УДК 616-002.2-02:547.458.1]-008.853-092.9:615.211
DOI: 10.24061/1727-0847.23.3.2024.46

В. О. Шевченко, О. О. Павлова
Кафедра загальної та клінічної патофізіології імені Д. О. Альперна (зав. – проф. М. С. Мирошниченко) Харківського національного медичного університету

ДИНАМІКА ЗМІН КЛІТИННОГО СКЛАДУ ВОГНИЩА ХРОНІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ НА ТЛІ ВВЕДЕННЯ ДАБІГАТРАНУ ЕТЕКСИЛАТУ

Резюме. Запалення – це природна захисна реакція організму на інфекції та пошкодження, яка сприяє знищенню патогенів і відновленню тканин для забезпечення гомеостазу. Воно запускається у відповідь на молекулярні патерни, асоційовані з патогенами або пошкодженням, що ініціюють складний процес залучення та активації гемопоетичних і негемопоетичних клітин, таких як нейтрофіли, макрофаги, фібробласти тощо. Ці клітини взаємодіють для координації репарації та регенерації тканин. Коли цей процес контрольований, структура тканини відновлюється належним чином. Проте, якщо запалення стає хронічним або неконтрольованим, може розвинутись патологічний фіброз, що порушує функцію тканин і може призвести до органної недостатності або смерті. Тому процеси загоєння повинні бути суворо регульованими для підтримання нормальної тканинної функції.
Мета дослідження: дослідити динаміку змін клітинного складу вогнища вторинно хронічного карагінанового запалення на тлі введення інгібітора тромбіну дабігатрану етексилату.
Матеріал і методи. Дослідження виконано на 72 дорослих щурах-самцях лінії WAG, масою 180,0-200,0 г. Модель запалення – вторинно хронічне асептичне запалення, викликане внутрішньом'язовою ін'єкцією в ділянку правого стегна 10,0 мг λ-карагінану. Інгібітор тромбіну дабігатрану етексилат вводили внутрішньошлунково через зонд у дозі 15 мг/кг/добу щодня. Досліджували динаміку змін клітинного складу вогнища запалення на 1-шу, 7-му, 14-ту, 21-шу і 28-му доби проведення експерименту.
Результати. Дослідження динаміки змін клітинного складу вогнища вторинно хронічного карагінанового запалення на тлі введення інгібітора тромбіну дабігатрану етексилату підтверджує його здатність впливати на перебіг запального процесу. Піки накопичення базофілів та еозинофілів спостерігалися на 1-шу добу, після чого їх кількість поступово зменшувалась з переважною локалізацією в периферичних ділянках вогнищ запалення. Лімфоцити, моноцити та плазматичні клітини також досягли своїх пікових значень у центральних ділянках вогнищ запалення на 1-шу добу. Кількість нейтрофілів на 1-шу добу теж була високою в обох експериментальних групах (піковою для периферії вогнища запалення). У центральних ділянках пік накопичення нейтрофілів у групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату відбувся на 14-ту добу, що пізніше, ніж у групі з природним перебігом запалення, де він припав на 7-му добу, хоча і з меншим абсолютним числом клітин. Дана затримка супроводжувалась менш вираженим некрозом та переважанням гнійного процесу. Фібробласти визначались на 7-му добу лише в периферійних ділянках вогнищ запалення обох експериментальних груп. У центральних ділянках вони фіксувались на 14-ту добу у щурів з природним перебігом запаленням, тоді як у щурів з введенням дабігатрану етексилату – лише на 21-шу добу. Кількість макрофагів у центральних ділянках на 14-ту добу збільшилася втричі у щурів з природним перебігом запалення, на відміну від щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату, де такий приріст відбувся лише на 21-шу добу, коли відбулось вирівнювання кількості клітинних елементів у цей та подальший термін. Загалом, у порівнянні з природним перебігом, за запалення на тлі введення інгібітора тромбіну спостерігалася затримка організаційних процесів та проліферації фібробластів і макрофагів, які розпочиналися пізніше.
Висновки. Введення інгібітора тромбіну дабігатрану етексилату суттєво впливає на динаміку кількості нейтрофілів, макрофагів і фібробластів у вогнищах запалення, подовжуючи ексудативну фазу та сповільнюючи процеси проліферації та організації. Це призводить до більш тривалого гнійного запалення та затримки репаративних і регенеративних процесів у порівнянні з природним перебігом запалення. Проте, на 21-шу добу кількість фібробластів і макрофагів у запальних вогнищах щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату стає подібною до такої у групі з природним перебігом, що свідчить про превалювання репаративно-регенеративних процесів, які відбуваються переважно в периферичних ділянках, особливо у групі щурів із введенням дабігатрану етексилату.
Ключові слова: клітинний склад вогнища, вторинно хронічне карагінанове запалення, сполучна тканина, тромбін, інгібітор тромбіну, щури.

