

Гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор індукує міграцію нерезидентних клітин до внутрішньомозкового крововиливу

А. В. Кураєва¹*, С. І. Савосько^{1,2}, О. М. Грабовий¹, О. М. Макаренко²

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна, ²Приватне акціонерне товариство «Вищий навчальний заклад «Міжрегіональна Академія управління персоналом», м. Київ, Україна

А – концепція та дизайн дослідження; В – збір даних; С – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Ключові слова:

внутрішньомозковий крововилив, гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор росту, CD44, CD68, CD146.

Запорізький медичний журнал. 2023. Т. 25, № 6(141). С. 528-534

*E-mail:

liena.lana1@gmail.com

Мета роботи – дослідити вплив гранулоцитарного колонієстимулювального фактора (ГКСФ) на появу в ділянці внутрішньомозкового крововиливу (ВК) нерезидентних клітин, що потенційно можна визначити як мезенхімальні стовбурові.

Матеріали та методи. В експерименті щурам моделювали однібічний ВК шляхом введення аутологічної крові в праву гемісферу. Імуногістохімічним методом дослідили ділянку навколо гематоми через 1, 3, 10, 30 і 60 діб після моделювання ВК. Оцінювали появу клітин, які експресують CD44, CD68 і CD146 маркери за трибальною шкалою після пенетруючої травми (ПТ) мозку, ВК і ВК із введенням фактора росту (ВК/ГКСФ).

Результати. ВК, на відміну від ПТ, інтенсифікував інфільтрацію перигематомної ділянки мозку CD44+ клітинами і викликав появу в ній CD68+ і CD146+ клітин. Питома щільність CD44+ клітин зменшилася через 60 діб після ВК, а дія ГКСФ полягала у зменшенні щільності CD44+ клітин через 30 і 60 діб. Появу CD68+ і CD146+ клітин у ділянці крововиливу встановлено через 10 діб, надалі їх визначали рідко, а після введення ГКСФ інфільтрацію клітин з таким імунофенотипом реєстрували через 3 доби після ВК із тенденцією до накопичення.

Висновки. Інфільтрація у перигематомну ділянку мозку щурів клітин, які експресують CD44, CD68 і CD146, неоднорідна за часом після пошкодження мозку. Поява клітин цього імунофенотипу могла бути пов'язана з елімінацією гематоми, процесами ангіогенезу й іншими механізмами ремоделювання перигематомної ділянки мозку, в які залучені мезенхімальні стовбурові клітини. ГКСФ модулював міграцію CD68+ і CD146+ клітин, що полягало у більш ранній та інтенсивнішій їх міграції у пошкоджену ділянку мозку після ВК.

Key words:

intracerebral hemorrhage, granulocyte colony-stimulating growth factor, CD44, CD68, CD146.

Zaporozhye medical journal, 2023. 25(6), 528-534

Granulocyte colony-stimulating factor induces the migration of non-resident cells to intracerebral hemorrhage

A. V. Kuraieva, S. I. Savosko, O. M. Grabovyi, O. M. Makarenko

The aim of the study is to determine the effect of granulocyte colony-stimulating factor (rHuG-CSF) on the migration of non-resident cells into the region of intracerebral hemorrhage (ICH), which can potentially be considered as mesenchymal stem cells.

Materials and methods. In the experiment, unilateral ICH was simulated in rats by injection of autologous blood into the right hemisphere. Immunohistochemical method was used to study perihematoma area on day 1, 3, 10, 30, and 60 after ICH modeling. The appearance of cells expressing CD44, CD68, and CD146 markers was evaluated on a 3-point scale after penetrating trauma (PT) of the brain, ICH, and ICH with the growth factor injection (ICH/rHuG-CSF).

Results. In contrast to PT, ICH intensified the infiltration of CD44+ cells in the perihematoma area of the brain and caused the appearance of CD68+ and CD146+ cells in hemorrhage. The specific density of CD44+ cells was decreased on day 60 after ICH, and the effect of rHuG-CSF consisted in reducing the density of CD44+ cells on days 30 and 60. The appearance of CD68+ and CD146+ cells in the perihematoma area was seen after 10 days and further their detection was rare, while after the rHuG-CSF injection, the infiltration by cells with a similar immunophenotype was detected on day 3 ICH with a tendency to accumulate.

Conclusions. Infiltration by cells expressing CD44, CD68, and CD146 into the perihematoma area of the rat brain was heterogeneous as to the time after brain injury. The appearance of cells with specified immunophenotype could be associated with hematoma elimination, angiogenesis processes, and other mechanisms of the perihematoma brain region remodeling, in which mesenchymal stem cells were involved. rHuG-CSF modulated the migration of CD68+ and CD146+ cells, which consisted in their earlier and more intense migration to the damaged area of the brain after ICH.

Внутрішньомозковий крововилив (ВК) – тяжке ураження мозку, що призводить до дегенерації нейронів і значного функціонального дефіциту. Ствобурові клітини та їхню роль у відновних процесах пошкодженого мозку визначають як потенційний напрям лікування, але кінцеві результати менші за очікувані [1]. Певне покращення функції верхніх кінцівок, спастичності та дрібної моторики в пацієнтів з інсультом досягнуто через рік після введення аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин пуповини [2]. В експериментах доведено, що трансплантація стов-

бурових клітин прискорює розвиток незрілих нейронів у корі мозку та суправентрикулярній зоні [3], але понад 80 % диференційованих клітин гинуть у перші тижні, й доцільність введення стовбурових клітин залишається дискусійною [4]. Тому перспективним напрямом у цьому контексті є вплив на ендогенний пул стовбурових клітин через специфічну терапію [5].

