
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**РЕАКЦИЯ РЕЗИДЕНТНЫХ МАКРОФАГОВ И НЕЙТРОФИЛОВ
ЭНДОНЕВРИЯ НА ТРАВМУ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ
И ТРАНСПЛАНТАЦИЮ МСК**

© 2025 г. Е. С. Петрова¹ *, Е. А. Колос¹

¹Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: iempes@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.06.2025 г.

После доработки 24.07.2025 г.

Принята к публикации 25.07.2025 г.

Целью настоящей работы явилось изучение распределения резидентных макрофагов и нейтрофилов в эндоневрии седалищного нерва крысы в ранние сроки после травмы и субпериневрального введения суспензии мезенхимных стволовых клеток. Для выяснения реакции резидентных макрофагов и нейтрофилов на механическое повреждение периферических нервных проводников была использована экспериментальная модель травмы седалищного нерва крысы путем наложения лигатуры (в течение 40 с) с применением клеточной терапии. Для идентификации макрофагов эндоневрия применяли иммуногистохимическую реакцию на кальций-связывающий белок Iba-1, маркер мононуклеарных фагоцитов. Нейтрофилы исследовали на препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином и толуидиновым синим. Установлено, что активация резидентных макрофагов в эндоневрии седалищного нерва крысы осуществляется уже через 1 ч после травмы, на несколько часов раньше, чем в эндоневрий мигрируют из кровеносных сосудов нейтрофилы. Это свидетельствует о том, что резидентные макрофаги первыми реагируют на повреждение и стимулируют развитие процессов валлеровской дегенерации. Показано, что применение субпериневральной трансплантации мезенхимных стволовых клеток приводит к снижению активации резидентных макрофагов и уменьшению количества мигрирующих в эндоневрий поврежденного нерва нейтрофилов. Возможные причины установленных фактов обсуждаются.

Ключевые слова: регенерация нерва, субпериневральная трансплантация мезенхимных стволовых клеток, резидентные макрофаги, нейтрофилы, иммуногистохимия

DOI: 10.7868/S2658655X25090048

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность изучения восстановления периферических нервных проводников после механического повреждения связана с высокой частотой травм, которые затрагивают нервные сплетения и нередко приводят к утрате трудоспособности [1–4]. Несмотря на то, что периферические нервные волокна благодаря наличию специальной популяции глиоцитов – шванновских клеток (Schwann cells, SCs) [5–7] – обладают большими регенераторными потенциями, чем аксоны ЦНС, использование различных способов

стимуляции их регенерации (совершенствование шовной техники и нейропластики, применение специальных инженерных конструкций – кондуитов, соединяющих проксимальный и дистальный сегменты нерва, поиск новых лекарственных препаратов, воздействие электростимуляции и магнитных полей и др. [1, 4]) не приводит к их полному функциональному восстановлению более чем в 30% случаев [2]. Это связано с недостатком фундаментальных знаний о тех процессах, которые происходят в нервных стволах после повреждения, и о механизмах их регуляции. Как известно, после травмы нерва в его дистальном сегменте развиваются процессы валлеровской дегенерации [8–11]. Они включают в себя распад аксонов и миелиновых оболочек, рекрутирование гематогенных макрофагов и нейтрофилов, дедифференцировку SCs с образованием особой популяции клеток – репаративных SCs и другие процессы [8, 11, 12].

Считается, что восстановление периферических аксонов зависит от быстроты и эффективности реакции макрофагов, которые наряду со SCs обеспечивают нормальную регенерацию нервных волокон, очищая нервные стволы от продуктов распада миелина [13]. В эндоневрии периферических нервных проводников описаны две различные популяции макрофагов: резидентные (resident macrophages, RMs) и гематогенные, или рекрутированные, которые мигрируют в эндоневрий из кровеносных сосудов после травмы [14].

В исследованиях, посвященных валлеровской дегенерации, основное внимание уделяется главным ее участникам: SCs [6, 7, 15] и рекрутированным макрофагам [16, 17]. RMs являются менее изученной популяцией, впервые они были описаны Arvidson в 1977 г. [18, 19], дальнейшие их исследования немногочисленны [13, 14, 19, 20]. Морфофункциональные характеристики RMs и роль этих клеток в регенерации нерва до конца не ясны.

Целью настоящей работы явилось изучение распределения резидентных макрофагов и нейтрофилов в эндоневрии седалищного нерва крысы в ранние сроки после травмы и субпериневрального введения суспензии мезенхимных стволовых клеток.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на крысах линии Вистар-Киото массой 200–250 г ($n = 30$). При работе с животными руководствовались международными правилами Европейского сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными. У крыс под эфирным наркозом на уровне верхней трети бедра после эпиляции конечности делали разрез кожи длиной 1.5 см, рассекали подлежащие мышцы для подхода к седалищному нерву. Седалищные нервы крыс повреждали путем наложения лигатуры в течение 40 с так, чтобы в дистальном сегменте развивалась валлеровская дегенерация большинства аксонов [21], затем накладывали швы на рассеченные мышцы и кожу. Части животных субпериневрально вводили суспензию мезенхимных стволовых клеток (МСК) (5×10^4 в 5 мкл культуральной среды). Животным контрольной группы вводили культуральную среду в том же объеме. МСК костного мозга крыс Вистар-Киото были получены в ООО Транс-Технологии (ген. директор – к.б.н. Д.Г. Польшцев). Характеристика используемых для трансплантации МСК дана в ранее выполненных работах [21]. Животных содержали в стандартных условиях вивария без ограничения доступа к воде и пище. Через 1, 3, 6, 24 ч после операции крыс умерщвляли и выделяли фрагменты седалищных нервов в области повреждения. Фрагменты нерва размером 15 мм фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида, и после проводки в спиртах возрастающей концентрации и ксилоле материал заливали в парафин и изготавливали продольные срезы толщиной 5 мкм. После депарафинирования срезов для идентификации макрофагов проводили иммуногистохимическую (ИГХ) реакцию на кальций-связывающий белок Iba-1 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1), селективный маркер макрофагов и микроглиоцитов [22].

