е.А.* Iba-1-иммунопозитивные клетки в седалищном нерве крысы в норме и при патологии. В сб.: Современная нейробиология: фундаментальные исследования и практические аспекты. Уфа: РИЦ БашГУ, 2022. С. 226–230. DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.24.
Petrova ES, Kolos EA. Iba-1-immunopositive cells in the sciatic nerve of rats in normal and pathological conditions. In: *Sovremennaya neirobiologiya: fundamental'nye issledovaniya i prakticheskie aspekty.* Ufa: RIC BashGU, 2022. P. 226–230 (In Russ.). DOI: 10.33184/snfipa-2022-10-19.24.
 17. *Otake K, Toriumi T, Ito T, Okuwa Y, Moriguchi K, Tanaka S et al.* Recovery of sensory function after the implantation of oriented-collagen tube into the resected rat sciatic nerve. Regen Ther. 2020;14:48–58. DOI: 10.1016/j.reth.2019.12.004.
 18. *Петрова Е.С., Колос Е.А.* Иммуногистохимическое исследование периневрия. В сб.: Современные аспекты морфологии, патоморфологии и онкопатологии организма человека. Курск: Издательство КГМУ, 2022. С. 296–303. DOI: 10.21626/cb.22.humanmorphology.
Petrova ES, Kolos EA. Immunohistochemical study of the perineurium. In: *Sovremennye aspekty morfologii, patomorfologii i onkopatologii organizma cheloveka.* Kursk: Izdatel'stvo KGMU, 2022. P. 296–303 (In Russ.). DOI: 10.21626/cb.22.humanmorphology.
 19. *Ubogu EE.* Biology of the human blood-nerve barrier in health and disease. Exp Neurol. 2020;328:113272. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113272.
 20. *Tsukita S, Tanaka H, Tamura A.* The claudins: from tight junctions to biological systems. Trends Biochem Sci. 2019;44(2):141–52. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.09.008.
 21. *Reinhold AK, Schwabe J, Lux TJ, Salvador E, Rittner HL.* Quantitative and microstructural changes of the blood-nerve barrier in peripheral neuropathy. Front Neurosci. 2018;12:936. DOI: 10.3389/fnins.2018.00936
 22. *Xu J, Wen J, Fu L, Liao L, Zou Y, Zhang J et al.* Macrophage-specific RhoA knockout delays Wallerian degeneration after peripheral nerve injury in mice. J Neuroinflammation. 2021;18(1):234. DOI: 10.1186/s12974-021-02292-y.
 23. *Kolos EA, Korzhevskii DE.* Spinal cord microglia in health and disease. Acta Naturae. 2020;12(1):4–17. DOI: 10.32607/actanaturae.10934.
 24. *Kwilasz AJ, Green Fulgham SM, Ellis A, Patel HP, Duran-Malle JC, Favret J et al.* A single peri-sciatic nerve administration of the adenosine 2A receptor agonist ATL313 produces long-lasting anti-allodynia and anti-inflammatory effects in male rats. Brain Behav Immun. 2019;76:116–25. DOI: 10.1016/j.bbi.2018.11.011.
 25. *Kolter J, Kierdorf K, Henneke P.* Origin and differentiation of nerve-associated macrophages. J Immunol. 2020;204(2):271–9. DOI: 10.4049/jimmunol.1901077.
 26. *Stratton JA, Holmes A, Rosin NL, Sinha S, Vohra M, Burma NE et al.* Macrophages regulate Schwann cell maturation after nerve injury. J Cell Rep. 2018;24(10):2561–72.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.08.004.

Информация об авторах

Елена Сергеевна Петрова – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной гистологии и конфокальной микроскопии отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины.

Елена Андреевна Колос – научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины.

Author information

Elena S. Petrova – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Experimental Histology and Confocal Microscopy, Department of General and Local Morphology, Institute of Experimental Medicine.
<https://orcid.org/0000-0003-0972-8658>

Elena A. Kolos – Researcher, Laboratory of Functional Morphology of the Central and Peripheral Nervous System, Department of General and Local Morphology, Institute of Experimental Medicine.
<https://orcid.org/0000-0002-9643-6831>