Збільшити кількість стовбурових клітин, що циркулюють, можна шляхом введення гранулоцитарного колонієстимулювального фактора (ГКСФ) [6].

ГКСФ – цитокін, що посилює мієлопоєз і вихід із кісткового мозку стовбурових клітин у кров [7]. Цим мобілізують кров'яний пул стовбурових клітин для збору з метою трансплантації [8]. ГКСФ викликає появу в крові донорів CD34+ клітин, але зменшує мобілізацію клітин, що експресують CD44 та CD31 у здорових осіб [9] та онкохворих [10,11].

Є гіпотеза, що ГКСФ мобілізує стовбурові клітини до ділянки пошкодження мозку після крововиливу, впливаючи в такий спосіб на відновні процеси. Один із можливих впливів стовбурових клітин на ділянку ураження мозку – їх місцеве накопичення та диференціація в орган-специфічні клітини або шляхом секреції факторів із потенційним нейропротекторним чи іншим ефектом [5]. На моделях ішемічного та травматичного пошкодження мозку показано зменшення об'єму інфаркту, інфільтрації нейтрофілів і Т-лімфоцитів [12], збільшення проліферації та диференціації клітин-попередників олігодендроцитів [13].

Разом із цим, ГКСФ у нервовій системі чинить нейропротекторну дію, впливає на нейро- та ангиогенез [14]. Нейрони кори мозку, субвентрикулярної зони та мозочка експресують рецептор до ГКСФ, тому підвищена експресія ГКСФ і його рецептора при гіпоксії вказує на потенційно нову стратегію впливу на відновлення мозку при інсульті [15,16].

У цій роботі вивчали часовий профіль ефектів ГКСФ щодо появи нерезидентних клітин, які можна визначити як мезенхімальні стовбурові клітини. Передбачаємо, що мобілізаційні ефекти ГКСФ щодо стовбурових клітин можуть позначитися на змінах перигематомної ділянки мозку.

Мета роботи

Дослідити вплив гранулоцитарного колонієстимулювального фактора на появу в ділянці внутрішньомозкового крововиливу нерезидентних клітин, що потенційно можна визначити як мезенхімальні стовбурові.

Матеріали і методи дослідження

Експерименти здійснили на 128 щурах самцях лінії Wistar, маса тіла – 200–215 г. Тваринам моделювали однібічний внутрішньомозковий крововилив (ВК) шляхом введення в мозок аутологічної крові з формуванням стандартизованої локалізації гематоми. Для цього тваринам під наркозом (тіопентал натрію, 50 мг/кг, внутрішньоочеревинно) розрізали попередньо поголену шкіру, робили трепанаційний отвір діаметром 1,0 мм, вводили аутологічну кров в об'ємі 0,02 мл (без коагулянтів; застосували зафіксований у рамці шприц об'ємом 1,0 мл). Голку залишали зафіксованою, не виводили з мозку, і через 10 хвилин повторно вводили кров у тому самому об'ємі. Координати введення крові в головний мозок розраховували за стереотаксичним атласом (L = 3,0–4,0; H = 4,0–6,0; AP = -1,0–3,0). Після цього голку вилучали, рану зашивали поліамідним філаментом 2 USP, зрошували розчином повідон-йоду. Аутологічну кров одержали з хвостової вени.

Контрольні групи – тварини з пенетруючою травмою (ПТ) та інтактні щури. ПТ моделювали аналогічним

методом: трепанаційний отвір, введення голки, але без ін'єкції крові.

Отже, у дослідженні сформували 4 групи: контрольна інтактна група (n = 8), група з ПТ (n = 40), група з ВК (n = 40), група з ВК і ГКСФ (ВК/ГКСФ) (n = 40). Тварин в останніх трьох групах рандомно поділили за п'ятьма термінами спостереження по 8 особин (1, 3, 10, 30 і 60 доби після операції). ГКСФ (rHuG-CSF, Sanofi) вводили підшкірно один раз через 1, 2 і 3 доби після моделювання ВК у дозі 50 мг/кг.

Щурів виводили з експерименту, попередньо наркотизувавши тіопенталом натрію в летальній дозі. Далі отримували доступ до серця тварин, виконували інтракардіальну перфузію (фізіологічним розчином в об'ємі 200 мл, а потім розчином, що містив 4 % формальдегіду та 0,9 % натрію хлориду, в об'ємі 200 мл, 4 °С). Головний мозок вилучали та поміщували у останній розчин (рН 7,4, 24 год, 4 °С). Виконавши два фронтальні розрізи з кожного головного мозку, одержали фрагменти завтовшки 3 мм (на рівні треку введення голки). Зразки мозку зневоднювали в ізопропанолі, ущільнювали в парапласті (Leica Surgipath Paraplast Regular). У фронтальних зрізах мозку завтовшки 4 μm імуногістохімічним методом виявляли CD44, CD68 та CD146 за протоколом виробника антитіл.