Запалення є природним захисним механізмом організму, який забезпечує захист від інфекцій та інших ушкоджень. Воно ініціює знищення патогенів, а також процеси відновлення тканин, допомагаючи відновити гомеостаз в інфікованих або пошкоджених ділянках [1].

Репарація та регенерація є критично важливими біологічними процесами відновлення тканин, які мають фундаментальне значення для виживання всіх живих організмів [2]. Коли тканини пошкоджуються через інфекцію або внаслідок токсичного чи механічного впливу, індукується запальна реакція у відповідь на молекулярні патерни, пов'язані з пошкодженням та патогеном, які вивільняються мертвими і вмираючими клітинами та патогенними мікроорганізмами, відповідно [3]. Ці молекулярні тригери викликають складну запальну реакцію, що характеризується рекрутуванням, проліферацією та активацією різних гемопоетичних і негемопоетичних клітин, зокрема нейтрофілів, макрофагів, природних лімфоїдних клітин, природних кілерів, В-клітин, Т-клітин, фібробластів, епітеліальних клітин, ендотеліальних клітин і стовбурових клітин. Ці клітини разом формують клітинну відповідь, що координує процес відновлення тканин [4].

Коли процес загоєння ран добре організований і контрольований, запальна реакція швидко завершується, і нормальна структура тканин відновлюється. Однак, якщо процес загоєння рани стає хронічним або неконтрольованим, це може призвести до розвитку патологічного фіброзу або рубцювання, що порушує нормальну функцію тканин і, зрештою, призводить до органної недостатності чи навіть смерті [5]. Саме тому процеси загоєння ран повинні бути жорстко регульованими.

Хоча багато типів клітин беруть участь у відновленні тканин, саме макрофаги, завдяки їхній високій функціональній пластичності [6], проявляють ключову регуляторну активність на всіх етапах відновлення тканин та фіброзу [7, 8]. Окрім цього, макрофаги здатні регулювати й саме запалення та усувати нейропатичний біль [9, 10].

Макрофаги виступають як клітини-прибиральники, фагоцитуючи клітинні залишки, патогени, нейтрофіли та інші апоптичні клітини після пошкодження тканин [11]. Також, макрофаги є важливим джерелом хемокінів, матриксних металопротеїназ та інших медіаторів запалення, які стимулюють клітинну відповідь на початкових етапах після травми [7]. Після ушкодження тканин макрофаги, як рекрутовані, так і резидентні, проліферують і зазнають значних фенотипових та функціональних змін під впливом факторів росту і цитокінів, що вивільняються в тканинному мікросередовищі. Це дозволяє їм виконувати специфічні функції на кожному етапі відновлення тканин [12, 13].

Оскільки ці імунні клітини є потенційно важливими терапевтичними мішенями, значно зріс інтерес до вивчення ролі різних популяцій макрофагів у контролі ініціації, підтримки та завершення процесів загоєння ран у різних органах і системах [14]. Дослідження підкреслюють спеціалізовану та критичну роль різних популяцій моноцитів і макрофагів у процесах репарації, регенерації та фіброзу [15-17].

Порушення функцій макрофагів на будь-якому з етапів їх активації може призвести до аномального відновлення тканин. Наприклад, неконтрольоване вироблення медіаторів запалення і/або факторів росту, недостатнє утворення протизапальних макрофагів, чи порушення зв'язку між макрофагами та епітеліальними клітинами, ендотеліальними клітинами, фібробластами, стовбуровими клітинами, або тканинними клітинами-попередниками – все це сприяє стану персистуючого ушкодження, що може призвести до розвитку патологічного фіброзу [14].

Після травми фіброз відіграє важливу роль у відновленні тканин через синтез та депонування компонентів сполучної тканини, таких як колаген та інші волокна і компоненти позаклітинного матриксу, з метою відновлення початкової структури тканини. Міофібробласти є ключовими клітинами, відповідальними за синтез цих компонентів. Під впливом запальних факторів вони можуть утворюватися з фібробластів, макрофагів, ендотеліальних клітин та інших клітинних популяцій [18]. Пошкодження тканин активує локальне запалення, і запальні цитокіни сприяють трансформації цих клітин у міофібробласти [19].

Останні дослідження свідчать, що інші клітини, зокрема епітеліальні, також реагують на запальні стимули та можуть відігравати роль у хронічному запаленні. Наприклад, мезотеліальні клітини очеревини здатні до трансдиференціації під впливом запальних стимулів, набуваючи здатності продукувати запальні цитокіни та активні форми кисню (АФК), що робить їх важливими учасниками запальних реакцій [20-22]. Завдяки цій трансформації, мезотеліальні клітини приєднуються до імунної відповіді організму, посилюючи та пролонгуючи запальний процес [19].

Отже, поглиблене вивчення ролі тромбіну в механізмах хронізації запалення сприятиме вдосконаленню патогенетичної терапії хронічних запальних процесів і стане основою для розробки нових класів препаратів, здатних не лише ефектив-

но контролювати хронічні запальні захворювання, але й запобігати їх прогресуванню та ускладненням, з мінімальними побічними ефектами [23].