Выявление макрофагов проводили с использованием кроличьих моноклональных антител к Iba-1 (клон JM36-62) (ET1705-78) в разведении 1 : 1000 (Huabio, Китай). В качестве вторичных реагентов использовали набор UltraVision Quanto HRP DAB Detection System (TL-060-QHL, Thermo Fisher Scientific, США). Для визуализации продукта реакции использовали хромоген 3'3'-диаминобензидин из набора DAB⁺ (Agilent, США). После постановки иммуногистохимических реакций часть срезов докрашивали толуидиновым синим или астровым синим. Для исследования нейтрофилов препараты окрашивали гематоксилином-эозином. Микроскопическое исследование препаратов и фотосъемку выполняли, используя микроскоп Leica DM750 и цифровую фотокамеру Leica ICC50 (Leica, Германия). Измерение доли площади, занятой Iba-1⁺ структурами, осуществляли с помощью программы ImageJ (НИН, США). Исследовали 3–4 изображения площадью 82365.2 мкм², используя объектив $\times 40$ и окуляр $\times 10$. Подсчет нейтрофилов проводили на поле зрения площадью 0.16 мм² (объектив $\times 40$) с последующим пересчетом на 1 мм². Сравнительные исследования проводили между двумя группами: 1-я – интактные животные и животные с повреждением нерва путем наложения лигатуры; 2-я – животные с лигатурой и субперинеуральной трансплантацией МСК. Проверку данных на соответствие нормальному распределению осуществляли с применением критерия Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilk's W test). Различия определяли по *t*-критерию при $p < 0.05$. Данные гистограмм приведены как среднее значение в группе со стандартным отклонением.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистологический анализ интактного седалищного нерва крысы показал, что в области верхней трети бедра он представлен несколькими нервными стволиками. На продольных срезах видно, что они состоят из эндоневрия, периневральной и эпиневральной оболочек. На препаратах, окрашенных толуидиновым синим, в эндоневрии можно видеть нервные волокна и ядра шванновских клеток (нейролеммоцитов). Микрососуды эндоневрия менее заметны, чем в эпиневральной оболочке. В эпи- и периневральной оболочках встречаются редкие тучные клетки, нейтрофилы отсутствуют.

Отмечено, что Iba-1-иммунореактивные клетки встречаются в эпи- и эндоневрии. В эпиневрии они выглядят округлыми или неправильной формы клетками, морфологически сходными с соединительнотканными макрофагами других органов. Клетки Iba-1⁺ эндоневрия приобретают вытянутую форму (рис. 1а, б). Нередко они локализируются вблизи кровеносных сосудов, соседствуя с эндотелием.

Через 1–24 ч после операции в месте наложения лигатуры наблюдаются структурные изменения. Видна деформация эпиневральной оболочки. В эндоневрии изменения касаются резидентных макрофагов. Многие из них увеличиваются в размерах и изменяют форму: они становятся овальными, округлыми, веретеновидными, у некоторых становятся более выраженными цитоплазматические отростки (рис. 1с, д).

Через 1 и 24 ч после операции измеряли процент площади изображения, занятой структурами с положительной реакцией на Iba-1, используя программу ImageJ. Установлено, что процент площади, занимаемой макрофагами Iba-1⁺, значительно увеличивается в месте наложения лигатуры, по сравнению с интактным нервом, уже через 1 ч после операции (рис. 2) и остается повышенным через 24 ч.

В ходе исследования выяснилось, что через 1 ч после повреждения нерва нейтрофилы в эндоневрии еще отсутствуют, так же как в интактном нерве. Чтобы выяснить срок их появления в эндоневрии, проводили гистологическое исследование нерва через 3, 6 и 24 ч. Оказалось, что через 3 ч в области эндоневрия нейтрофилы встречаются только внутри кровеносных сосудов. Через 6 ч они выходят из сосудов и локализуются между нервными волокнами эндоневрия. В период с 6 до 24 ч нейтрофилы представлены в поврежденном нерве в большом количестве (рис. 3).