Використали мишаче моноклональне антитіло проти CD44 (Abcam, ab238464, США); мишаче моноклональне антитіло проти CD68 (Abcam, ab201340, США), кроляче поліклональне антитіло проти CD146 (Abcam, ab203118, США). Усі первинні антитіла застосували в розведенні 1:200. Продукти реакції візуалізували за допомогою системи детекції на основі діамінобензидину (EnVision FLEX; Dako, Glostrup, Данія). Інкубацію зрізів з антитілами здійснили при 24 °С (з первинними та вторинними протягом 20 хв і 10 хв відповідно). Як позитивний контроль використали зрізи мозку щурів із позитивною експресією білка. Для негативних контролів виконали всі процедури, крім застосування первинних антитіл.

Препарати дослідили під мікроскопом Olympus BX51, сфотографували цифровою камерою Olympus C3040ZOOM, оцінили за допомогою програмного забезпечення Olympus DP-Soft 3.2 (Olympus, Токіо, Японія).

Оцінювали активність появи нерезидентних клітин навколо ВК за шкалою: 1 бал – виявлено поодинокі клітини; 2 бали – групи клітин навколо гематоми; 3 бали – множинні скупчення в гематомі та навколо неї.

Статистично результати опрацювали в програмі StatPlus (7.0) (AnalystSoft Inc.). Використали однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA з поправкою Бонферроні. Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Усі маніпуляції з тваринами здійснили, дотримуючись біоетичних норм. Протокол експерименту затверджено Комісією з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (протокол від 26.09.2022 № 160).

Результати

Досліджено структурні зміни навколо гематоми в головному мозку щурів із ВК і треку введення голки у тварин із ПТ.

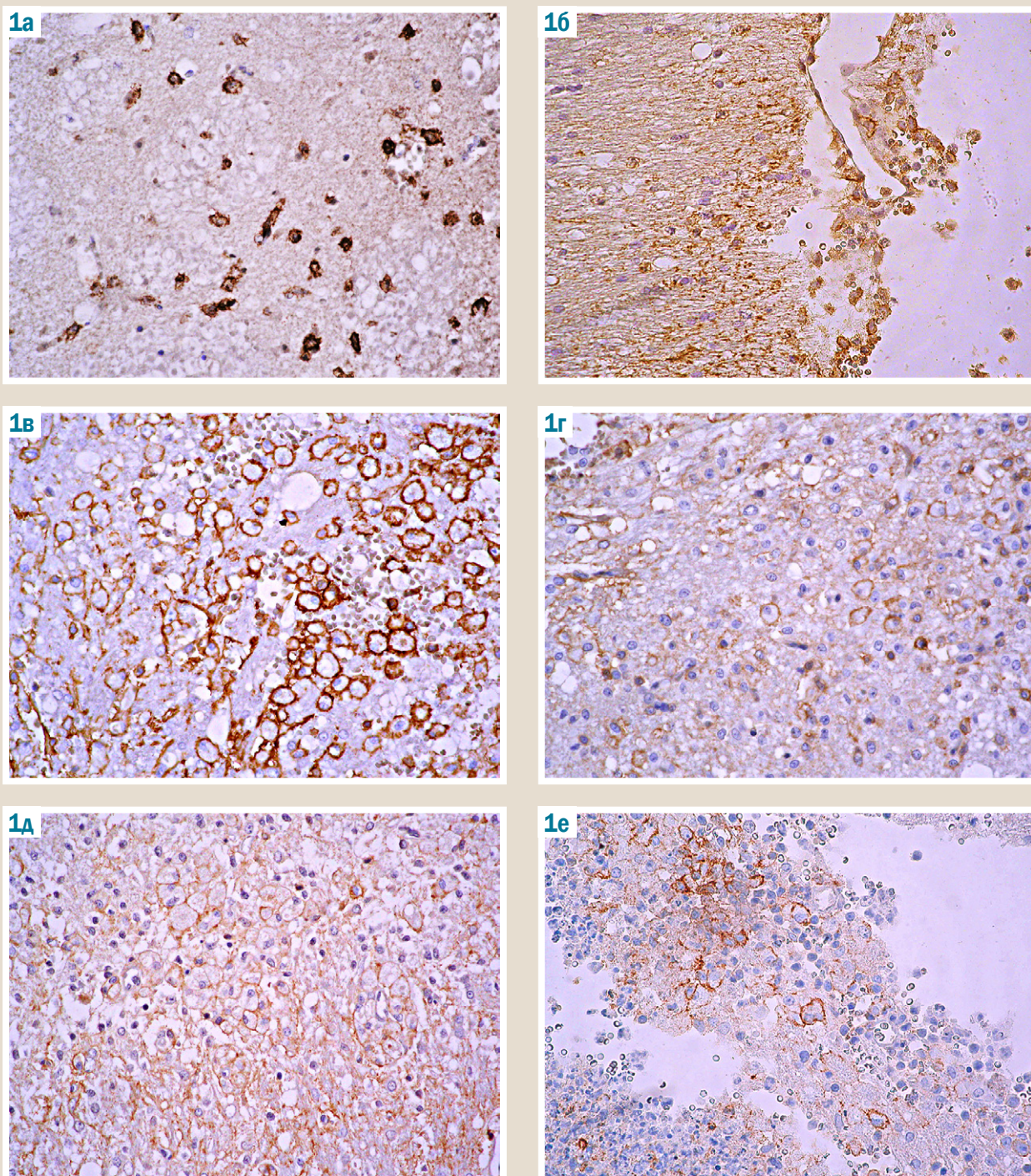


Рис. 1. Інфільтрація CD44+ клітин у ділянці крововиливу через 1, 3 і 10 днів після моделювання ВК (а, в, д) та введення ГКСФ (б, г, е). а, б: 1 доба; в, г: 3 доба; д, е: 10 доба. 3б. ×400.