Мета дослідження: дослідити динаміку змін клітинного складу вогнища вторинно хронічного карагінанового запалення на тлі введення інгібітора тромбіну дабігатрану етексилату.

Матеріал і методи. Дослідження проведено у відповідності з рекомендаціями «Керівництва з догляду та використання лабораторних тварин: 8-ме видання» [24], з дотриманням вказівок Директиви 2010/63/EU Європарламенту та Ради Європи від 22 вересня 2010 року «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях», відповідно до Закону України від 21 лютого 2006 року № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», міжнародних біоетичних норм «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, Франція, 1986 р.), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2001 р.), та настанов ARRIVE 2.0 [25, 26].

Експериментальне дослідження виконано на 72 дорослих щурах-самцях лінії WAG, масою 180,0-200,0 г (4 місяці від народження), яких вирощували у віварії Харківського національного медичного університету. Для уникнення впливу сезонних і добових коливань на досліджувані параметри експеримент проводили в осінньо-зимовий період.

Лабораторні тварини були випадковим чином розподілені на 2 контрольні групи (по 6 щурів у кожній) та 2 експериментальні групи (по 30 щурів у кожній). Перша контрольна група складалася з інтактних щурів (без викликання запалення та без введення препаратів) і слугувала контролем для природного перебігу запалення – інтактна контрольна група. Друга контрольна група складалася зі щурів, яким вводили дабігатрану етексилат без подальшої індукції запалення, і слугувала контролем для запалення на тлі введення інгібітора тромбіна – контрольна група дабігатрану. Експериментальні групи були розподілені наступним чином: у першій експериментальній групі спостерігався природний перебіг вторинного хронічного карагінанового запалення (без застосування препаратів), тоді як у другій експериментальній групі додатково до індукції запалення вводився інгібітор тромбіну дабігатрану етексилат. Кожну експериментальну групу також було розподілено на підгрупи по 6 щурів на кожний момент часу (1-ша, 7-ма, 14-та, 21-ша, 28-ма доби).

В якості моделі запалення було вторинно хронічне асептичне запалення, що викликалося внутрішньом'язовою ін'єкцією в ділянку правого стегна 10 мг λ-карагінану (Sigma-Aldrich, Inc., Сент-Луїс, США) в 1 мл ізотонічного розчину натрію хлориду [27]. Для кожної тварини використовували стерильний шприц об'ємом 1 мл з голкою 27G, і оскільки речовина для ін'єкції була гелеподібною, її вводили повільно протягом 10 секунд.

Інгібітор тромбіну дабігатрану етексилат (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co., Інгельгайм-ам-Райн, Німеччина) вводили внутрішньошлунково через зонд у дозі 15 мг/кг/добу в 1,0 мл ізотонічного розчину натрію хлориду щодня протягом 28 днів [28, 29].

Евтаназію піддослідних тварин проводили відповідно до настанов Американської асоціації ветеринарної медицини щодо евтаназії тварин (видання 2020 р.) [30] шляхом декапітації під наркозом тіопенталом натрію (БРОВАФАРМА, Бровари, Україна), який вводили внутрішньоочеревинно в дозі 40-50 мг/кг контрольним групам щурів на 0-у добу, а також експериментальним групам щурів на 1-шу, 7-му, 14-ту, 21-шу і 28-му доби [31, 32, 33].

Динаміку клітинного складу вогнища запалення у експериментальних групах вивчали на 1-шу, 7-му, 14-ту, 21-шу і 28-му доби. Дослідження клітинного складу препаратів контрольних груп відбувалось на 0-ву добу (для контрольної групи дабігатрану – через 1 годину після введення інгібітора тромбіна) [34].

Динаміку змін клітинного складу вогнища вторинно хронічного карагінанового запалення досліджували методом підрахунку клітин запального ряду в препаратах, забарвлених гематоксиліном і еозином:

- у контрольних групах: у прошарках пухкої волокнистої сполучної тканини між пучками м'язових волокон;
- у експериментальних групах: у запальних інфільтратах у прошарках пухкої волокнистої сполучної тканини між пучками м'язових волокон – у центрі та на периферії вогнища запалення.

Підрахунок клітин запального ряду в препаратах виконували на мікроскопі «Olympus BX41» (Olympus Corporation, Токіо, Японія) в обмеженому полі зору площею $1{,}6\times10^{-9}$ м² з подальшою обробкою з використанням програмного забезпечення «Olympus DP-Soft» (версія 3.1, Olympus Corporation, Токіо, Японія).

Статистичний аналіз було проведено за допомогою програмного середовища R (версія 4.4.1, The R Foundation for Statistical Computing, Відень, Австрія, 2024). Для обробки даних використовува-

ли стандартні функції R, набір пакетів «tidyverse», зокрема пакет «ggplot2» (версія 3.5.1, 2024) для візуалізації даних, та пакет «PMCMRplus» (версія 1.9.12, 2024) для проведення непараметричних тестів Краскела-Уолліса та Данна.