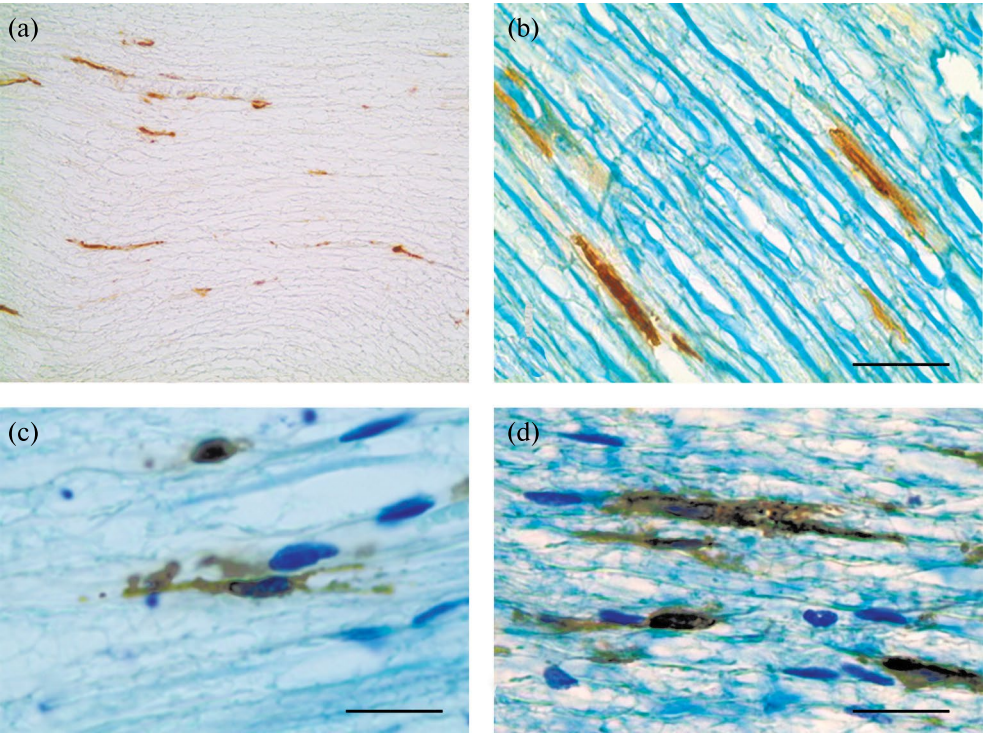


Рис. 1. Резидентные макрофаги в эндоневрии седалищного нерва крысы. (a, b) – intactный нерв; (c) – через 3 ч после наложения лигатуры; (d) – через 24 ч после наложения лигатуры. Иммуногистохимическая реакция на белок Iba-1. Подкраска астровым синим (b) и толуидиновым синим (c, d). Масштабный отрезок равен 50 мкм (a); 200 мкм (b–d).

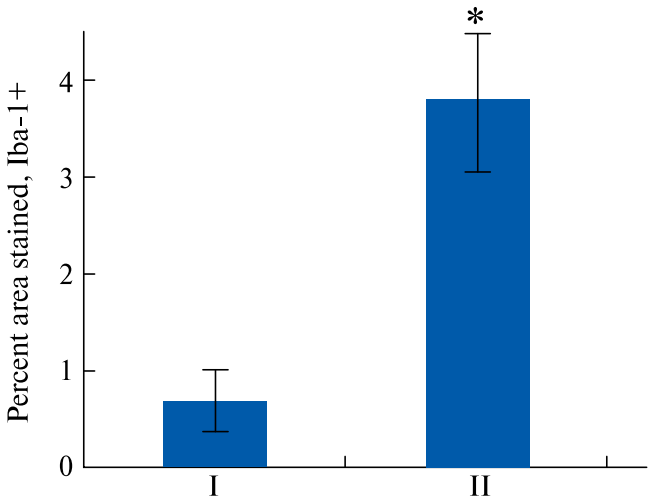


Рис. 2. Изменение площади, занятой структурами Iba-1⁺ в эндоневрии intactного и поврежденного нерва. I – intactный нерв; II – через 1 ч после наложения лигатуры. По оси ординат – доля площади, занимаемой структурами Iba-1⁺, %. * $p < 0.05$.