Загальноморфологічні особливості ділянки ВК: через 1 добу після операції зареєстрували тільки крововилив; через 3 доби виявили великі за діаметром клітини з бластоподібним фенотипом по контуру гематоми; через 10 днів – часткову елімінацію гематоми та ремоделювання перигематомної ділянки з ангиогенезом; через 30 днів крововилив майже повністю елімінований, а на його місці визначили клітинні тяжі; через 60 днів виявили ознаки організації стінки псевдокісти, в її просвіті також

реєстрували клітинні тяжі, поодинокі бластоподібні клітини. У групі з ПТ через 1 і 3 доби визначили формені елементи крові по треку введення голки; в останні три терміни фіксували поодинокі або дрібні групи бластоподібних клітин на місці елімінованих еритроцитів. Поява таких клітин більш виражена після моделювання ВК, ніж після ПТ мозку.

Під час імуногістохімічних досліджень виявлено CD44+, CD68+ та CD146+ клітини у перигематомній

ділянки ВК, а після ПТ – тільки CD44+. Клітини, що експресують CD44+, частіше і з більшою інтенсивністю мігрували до ділянки пошкодження мозку, ніж CD68+ і CD146+ (рис. 1). Після ПТ мозку спостерігали появу поодиноких CD44+ клітин або їх малих груп через 1, 3 та 10 діб досліджу, а через 30 і 60 діб їх виявляли рідко. У групі з ВК CD44+ клітини реєстрували в усі п'ять термінів спостереження; пік міграції – через 3 і 10 діб, а через 60 діб їхня питома щільність достовірно зменшилась (термін 3 доби проти 60 діб – $p = 0,01$, 10 діб проти 60 діб – $p = 0,02$) (рис. 2а). Міграція CD44+ клітини до гематому більша порівняно з ПТ (через 3, 10 і 60 діб – $p \leq 0,01$). У групі з ВК/ГКСФ динаміка міграції CD44+ клітин навколо крововиливу подібна до такої у групі ВК, але через 1, 30 і 60 діб їхня щільність міграції менша (через 3 і 10 діб значення за шкалою – у межах статистичної похибки). Отже ВК викликав інфільтрацію CD44+ клітин у мозок, а ГКСФ зменшив інтенсивність їх накопичення.

Клітини, що експресують CD68 і CD146, виявляли тільки у групах щурів із ВК, а ПТ не викликала інфільтрацію клітин з подібним імунотипом. У групі ВК відносно рідко реєстрували CD68+ і CD146+ клітини у термін більше ніж 10 діб після пошкодження (рис. 3, 4). CD68+ клітини виявляли рідко, різниця за термінами досліджу статистично не значуща (рис. 2б). Міграція CD146+ клітин мала тенденцію до збільшення на 60 добу порівняно з 30 ($p = 0,05$) (рис. 2в). У групі з ГКСФ їх виявляли на 3 добу моделювання ВК і в наступні терміни (поодинокі або дрібними групами). Встановили тенденцію до інтенсифікації інфільтрації клітинами, що експресують CD68+ і CD146+, гематом і ділянок пошкодження мозку після повної елімінації крововиливу порівняно з групою ВК. За шкалою оцінювання щільність міграції не відрізнялась у різні терміни після введення ГКСФ.

Обговорення

ВК спричиняв істотне пошкодження мозку та появу нерезидентних клітин, що за експресією CD44 і CD146 маркерів потенційно можна визначити як мезенхімальні стовбурові клітини. Зважаючи на те, що після ПТ у пошкодженному мозку виявлено тільки CD44+ клітини, припускаємо, що атракція мезенхімальних клітин зростає зі збільшенням об'єму ураження мозку. Дещо схожі тенденції описано на моделі ішемічного інсульту, де через 7 діб CD44+ клітини активно мігрували до ділянки некрозу мозку [17].

Морфологічні особливості цих клітин дуже подібні до CD44+ клітин, що ми виявили у перифокальній ділянці ВК на 3 і 10 доби. Ґрунтуючись на результатах аналізу експресії тільки CD44, не можна специфічно ідентифікувати конкретну популяцію клітин і визначити їхню роль у реорганізації пошкодженого мозку. Відомо, що CD44 експресують клітини, що активно мігрують. Є підстави вважати виявлені нами клітини неоднорідною популяцією, оскільки через 30 і 60 діб після ВК вони мали відмінну морфологію від клітин, визначених у гострому періоді (діаметр – 15–20 μm проти 7–9 μm , ядерно-цитоплазматичне співвідношення – 1,0:6,7 проти 1,0:3,7).