Нормальність розподілу даних оцінювали візуально за допомогою гістограм та Q-Q графіків, а також перевіряли за допомогою тесту Шапіро-Уілка. Однорідність дисперсій аналізували за допомогою тесту Левена. Враховуючи, що дані не відповідали критеріям нормальності та демонстрували неоднорідність дисперсій, для подальшого статистичного аналізу було обрано непараметричні методи.

Результати аналізу даних подано у вигляді діаграм розмаху (boxplots), які дозволяють візуально оцінити розподіл даних у кожній групі, включаючи медіану, квартилі та наявність викидів. Для оцінки статистично значущих відмінностей між групами застосовували тест Краскела-Уолліса, який є непараметричною альтернативою одновимірному дисперсійному аналізу (ANOVA). Після цього виконували множинні попарні порівняння за допомогою post-hoc тесту Данна для виявлення специфічних відмінностей між групами. Для корекції рівня значущості (P) при множинних порівняннях використовували поправку Бонферроні. Статистична значущість визначалася на рівні $P<0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. У запальному інфільтраті м'язової тканини стегна у групах щурів, як за природного перебігу запалення, так і за запалення на тлі введення дабігатрану етексилату, на 1-шу добу спостереження кількість нейтрофільних лейкоцитів суттєво збільшується як в центрі, так і на периферії вогнища запалення порівняно з групами контролю (рис. 1). У групі щурів з природним перебігом запалення максимальна кількість нейтрофільних лейкоцитів відзначається на 7-му добу в центральних ділянках запальних вогнищ, значно перевищуючи контроль ($P<0,001$). У периферичних ділянках їх кількість була дещо нижчою за попередній термін, проте в подальші терміни спостерігається прогресуюче зменшення кількості нейтрофілів до завершення експеримента як у центрі, так і на периферії.

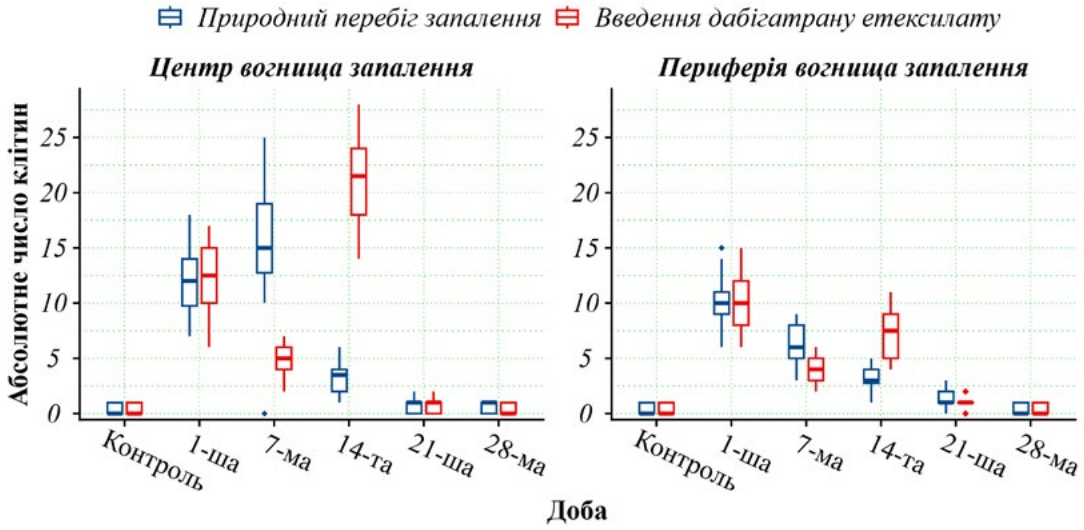

Рис. 1. Кількість нейтрофільних лейкоцитів у центрі та на периферії вогнищ запалення в залежності від терміну спостереження

У групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату навпаки – на 7-му добу фіксується доволі різке зниження кількості нейтрофілів як в центральних, так і в периферійних ділянках вогнищ запалення, але на 14-ту добу спостерігається значне підвищення кількості нейтрофільних лейкоцитів в центральних ділянках ($P<0,001$) порівняно з контролем і незначне підвищення в периферійних ділянках з подальшим, ідентичним до групи щурів з природним перебігом запалення, зниженням як в центрі, так і на периферії на 21-шу і 28-му доби.

При цьому, в обох групах в більш ранні терміни кількість нейтрофілів в центрі вогнища перевищує їх кількість на периферії, особливо на 7-му добу в групі щурів з природним перебігом запалення і на 14-ту добу в групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату. На 21-шу і 28-му доби кількість нейтрофілів є приблизно однаково низькою в обох групах, а також в центральних і периферійних ділянках вогнища запалення в межах однієї групи.