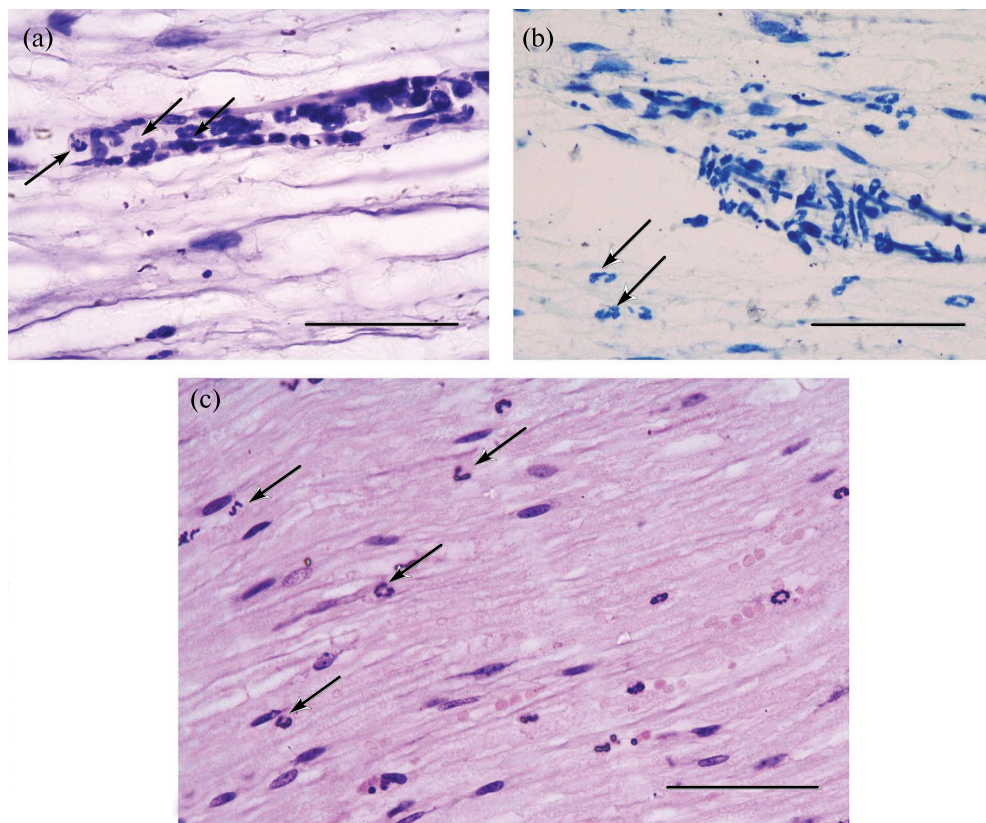


Рис. 3. Нейтрофилы в эндоневрии седалищного нерва крысы через 3 ч (а), 6 ч (b), 1 сутки (с) после операции. Стрелками указаны нейтрофилы. Окраска гематоксилином-эозином (а, с) и толуидиновым синим (b). Масштабный отрезок равен 50 мкм.

Таким образом, через 24 ч в поврежденном нерве можно видеть активированные RMs и увеличение плотности распределения нейтрофилов. Этот срок был выбран нами для установления влияния клеточной терапии на реакцию этих клеток. При сравнении площади, занимаемой структурами Iba-1⁺ эндоневрия, у группы животных с лигатурой и группы, получавшей после повреждения клеточную терапию, оказалось, что введение МСК приводит к снижению активации RMs (рис. 4).

Через 24 ч после травмы и субпериневрального введения МСК был проведен анализ числа нейтрофилов на единицу площади эндоневрия дистального сегмента поврежденного нерва. Оказалось, что плотность распределения нейтрофилов у таких животных снижается (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

RMs эндоневрия – малоизученная клеточная популяция. В настоящей работе для исследования особенностей эндоневриальных RMs мы использовали стандартизированную модель повреждения седалищного нерва крысы путем наложения лигатуры, следствием чего является валлеровская дегенерация его дистального сегмента [21]. Показано, что в интактном нерве резидентные макрофаги представлены в небольшом

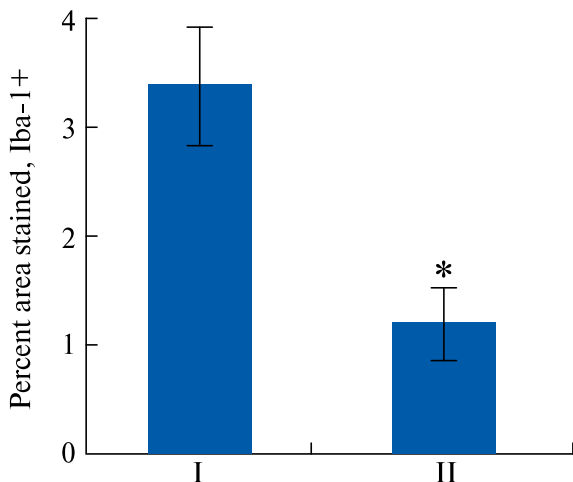


Рис. 4. Изменение площади, занятой структурами Iba-1⁺ в эндоневрии седалищного нерва крысы через 24 ч после травмы (I) и введения МСК (II). По оси ординат – доля площади, занимаемой структурами Iba-1⁺, %. * $p < 0.05$.

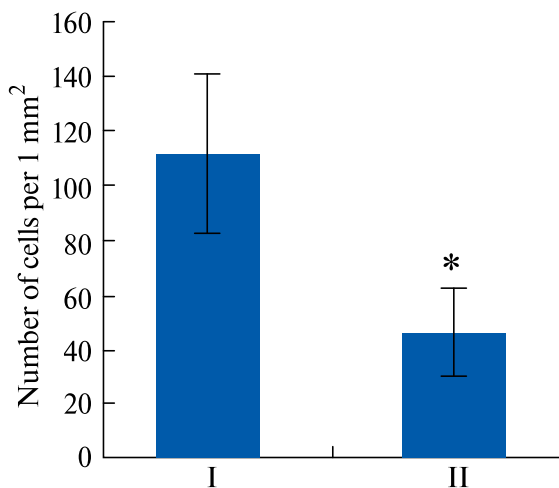


Рис. 5. Изменение числа нейтрофилов на единицу площади седалищного нерва крысы через 24 ч после травмы (I) и введения МСК (II). По оси ординат – количество клеток. * $p < 0.05$.

количестве, локализуются между нервными волокнами, имеют характерную вытянутую форму, многие располагаются вокруг кровеносных микрососудов, тесно соприкасаясь с эндотелием. Установлено, что в период с 1-го по 24-й ч после механического повреждения (наложение лигатуры, 40 с) RMs активируются. Это проявляется в увеличении их размеров, увеличении площади цитоплазмы, изменении их формы.