Є різні дані щодо зв'язку клітин, які експресують CD44, і пошкодження мозку. Так, CD44+ макрофаги утилізують гематому і клітинний детрит [18], нейтро-

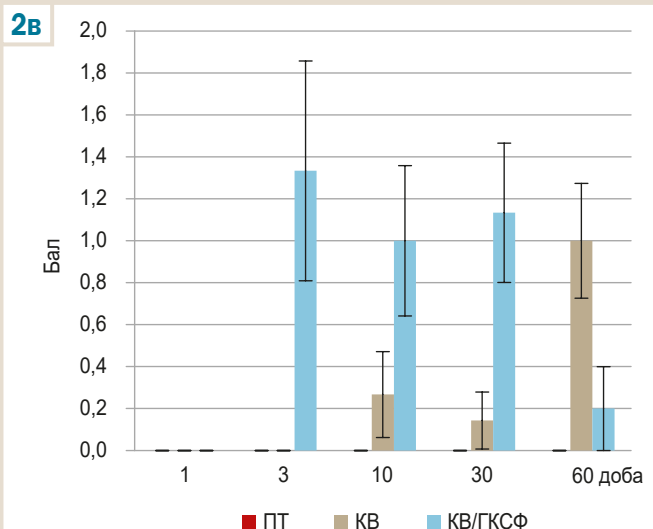
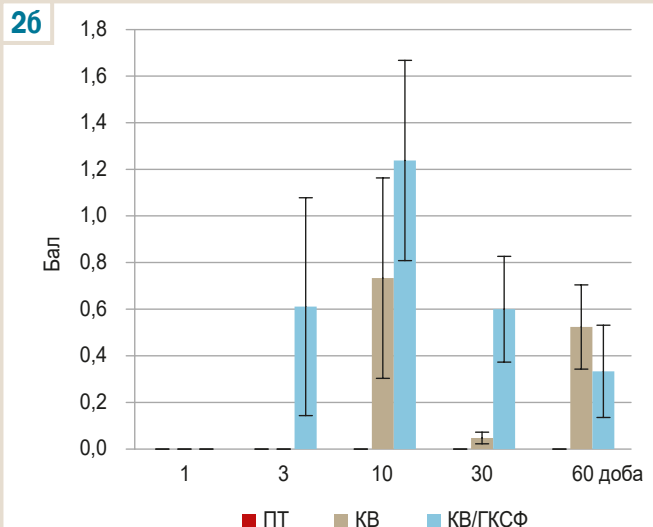
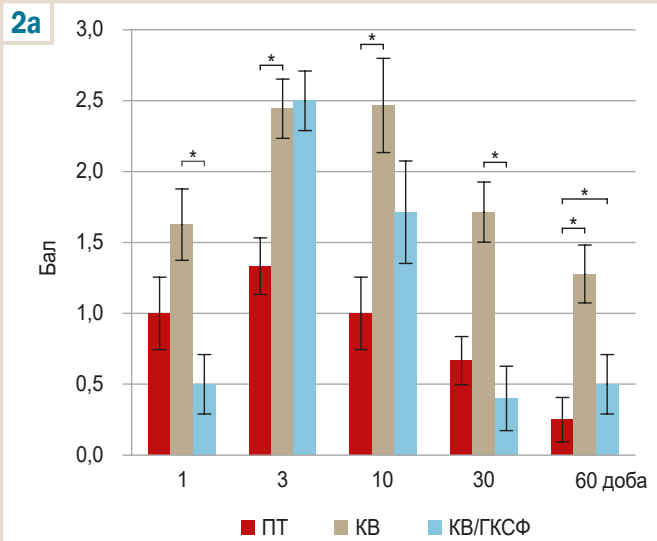


Рис. 2. Вплив ГКСФ на вміст CD44+ (а), CD68+ (б) та CD146+ (в) клітин у ділянці крововиливу в головному мозку щурів із ВК. *: достовірна різниця між групами, $p < 0,05$.

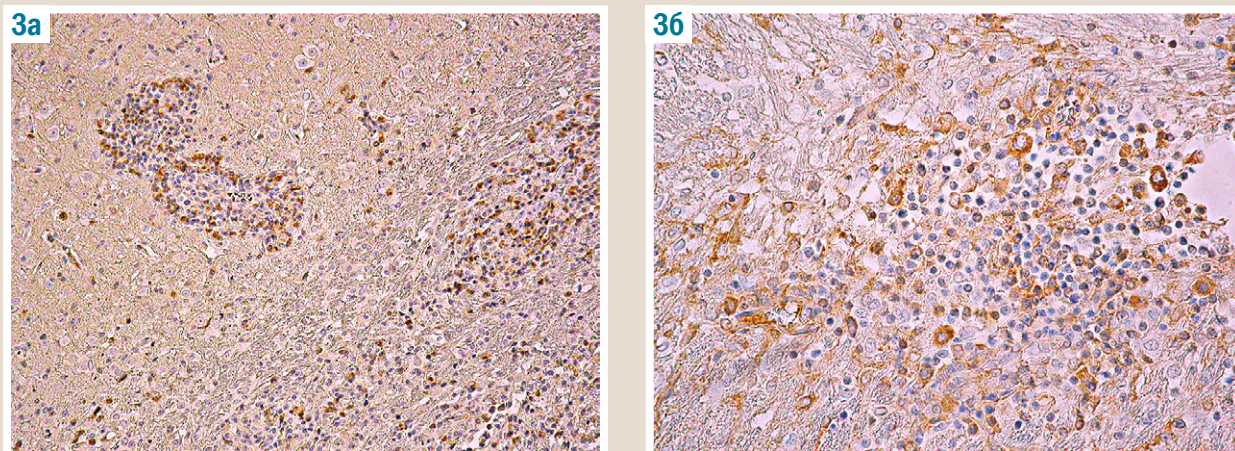


Рис. 3. Інфільтрація CD68+ клітинами перигематомної ділянки через 10 діб після ВК (а) і під впливом ГКСФ (б). 3б. $\times 200$ (а), $\times 400$ (б).