Динаміка змін кількості базофільних лейкоцитів (рис. 2) у вогнищах запалення обох досліджуваних груп також характеризується вираженим зростанням їх кількості на 1-шу добу спостереження з незначним переважанням кількості клітин на пе-

риферії запального інфільтрату порівняно з контролем у групі щурів з природним перебігом запалення (P<0,001) та у групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату (P<0,001). На 7-му добу в обох групах спостерігається значне зниження кількості клітин як в центрі, так і на периферії вогнищ запалення, при чому більш виражене зниження відмічається в центральних ділянках. На 14-ту добу картина мало вирізняється від попереднього терміну з незначним зниженням кількості клітин в центрах вогнищ у групі щурів з природним перебігом запалення і периферійних ділянках у групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату. У наступні терміни спостереження в обох групах спостерігається відносно симетричне поступове зниження кількості базофілів.

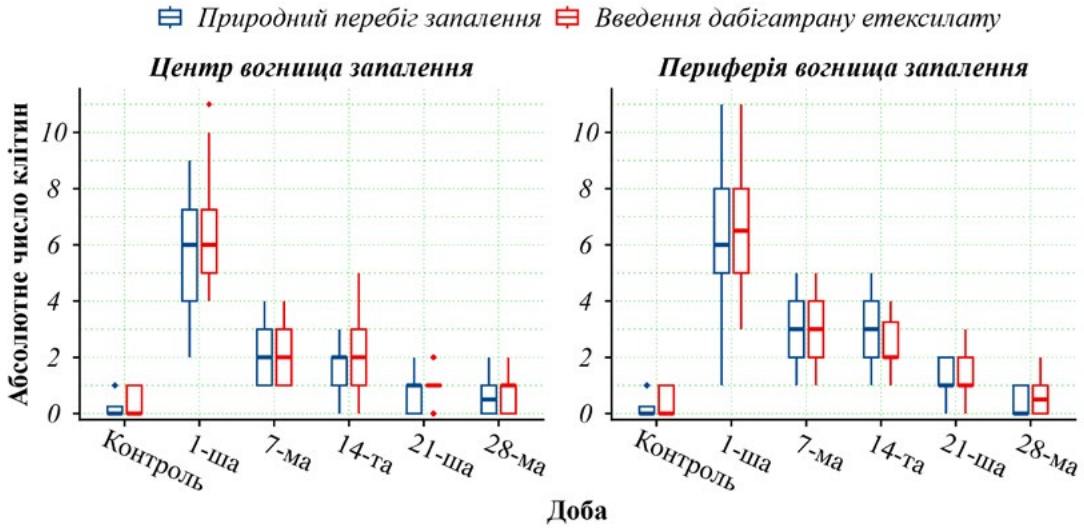

Рис. 2. Кількість базофільних лейкоцитів у центрі та на периферії вогнищ запалення в залежності від терміну спостереження

Динаміка змін кількості еозинофільних лейкоцитів (рис. 3) подібна до динаміки змін кількості базофілів з піком підвищення їх кількості в обох досліджуваних групах на 1-шу добу і поступовим зниженням починаючи з 7-ої доби, з переважним розташуванням на периферії вогнища запалення. Однак на 1-шу добу в групі щурів з природним перебігом запалення спостерігається незначне превалювання кількості клітин у центральних ділянках над їх кількістю на периферії вогнища запалення. Порівняно з контролем, кількість еозинофілів у центральних ділянках вогнища запалення була достовірно вищою – як у групі щурів з природним перебігом запалення (P<0,001), так і в групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату (P<0,001).

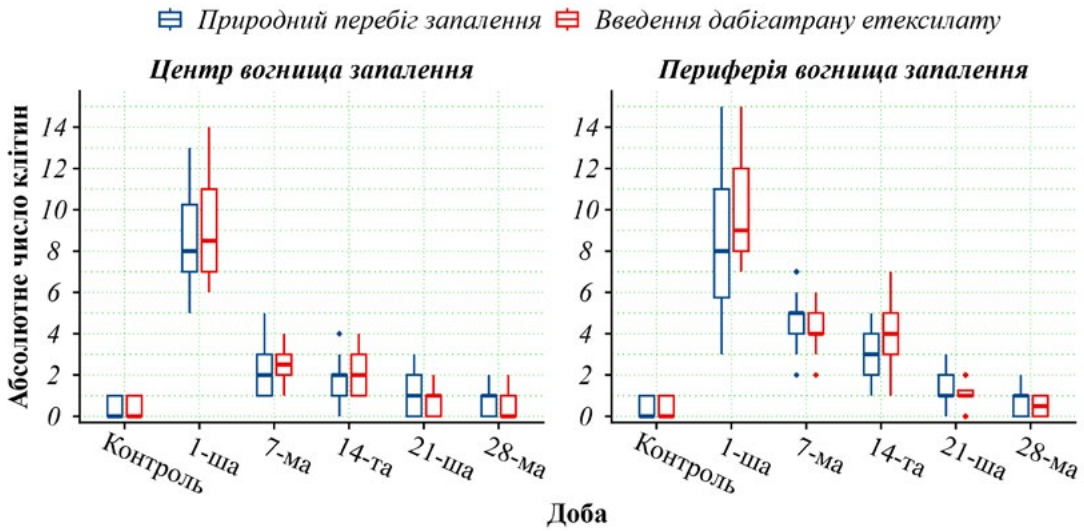

Рис. 3. Кількість еозинофільних лейкоцитів у центрі та на периферії вогнищ запалення в залежності від терміну спостереження