Для идентификации RMs в эндоневрии седалищного нерва крысы мы использовали ИГХ-реакцию на кальций-связывающий белок Iba-1, который является маркером мононуклеарных фагоцитов, в том числе микроглиоцитов ЦНС [23]. Показано, что белок Iba-1 экспрессируется как в резидентных, так и в гематогенных макрофагах/моноцитах. Чтобы ограничить объект исследования только RMs (исключить

рекрутируемые макрофаги), мы выбрали ранние сроки наблюдений. Увеличение площади, занимаемой Iba-1⁺ RMs через 1 ч после травмы нерва, не связано с миграцией в эндоневрий гематогенных макрофагов. По разным данным, гематогенные моноциты/макрофаги мигрируют в место повреждения нерва только через 1–2 суток после травмы и в дистальный сегмент – через 3–4 суток [14, 24]. Не связано это и с пролиферацией RMs. Отмеченное увеличение объема цитоплазмы и появление отростков свидетельствуют об активации RMs.

Популяция RMs эндоневрия в настоящее время вызывает большой интерес у нейробиологов, поскольку по некоторым характеристикам RMs имеют сходство с микроглиоцитами и макрофагами органов ЦНС [13, 14]. Сходство с микроглиоцитами касается их происхождения в эмбриогенезе. В период пренатального развития эмбриональные предшественники из желточного мешка и печени плода дают начало резидентным макрофагам различных тканей, в том числе нерва, где популяция поддерживается самообновлением [19]. Кроме того, RMs, подобно микроглии ЦНС, раньше других клеток реагируют на изменение микроокружения при патологии. Этот факт подтверждают результаты настоящего исследования: активация RMs наблюдается в нерве уже через 1 ч после повреждения.

Однако вопрос о том, можно ли считать RMs эндоневрия аналогами микроглиоцитов ЦНС, дискуссионен. Неясно, относятся ли эндоневральные макрофаги к той же линии клеток, которую представляют все резидентные макрофаги в различных тканях и органах, или они являются особой линией клеток, как микроглия ЦНС [19]. Нельзя исключать, что популяция резидентных макрофагов ПНС гетерогенна, так же как в ЦНС, где выделяют популяцию микроглиоцитов и популяцию макрофагов менингеальных оболочек, околососудистой области и сосудистого сплетения мозга [25]. Генетический анализ показал, что лишь небольшая часть эндоневральных RMs имеет сходство с микроглией, причем только по нескольким генам [20]. При этом у эндоневральных RMs наблюдается сходство с мозговыми макрофагами по фенотипу, проявляющемуся при патологии. Так, есть данные, что после травмы периферического нервного проводника они начинают экспрессировать CD68 (ED1) [13], аналогичная экспрессия этого белка свойственна макрофагам мозга в ответ на ишемию [26] или травму ЦНС [27].

При исследовании ранних сроков после повреждения нерва необходимо уделить внимание еще одной важной клеточной популяции эндоневрия – нейтрофилам. Они появляются в нервном стволе в ранние сроки после повреждения и предположительно выполняют фагоцитарную функцию в период, предшествующий миграции в нерв гематогенных (рекрутированных) макрофагов. Нейтрофилы – мультифункциональные клетки, кроме основной антимикробной функции, они модулируют иммунные и воспалительные процессы в тканях и органах [28–30]. В частности, они индуцируют активацию и поляризацию макрофагов в тканях после повреждения [30, 31]. Роль нейтрофилов, которые после травмы нерва мигрируют в эндоневрий из кровяного русла, малоизучена. Учитывая, что они раньше гематогенных макрофагов мигрируют в место повреждения нерва, можно предположить, что именно нейтрофилы стимулируют начало процессов валлеровской дегенерации, однако вопрос этот до сих пор не совсем ясен. Мнения исследователей о роли нейтрофилов в процессе регенерации нервов противоречивы. С одной стороны, считается, что, выделяя ряд биологически активных веществ (в том числе после своей гибели по механизму апоптоза), нейтрофилы принимают участие в рекрутировании в зону повреждения гематогенных макрофагов [29]. С другой стороны, есть наблюдение, что нейтрофилы благодаря нетозу и образованию собственных им ловушек, наоборот, ингибируют миграцию макрофагов в эндоневрий из эпиневральной оболочки [30]. Возможно, они выполняют функцию регуляции такой миграции. В настоящем исследовании показано, что активация резидентных макрофагов после травмы нерва наблюдается раньше, чем осуществляется миграция из кровеносных сосудов нейтрофилов, это может свидетельствовать о том, что

именно резидентные макрофаги эндоневрия являются первыми клетками, реагирующими на повреждение и запускающими процессы валлеровской дегенерации, наблюдаемые в последующие сроки.

В работе установлено, что при использовании клеточной терапии через 24 ч после введения МСК костного мозга плотность распределения макрофагов в эндоневрии ниже, чем у животных группы контроля. Контролем служили крысы, которым вместо суспензии МСК субпериневрально была введена среда без клеток в том же объеме. Отмечено, что число нейтрофилов на единицу площади также снижается в группе животных, получивших МСК. Механизм влияния экзогенных МСК на нейтрофилы неизвестен. Есть мнение, что исследования в этом направлении открывают новую перспективу в понимании раннего воспалительного ответа [32].