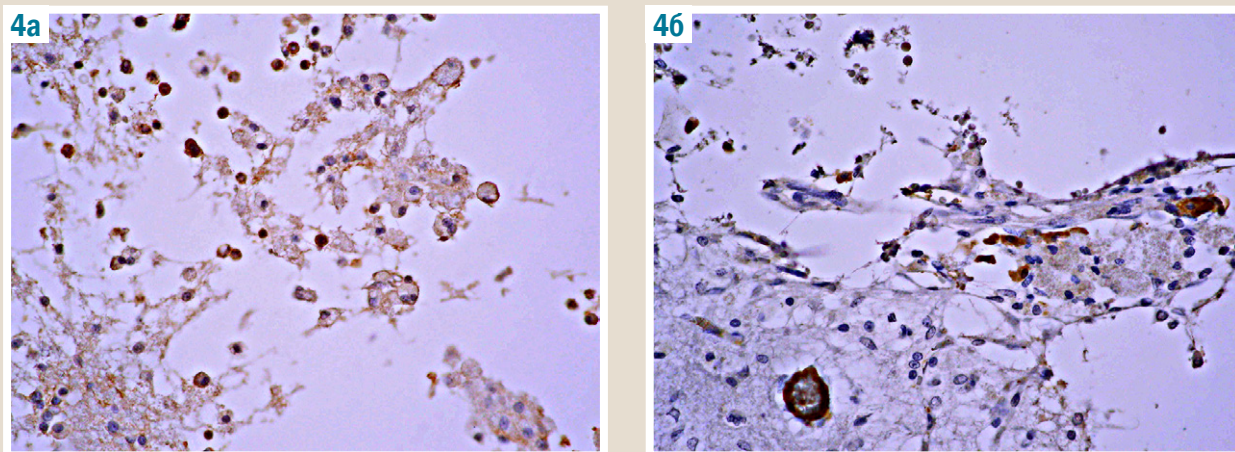


Рис. 4. Поодинокі CD146+ клітини у ділянці крововиливу через 30 діб після моделювання ВК (а) і введення ГКСФ (б). 3б. $\times 400$.

філам і Т-лімфоцитам CD44 необхідний для інфільтрації в ділянку розвитку запалення [19,20]. Під час дослідження, що здійснили, також виявлено активну інфільтрацію CD44+ клітин у гострому періоді та зменшення їхньої щільності в віддалений період після ВК. Хоча макрофаги, що активно фагоцитували клітинний детрит і продукти деградації гемоглобіну (сидерофаги), виявляли ізолювано, вони не експресували на своїй поверхні CD44. Зважаючи на інтенсивну появу CD44+ клітин у перифокальній ділянці ВК, можна припустити їхню роль у ремоделюванні саме навколишньої тканини мозку, яку з певними обмеженнями можна визначати як зону олігемії. В окремих дослідженнях показано: ці клітини можуть бути залучені до розвитку астрогліозу та гліального рубця, оскільки активовані астроцити та гліальні клітини-попередники також експресують CD44 [21,22]. У цьому контексті є дані про негативний зв'язок експресії CD44 з нейрональною диференціацією клітин-попередників нейронів, DCX+ клітин [23].

ГКСФ також викликав інфільтрацію CD44+ клітин, але у віддалений термін спостереження їхня щільність зменшилася, пришвидшилася поява CD68+ і CD146+ клітин. Відомо, що ГКСФ стимулює збільшення гемопоетичних стовбурових клітин CD150+/CD48- клітин [8], CD34+ [9] та Mac-1/Gr-1+ макрофагів селезінки [24], але

може зменшити появу клітин, що експресують CD44 [9]. Припускаємо, що ГКСФ подібним чином стимулював появу CD68+ макрофагів і CD146+ мезенхімальних стовбурових клітин, які потенційно можуть диференціюватися в ендотеліальні клітини, а також, гіпотетично, корегував інфільтрацію клітин, що активно мігрують та експресують CD44. Згідно з клінічними даними, після інсульту в периферичній крові збільшується кількість CD146+ попередників ендотеліальних клітин, але не відомо, чи потрапляють вони в ділянку ураження мозку [25].

Незважаючи на невелику інтенсивність появи клітин з CD146+ імунофенотипом у перигематомній ділянці мозку шурів, виявлені тенденції є підґрунтям для продовження вивчення ефектів ГКСФ на ендогенний пул стовбурових клітин при інсульті.