На відміну від динаміки змін кількості вище описаних клітинних елементів, кількість лімфоцитів в обох групах на 1-шу добу, як у центрі, так і на периферії запальних інфільтратів, є рівномірно помірно підвищеною (рис. 4). На 7-му добу в центрах вогнищ спостерігається зниження кількості клітин з незначними коливаннями в бік підвищення в наступні терміни спостереження. І, навпаки, у периферійних ділянках на 7-му добу відмічається значне зростання кількості лімфоцитів і, відповідно, значне переважання їх кількості у центральних ділянках, з подальшим, на 14-ту добу спостереження, достатньо вираженим зниженням у групі щурів з природним перебігом запалення і незначним зниженням у групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату. У наступні терміни кількість лімфоцитів у периферійних ділянках у групі щурів з природним перебігом запалення поступово зростає, а в групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату – знижується. Також звертає на себе увагу виражене переважання кількості лімфоцитів у периферійних ділянках над їх кількістю у центральних ділянках запальних вогнищ в обох досліджуваних групах.

Динаміка змін кількості плазмоцитів (рис. 5) та моноцитів (рис. 6) схожа з динамікою змін кількості лімфоцитів з невеликими відмінностями у вигляді незначних коливань рівня клітин у бік збільшення чи зменшення, але з аналогічною в цілому тенденцією до зниження кількості в більш пізні терміни спостереження.

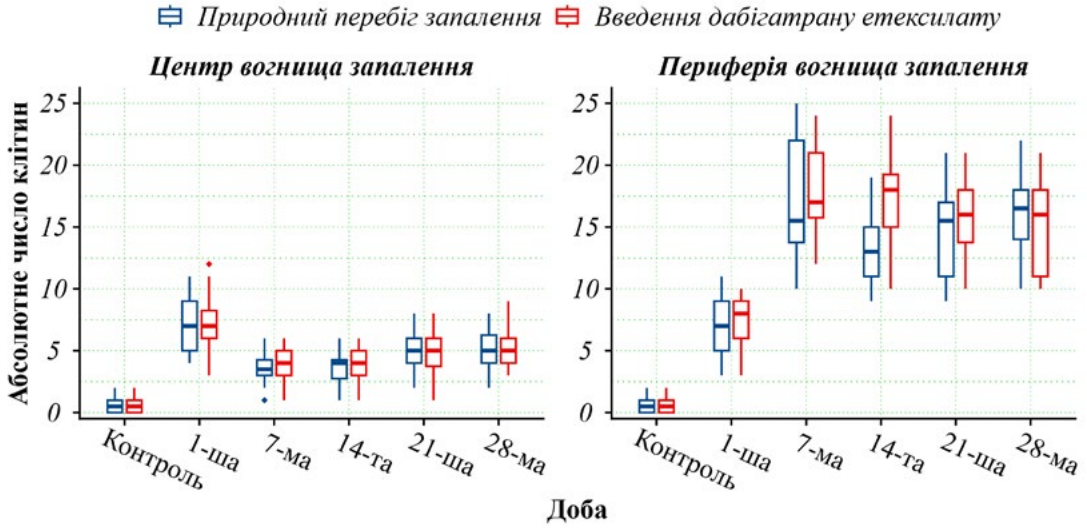

Рис. 4. Кількість лімфоцитів у центрі та на периферії вогнищ запалення в залежності від терміну спостереження