Таким образом, в настоящей работе установлено, что субпериневральная трансплантация МСК костного мозга приводит к снижению активации RMs и миграции нейтрофилов в ответ на повреждение нерва. Известно, что МСК могут напрямую секретировать противовоспалительные цитокины и нейтрализаторы для провоспалительных молекул [32, 33]. Кроме того, они могут модулировать метаболизм и поляризацию воспалительных клеток [32].

Для объяснения отмеченного снижения реакции макрофагов и нейтрофилов после применения клеточной терапии имеется и второе предположение, которое касается особенностей экзогенных МСК оказывать влияние на клетки спинного мозга и спинномозгового ганглия (из отростков которых состоит седалищный нерв). Как известно, повреждение периферических нервных проводников приводит к дистрофическим и/или дегенеративным изменениям образующих их нервных клеток (хроматолизу, набуханию, ретракции дендритов и др.) [34, 35]. Несмотря на то что механизм этого явления не полностью понятен [35], установлено, что клеточная и генная терапия (рассматриваемые как источники нейротрофических факторов) могут оказывать нейропротекторный эффект по отношению к нейронам и способствовать регенерации аксонов [36, 37]. Следует отметить, что даже после гибели трансплантированных МСК путем апоптоза велика вероятность их воздействия на окружающие ткани путем эфферозита на клетки реципиента [38]. Обеспечивая сохранность большего числа нервных клеток, МСК-терапия, возможно, приводит к сохранности большего числа аксонов нерва, не подвергающихся валлеровской дегенерации, это объясняет выявленные в настоящей работе снижение реакции RMs и уменьшение количества нейтрофилов. Для подтверждения этого необходимы дальнейшие исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование Iba-1-иммунопозитивных резидентных макрофагов и нейтрофилов эндоневрия седалищного нерва крысы после повреждения (наложение лигатуры, 40 с) показало, что активация резидентных макрофагов в этой структуре наблюдается уже через 1 ч после травмы, то есть раньше, чем осуществляется миграция из кровеносных сосудов нейтрофилов. Это свидетельствует о том, что именно резидентные макрофаги эндоневрия являются первыми клетками, реагирующими на повреждение, и способствуют развитию валлеровской дегенерации, наблюдаемой в последующие сроки. Показано, что применение субпериневральной трансплантации МСК приводит к снижению активации резидентных макрофагов и уменьшению количества мигрирующих в эндоневрий поврежденного нерва нейтрофилов. Вопрос о механизмах влияния клеточной терапии с использованием МСК на изученные клетки требует дополнительных исследований. Исследования в этом направлении открывают новые перспективы в понимании раннего воспалительного ответа.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Е. С. П. и Е. А. К. – идея работы, проведение экспериментов, изготовление гистологических препаратов, анализ материала, написание и редактирование текста.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета государственного задания Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Институт экспериментальной медицины”. Шифр темы: GFWG-2025-0003.

СОБЛЮЖДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При работе с животными руководствовались международными правилами Европейского сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины” (протокол № 1/25 от 30.01.2025).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы информируют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карагяур МН, Макаревич ПИ, Шевченко ЕК, Стамбольский ДВ, Калинина НИ, Парфёнова ЕВ (2017) Современные подходы к регенерации периферических нервов после травмы: перспективы генной и клеточной терапии. *Гены & клетки* 12(1): 6–14. [Karagyaour MN, Makarevich PI, Shevchenko EK, Stambolsky DV, Kalinina NI, Parfyonova YeV (2017) Modern approaches to peripheral nerve regeneration after injury: the prospects of gene and cell therapy. *Geny` & kletki* 12(1): 6–14. (In Russ)]. <https://doi.org/10.23868/201703001>
2. Wang ML, Rivlin M, Graham JG, Beredjikian PK (2019) Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. *Connect Tissue Res* 60(1): 3–9. <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1489381>
3. Modrak M, Talukder MAH, Gurgenchashvili K, Noble M, Elfar JC (2020) Peripheral nerve injury and myelination: Potential therapeutic strategies. *J Neurosci Res* 98(5): 780–795. <https://doi.org/10.1002/jnr.24538>
4. Song X, Li R, Chu X, Li Q, Li R, Li Q, Tong KY, Gu X, Ming D (2025) Multilevel analysis of the central-peripheral-target organ pathway: contributing to recovery after peripheral nerve injury. *Neural Regen Res* 20(10): 2807–2822. <https://doi.org/10.4103/NRR.NRR-D-24-00641>
5. Чельшиев ЮА, Сайткулов КИ (2000) Развитие, фенотипическая характеристика и коммуникация шванновских клеток. *Успехи физиол наук* 31(3): 54–69. [Chelyshev YuA, Saitkulov KI (2000) Development, phenotypic characteristics and communication of Schwann cells. *Uspekhi fiziol nauk* 31(3): 54–69. (In Russ)].
6. Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC (2015) Schwann cells: development and role in nerve repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7: a020487. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020487>
7. Carr MJ, Johnston AP (2017) Schwann cells as drivers of tissue repair and regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 47: 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.09.003>
8. Koeppen AH (2004) Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Sci* 220: 115–117. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.03.008>