Отже, ідентифікація мезенхімальних стовбурових клітин у мозку після ВК є доволі складним завданням. Відомо варіабельність експресії кластерів детермінації на поверхні клітин різних популяцій дала змогу ідентифікувати лише окремі з них, зокрема клітини за кожним окремим CD-маркером із трьох досліджених. Результати показали стимулювальний вплив ГКСФ на накопичення CD68+ і CD146+ клітин у ділянці крововиливу, починаючи з 3 доби після пошкодження мозку. За експресією досліджених маркерів їх можна охарактеризувати як

моноцити / макрофаги та мезенхімальні стовбурові клітини-попередники ендотеліоцитів.

Висновки

1. Після пошкодження мозку поява в ділянці травми клітин, що експресують CD44, CD68 і CD146, є асинхронною. CD44+ клітини ідентифікують у всі терміни спостереження (1–60 доба), а поява CD68+ і CD146+ у перигематомній ділянці відбувається через 10 діб після ВК, рідко – в пізніші терміни.

2. ГКФС модулює появу в ділянці пошкодження мозку клітин, що експресують CD68 і CD146, та, ймовірно, зменшує накопичення CD44+ клітин у віддалені терміни.

3. ГКФС стимулює міграцію та накопичення мезенхімальних стовбурових клітин у пошкоджені крововиливом ділянки мозку. Це призводить до швидшого їх ремоделювання.

Перспективи подальших досліджень. Ефекти ГКФС на міграцію клітин до ВК та їхній зв'язок із розвитком гліального рубця навколо гематоми, продукції клітинами факторів росту та закономірностей ремоделювання тканини мозку в гострому та віддаленому періодах є актуальними та потребують додаткового вивчення.

Фінансування

Дослідження здійснено 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 і розробок, що фінансується з державного бюджету, держреєстрація № 0123U101051 (2023–2025).

Конфлікт інтересів:

відсутній.

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

Надійшла до редакції / Received: 14.09.2023

Після доопрацювання / Revised: 03.10.2023

Схвалено до друку / Accepted: 13.10.2023

Відомості про авторів:

Кураєва А. В., аспірант каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-6242-7881

Савосько С. І., канд. біол. наук, доцент каф. гістології та ембріології, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0001-5145-2195

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

ORCID ID: 0000-0001-5705-9909

Макаренко О. М., д-р мед. наук, професор каф. загальномедичних дисциплін, Приватне акціонерне товариство «Вищий навчальний заклад «Міжрегіональна Академія управління персоналом», м. Київ, Україна.

ORCID ID: 0000-0002-6892-2314

Information about the authors:

Kuraieva A. V., PhD student of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

Savosko S. I., PhD, Associate Professor of the Department of Histology and Embryology, Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine.

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

Makarenko O. M., MD, PhD, DSc, Professor of the Department of General Medical Disciplines, Private Joint-Stock Company "Higher education institution "Interregional Academy of Personnel Management", Kyiv, Ukraine.

References

- Harris, D. T. (2014). Stem Cell Banking for Regenerative and Personalized Medicine. *Biomedicines*, 2(1), 50-79. <https://doi.org/10.3390/biomedicines2010050>
- Ercelen, N., Karasu, N., Kahyaoglu, B., Cerezci, O., Akduman, R. C., Ercelen, D., Erturk, G., Gulay, G., Alpaydin, N., Boyraz, G., Monteleone, B., Kural, Z., Silek, H., Temur, S., & Bingol, C. A. (2023). Clinical experience: Outcomes of mesenchymal stem cell transplantation in five stroke patients. *Frontiers in Medicine*, 10, 1051831. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1051831>
- Tajiri, N., Kaneko, Y., Shinozuka, K., Ishikawa, H., Yankee, E., McGrogan, M., Case, C., & Borlongan, C. V. (2023). Stem cell recruitment of newly formed host cells via a successful seduction? Filling the gap between neurogenic niche and injured brain site. *PLoS One*, 8(9), e74857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074857>
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature Medicine*, 8(9), 963-970. <https://doi.org/10.1038/nm747>
- Rolfe, A., & Sun, D. (2015). Stem cell therapy in brain trauma: Implications for repair and regeneration of injured brain in experimental TBI models. In *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects* (pp. 587–596). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18126>
- Bernitz, J. M., Daniel, M. G., Fstchyan, Y. S., & Moore, K. (2017). Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes dormant hematopoietic stem cells without proliferation in mice. *Blood*, 129(14), 1901-1912. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-752923>
- Chen, Y., & Rudolph, K. L. (2021). Granulocyte colony-stimulating factor acts on lymphoid-biased, short-term hematopoietic stem cells. *Haematologica*, 106(6), 1516-1518. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.271205>
- Kaur, S., Sehgal, A., Wu, A. C., Millard, S. M., Batoon, L., Sandrock, C. J., Ferrari-Cestari, M., Levesque, J. P., Hume, D. A., Raggatt, L. J., & Pettit, A. R. (2021). Stable colony-stimulating factor 1 fusion protein treatment increases hematopoietic stem cell pool and enhances their mobilisation in mice. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00997-w>
- Lee, S., Im, S. A., Yoo, E. S., Nam, E. M., Lee, M. A., Ahn, J. Y., Huh, J. W., Kim, D. Y., Lee, S. N., Kim, M. J., Lee, S. J., Chung, W. S., & Seong, C. M. (2000). Mobilization kinetics of CD34(+) cells in association with modulation of CD44 and CD31 expression during continuous intravenous administration of G-CSF in normal donors. *Stem Cells*, 18(4), 281-286. <https://doi.org/10.1634/stemcells.18-4-281>
- Shaida, E. V., Klymnyk, G. I., Pavlyk, S. V., Khranovskaya, N. N., & Skachkova, O. V. (2013). Primenenie pegfilgrastima dlya mobilizatsii stvolovykh kletok perifericheskoi krovi u detei s solidnymi zlokachestvennymi novoobrazovaniyami [Peripheral blood stem cell mobilization with pegfilgrastim in children with solid malignancies]. *Klinicheskaya onkologiya*, (3), 88-90. [in Russian].
- Szmigielska-Kaplon, A., Szemraj, J., Hamara, K., Robak, M., Wolaska, A., Pluta, A., Czernicka, M., Krawczynska, A., Jamrozak, K., Szmigielska, K., Robak, T., & Wierzbowska, A. (2014). Polymorphism of CD44 influences the efficacy of CD34(+) cells mobilization in patients with hematological malignancies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 20(7), 986-991. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.03.019>
- Schabitz, W. R., Kollmar, R., Schwanager, M., Juettler, E., Bardutzky, J., Scholzke, M. N., Sommer, C., & Schwab, S. (2003). Neuroprotective effect of granulocyte colony stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 34(3), 745-751. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000057814.70180.17>
- Qiu, X., Ping, S., Kyle, M., Chin, L., & Zhao, L. (2023). Stem Cell Factor and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Promote Remyelination in the Chronic Phase of Severe Traumatic Brain Injury. *Cells*, 12(5), 705. <https://doi.org/10.3390/cells12050705>
- Modi, J., Menzie-Sudaram, J., Xu, H., Trujillo, P., Medley, K., Marshall, M. L., Tao, R., Prentice, H., & Wu, J. Y. (2020). Mode of action of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) as a novel therapy for