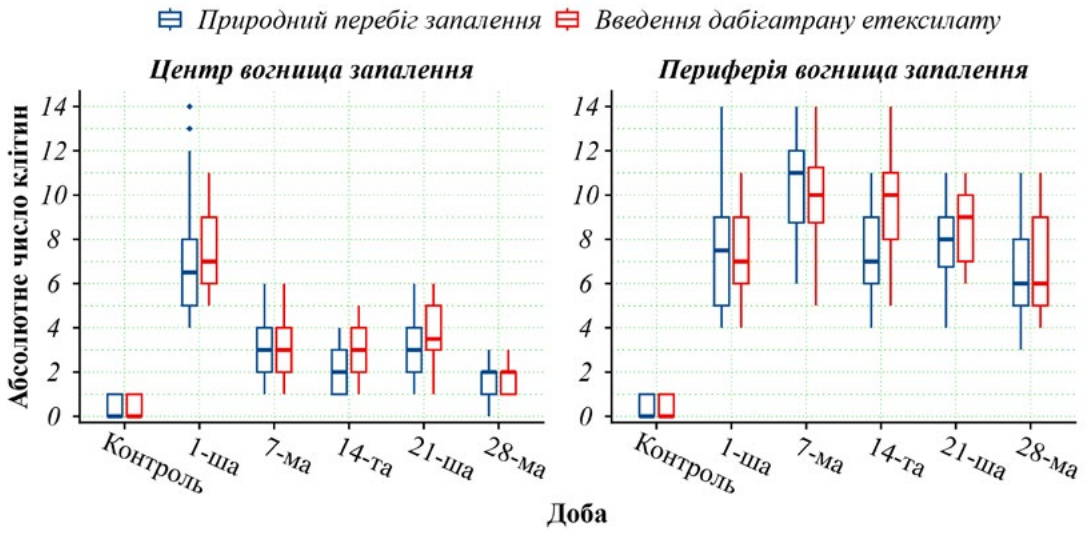

Рис. 5. Кількість плазматичних клітин у центрі та на периферії вогнищ запалення в залежності від терміну спостереження

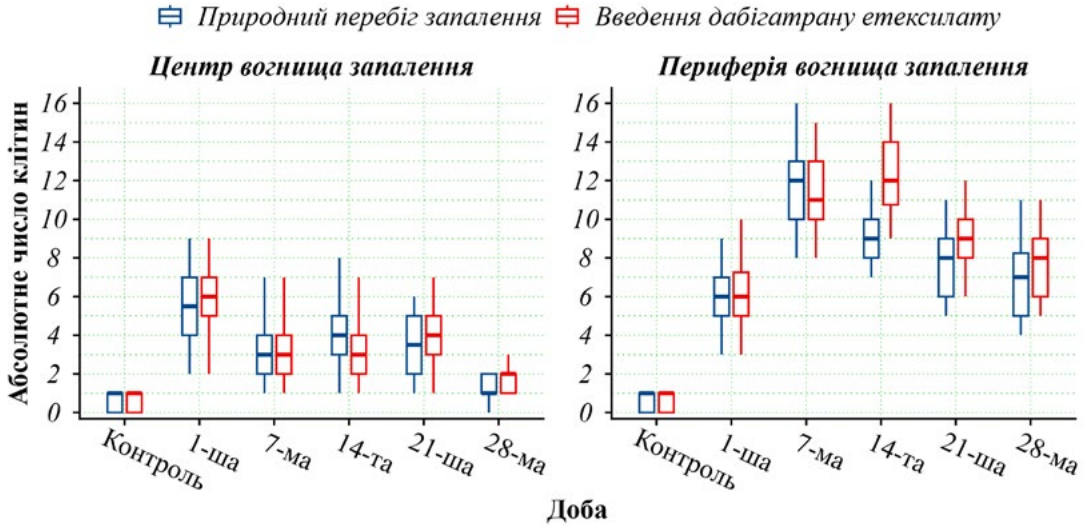

Рис. 6. Кількість моноцитів у центрі та на периферії вогнищ запалення в залежності від терміну спостереження

У динаміці змін кількості макрофагів (рис. 7) на 1-шу добу виявляється нерізке рівнозначне зростання клітин як в центрі, так і на периферії запальних інфільтратів в обох групах. У наступні терміни в обох групах спостерігається збільшення кількості макрофагів, проте нерівномірно. Так, на 7-му добу порівняно з попереднім терміном спостереження, в обох групах відмічається значне зростання кількості клітин у периферійних ділянках вогнищ запалення. Але на 14-ту добу в групі щурів з природним перебігом запалення кількість макрофагів значно підвищується у центральних ділянках порівняно з попереднім терміном (P<0,031), при цьому в групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату у такій ділянці збільшення кількості клітин майже непомітне. Подібне до різкого збільшення кількості макрофагів на 14-ту добу у групі щурів з природним перебігом запалення, у групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату спостерігається на 21-шу добу в центральних ділянках вогнища порівняно з попереднім терміном (P<0,001). У цей та наступний терміни спостереження відмічається вирівнювання кількості клітин між ділянками і між групами.