9. *Zochodne DW* (2008) Neurobiology of peripheral nerve regeneration. Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, Sao Paulo. Cambridge Univer Press.
10. *Живолупов СА, Рашидов НА, Самарцев ИИ, Яковлев ЕВ* (2013) Современные представления о регенерации нервных волокон при травмах периферической нервной системы. Вестн Рос Военно-мед акад 3(43): 190–198. [*Zhivolupov SA, Rashidov NA, Samarcev IN, Yakovlev EV* (2013) Modern concepts of nerve fiber regeneration in injuries of the peripheral nervous system. Vestn Ross Voenno-med akad 3(43): 190–198. (In Russ)].
11. *Kerns JM, Walter JS, Patetta MJ, Sood A, Hussain AK, Chung JJ, Deshpande A, DesLaurier JT, Dieter RA, Siemionow M, Seiler FA, Amirouche FML, Gonzalez MH* (2021) Histological Assessment of Wallerian Degeneration of the Rat Tibial Nerve Following Crush and Transection Injuries. *J Reconstr Microsurg* 37(5): 391–404.
<https://doi.org/10.1055/s-0040-1716870>
12. *Gomez-Sanchez JA, Pilch KS, van der Lans M, Fazal SV, Benito C, Wagstaff LJ, Mirsky R, Jessen KR* (2017) After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten Radically on Remyelination. *J Neurosci* 37(37): 9086–9099.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1453-17.2017>
13. *Mueller M, Wacker K, Ringelstein EB, Hickey WF, Imai Y, Kiefer R* (2001) Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *Am J Pathol* 159(6): 2187–2197.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63070-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63070-2)
14. *Mueller M, Leonhard C, Wacker K, Ringelstein EB, Okabe M, Hickey WF, Kiefer R* (2003) Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. *Lab Invest* 83(2): 175–185.
<https://doi.org/10.1097/01.lab.0000056993.28149.bf>
15. *Qu WR, Zhu Z, Liu J, Song DB, Tian H, Chen BP, Li R, Deng LX* (2021) Interaction between Schwann cells and other cells during repair of peripheral nerve injury. *Neural Regen Res* 16(1): 93–98.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.286956>
16. *Xu J, Wen J, Fu L, Liao L, Zou Y, Zhang J, Deng J, Zhang H, Liu J, Wang X, Zuo D, Guo J* (2021) Macrophage-specific RhoA knockout delays Wallerian degeneration after peripheral nerve injury in mice. *J Neuroinflamm* 18(1): 234.
<https://doi.org/10.1186/s12974-021-02292-y>
17. *Zou Y, Zhang J, Xu J, Fu L, Xu Y, Wang X, Li Z, Zhu L, Sun H, Zheng H, Guo J* (2021) SIRT6 inhibition delays peripheral nerve recovery by suppressing migration, phagocytosis and M2-polarization of macrophages. *Cell Biosci* 11(1): 210.
<https://doi.org/10.1186/s13578-021-00725-y>
18. *Arvidson B* (1977) Cellular uptake of exogenous horseradish peroxidase in mouse peripheral nerve. *Acta Neuropathol* 37: 35–41.
<https://doi.org/10.1007/BF00684538>
19. *Kolter J, Kierdorf K, Henneke P* (2020) Origin and Differentiation of Nerve-Associated Macrophages. *J Immunol* 204(2): 271–279.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901077>
20. *Ydens E, Amann L, Asselbergh B, Scott CL, Martens L, Sichien D, Mossad O, Blank T, De Prijck S, Low D, Masuda T, Saeys Y, Timmerman V, Stumm R, Ginhoux F, Prinz M, Janssens S, Guillems M* (2020) Profiling peripheral nerve macrophages reveals two macrophage subsets with distinct localization, transcriptome and response to injury. *Nat Neurosci* 23(5): 676–689.
<https://doi.org/10.1038/s41593-020-0618-6>
21. *Petrova ES, Kolos EA* (2021) Nerve fiber regeneration in the rat sciatic nerve after injury and administration of mesenchymal stem cells. *Neurosci Behav Physiol* 51(4): 513–518.
<https://doi.org/10.1007/s11055-021-01098-y>
22. *Gusel'nikova VV, Razenkova VA, Kirik OV, Nikitina IA, Pavlova VS, Zharkina SI, Korzhevskii DE* (2024) Detection of tissue macrophages in different organs using antibodies to the microglial marker Iba-1. *Dokl Biochem Biophys* 519(1): 506–511.
<https://doi.org/10.1134/S160767292470114X>
23. *Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, Sasaki Y, Kohsaka S* (2000) Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci* 113: 3073–3084.
<https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.3073>