- stroke in a mouse model. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0597-7>
15. Kleinschnitz, C., Schroeter, M., Jander, S., & Stoll, G. (2004). Induction of granulocyte colony-stimulating factor mRNA by focal cerebral ischemia and cortical spreading depression. *Brain research. Molecular brain research*, 131(1-2), 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.08.011>
 16. Schneider, A., Kruger C., Steigleder T., Weber, D., Pitzer, C., Laage, R., Aronowski, J., Maurer, M. H., Gassler, N., Mier, W., Hasselblatt, M., Kollmar, R., Schwab, S., Sommer, C., Bach, A., Kuhn, H. G. & Schabitz, A. W. (2005). The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8), 2083-2098. <https://doi.org/10.1172/JCI23559>
 17. Sawada, R., Nakano-Doi, A., Matsuyama, T., Nakagomi, N., & Nakagomi, T. (2020). CD44 expression in stem cells and niche microglia/macrophages following ischemic stroke. *Stem Cell investigation*, 7, 4. <https://doi.org/10.21037/sci.2020.02.02>
 18. Zhang, G., Zhang, H., Liu, Y., He, Y., Wang, W., Du, Y., Yang, C., & Gao, F. (2014). CD44 clustering is involved in monocyte differentiation. *Acta biochimica et biophysica Sinica (Shanghai)*, 46(7), 540-547. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmu042>
 19. Katayama, Y., Hidalgo, A., Chang, J., Peired, A., & Frenette, P. S. (2005). CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *The Journal of experimental medicine*, 201(8), 1183-1189. <https://doi.org/10.1084/jem.20042014>
 20. Baaten, B. J. G., Tinoco, R., Chen, A. T., & Bradley, L. M. (2012). Regulation of antigen-experienced T cells: Lessons from the quintessential memory marker CD44. *Frontiers in Immunology*, 3, 23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00023>
 21. Naruse, M., Shibasaki, K., Yokoyama, S., Kurachi, M., & Ishizaki, Y. (2013). Dynamic changes of CD44 expression from progenitors to subpopulations of astrocytes and neurons in developing cerebellum. *PloS one*, 8(1), e53109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053109>
 22. Liu, Y., Han, S. S., Wu, Y., Tuohy, T. M., Xue, H., Cai, J., Back, S. A., Sherman, L. S., Fischer, I., & Rao, M. S. (2004). CD44 expression identifies astrocyte-restricted precursor cells. *Developmental biology*, 276(1), 31-46. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.018>
 23. Su, W., Foster, S. C., Xing, R., Feistel, K., Olsen, R. H., Acevedo, S. F., Raber, J., & Sherman, L. S. (2017). CD44 Transmembrane Receptor and Hyaluronan Regulate Adult Hippocampal Neural Stem Cell Quiescence and Differentiation. *Journal of biological chemistry*, 292(11), 4434-4445. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774109>
 24. Xie, M., Zhang, S., Dong, F., Zhang, Q., Wang, J., Wang, C., Zhu, C., Zhang, S., Luo, B., Wu, P., & Ema, H. (2021). Granulocyte colony-stimulating factor directly acts on mouse lymphoid-biased but not myeloid-biased hematopoietic stem cells. *Haematologica*, 106(6), 1647-1658. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.239251>
 25. Nadar, S. K., Lip, G. Y., Lee, K. W., & Blann, A. D. (2005). Circulating endothelial cells in acute ischaemic stroke. *Thrombosis and Haemostasis*, 94(4), 707-712. <https://doi.org/10.1160/TH04-12-0795>