24. *Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS* (2011) Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammat* 30(8): 110.
<https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-110>
25. *Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJ, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, Amann L, Staszewski O, Kierdorf K, Krueger M, Locatelli G, Hochgerner H, Zeiser R, Epelman S, Geissmann F, Priller J, Rossi FM, Bechmann I, Kerschensteiner M, Linnarsson S, Jung S, Prinz M* (2016) Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol* 17(7): 797–805.
<https://doi.org/10.1038/ni.3423>
26. *Abuzan M, Surugiu R, Wang C, Mohamud-Yusuf A, Tertel T, Catalin B, Doeppner TR, Giebel B, Hermann DM, Popa-Wagner A* (2025) Extracellular Vesicles Obtained from Hypoxic Mesenchymal Stromal Cells Induce Neurological Recovery, Anti-inflammation, and Brain Remodeling After Distal Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Transl Stroke Res* 16(3): 817–830.
<https://doi.org/10.1007/s12975-024-01266-5>
27. *McKay SM, Brooks DJ, Hu P, McLachlan EM* (2007) Distinct types of microglial activation in white and grey matter of rat lumbosacral cord after mid-thoracic spinal transection. *J Neuropathol Exp Neurol* 66(8): 698–710.
<https://doi.org/10.1097/nen.0b013e3181256b32>
28. *Кокряков ВН* (2006) Очерки о врожденном иммунитете. Санкт-Петербург. Наука. [*Kokryakov VN* (2006) Essays on innate immunity. Sankt-Peterburg. Nauka. (In Russ)].
29. *Balog BM, Sonti A, Zigmond RE* (2023) Neutrophil biology in injuries and diseases of the central and peripheral nervous systems. *Prog Neurobiol* 228: 102488.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2023.102488>
30. *Yamamoto Y, Kadoya K, Terkawi MA, Endo T, Konno K, Watanabe M, Ichihara S, Hara A, Kaneko K, Iwasaki N, Ishijima M* (2022) Neutrophils delay repair process in Wallerian degeneration by releasing NETs outside the parenchyma. *Life Sci Alliance* 5(10): e202201399.
<https://doi.org/10.26508/lsa.202201399>
31. *Marwick JA, Mills R, Kay O, Michail K, Stephen J, Rossi AG, Dransfield I, Hirani N* (2018) Neutrophils induce macrophage anti-inflammatory reprogramming by suppressing NF-κB activation. *Cell Death Dis* 9: 665.
<https://doi.org/10.1038/s41419-018-0710-y>
32. *Liu Y, Zhao C, Zhang R, Pang Y, Li L, Feng S* (2024) Progression of mesenchymal stem cell regulation on imbalanced microenvironment after spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther* 15(1): 343.
<https://doi.org/10.1186/s13287-024-03914-x>
33. *Kim Y, Jo SH, Kim WH, Kweon OK* (2015) Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther* 6: 229.
<https://doi.org/10.1186/s13287-015-0236-5>
34. *Sun Z, Wei W, Liu H, Ma J, Hu M, Huang H* (2018) Acute Response of Neurons: An Early Event of Neuronal Cell Death After Facial Nerve Injury. *World Neurosurg* 109: e252–e257.
<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.09.157>
35. *Liu Y, Wang H* (2020) Peripheral nerve injury induced changes in the spinal cord and strategies to counteract/enhance the changes to promote nerve regeneration *Neural Regen Res* 15(2): 189–198.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.265540>
36. *Hsu SH, Kuo WC, Chen YT, Yen CT, Chen YF, Chen KS, Huang WC, Cheng H* (2013) New nerve regeneration strategy combining laminin-coated chitosan conduits and stem cell therapy. *Acta Biomater* 9(5): 6606–6615.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.01.025>
37. *Masgutov R, Masgutova G, Mullakhmetova A, Zhuravleva M, Shulman A, Rogozhin A, Syromiatnikova V, Andreeva D, Zeinalova A, Idrisova K, Allegrucci C, Kiyasov A, Rizvanov A* (2019) Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Applied in Fibrin Glue Stimulate Peripheral Nerve Regeneration. *Front Med* 6: 68.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00068>
38. *Kholodenko IV, Kholodenko RV, Majouga AG, Yarygin KN* (2022) Apoptotic MSCs and MSC-derived apoptotic bodies as new therapeutic tools. *Current Issues Mol Biol* 44(11): 5153–5172.
<https://doi.org/10.3390/cimb44110351>

Response of Endoneurium-Resident Macrophages and Neutrophils to Sciatic Nerve Injury and Mesenchymal Cell Transplantation in Rats

E. S. Petrova^{a,*}, and E. A. Kolos^a

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

**e-mail: iempes@yandex.ru*

The aim of this work was to study the distribution of resident macrophages and neutrophils in the endoneurium of the rat sciatic nerve early after injury and subperineural administration of MSCs. To clarify the reaction of these cells to peripheral nerve injury, an experimental model of rat sciatic nerve injury was used by ligation (for 40 s) using cell therapy. To identify endoneurium macrophages, an immunohistochemical reaction to the calcium-binding protein Iba-1, a marker of mononuclear phagocytes, was used. Neutrophils were examined on preparations stained with hematoxylin and eosin and toluidine blue. It was found that activation of resident macrophages in the endoneurium of the rat sciatic nerve occurs as early as 1 hour after injury, several hours earlier than neutrophils migrate from the blood vessels to the endoneurium. This indicates that resident macrophages are the first to respond to damage and contribute to the development of Wallerian degeneration processes. It is shown that the use of subperineural transplantation of MSCs leads to a decrease in the activation of resident macrophages and migration of neutrophils. Possible reasons for the established facts are discussed.

Keywords: nerve regeneration, subperineural transplantation of MSCs, resident macrophages, neutrophils, immunohistochemistry