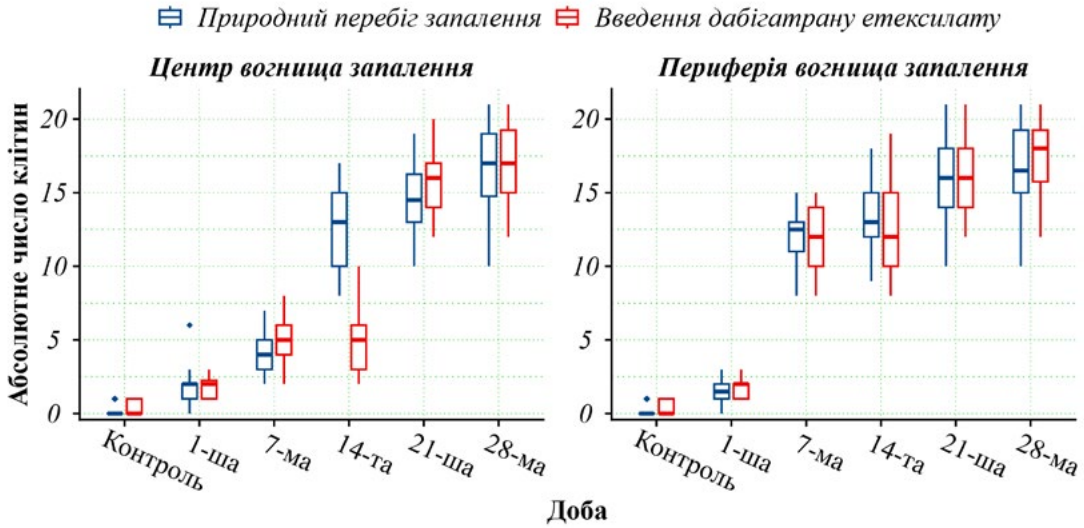

Рис. 7. Кількість макрофагів у центрі та на периферії вогнищ запалення в залежності від терміну спостереження

Кількість тканинних базофілів (рис. 8) на 1-шу добу спостереження в обох експериментальних групах порівняно з контрольними дещо підвищується з приблизно однаковою кількістю клітин як у центральних ділянках, так і на периферії вогнищ. На 7-му добу спостереження в обох групах відмічається продовження зростання кількості тканинних базофілів, особливо значне у периферійних ділянках (P<0,001 та P<0,001, відповідно) з подальшим незначним зниженням у центральних ділянках і незначним підвищенням у периферійних на 14-ту добу. На 21-шу та 28-му доби спостерігається незначне зменшення кількості клітин в обох ділянках, проте зберігається їхнє переважне розташування на периферії.

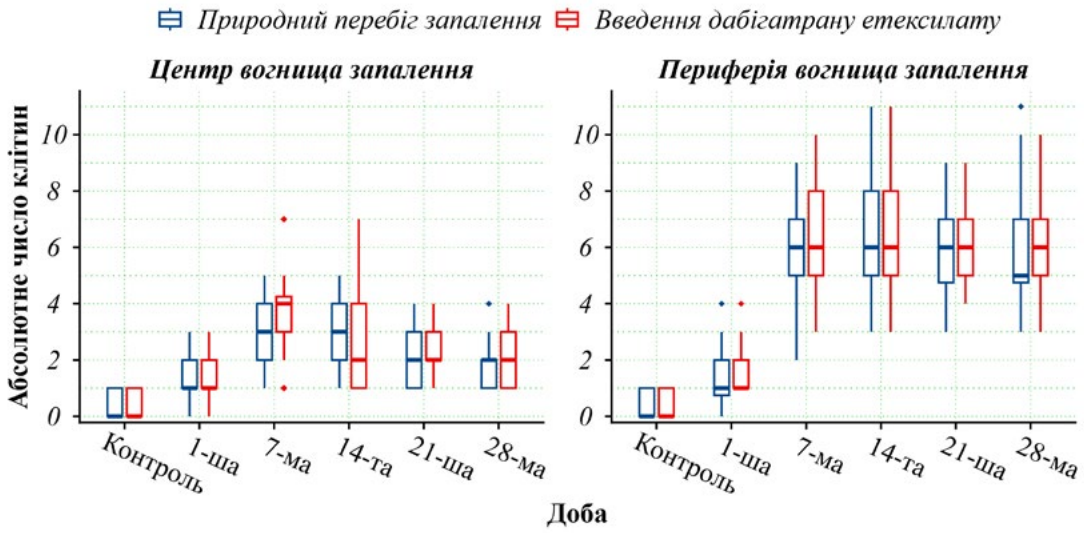

Рис. 8. Кількість тканинних базофілів у центрі та на периферії вогнищ запалення в залежності від терміну спостереження

Клітини фібробластичного ряду (рис. 9) у контрольних групах і на 1-шу добу в обох досліджуваних групах не спостерігаються, лише на 7-му добу вони виявляються в незначній кількості у периферійних ділянках запальних вогнищ. На 14-ту добу в групі щурів з природним перебігом запалення ці клітини виявляються і в центральних ділянках, і на периферії, при чому на периферії їх кількість значно збільшується порівняно з попереднім терміном ($P<0,003$). У групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату у цей термін у центральних ділянках клітини фібробластичного ряду не виявляються, а в периферійних ділянках їх кількість незначно вище ніж у попередньому терміні. У центральних ділянках вогнищ у цій групі клітини фібробластичного ряду відмічаються лише на 21-шу добу, а в периферійних ділянках їх кількість значно підвищується порівняно з попереднім терміном ($P<0,001$). У групі щурів з природним перебігом запалення на 21-шу добу продовжує зростати кількість клітин як у центрі, так і на периферії запальних вогнищ. Дані показники трохи нижчі від таких у групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату. На 28-му добу в обох досліджуваних групах тенденція до збільшення кількості клітин зберігається з незначним відривом показників між групами і з переважанням клітин у периферійних ділянках вогнища над їх кількістю у центральних в межах кожної групи, як і в попередній термін дослідження.

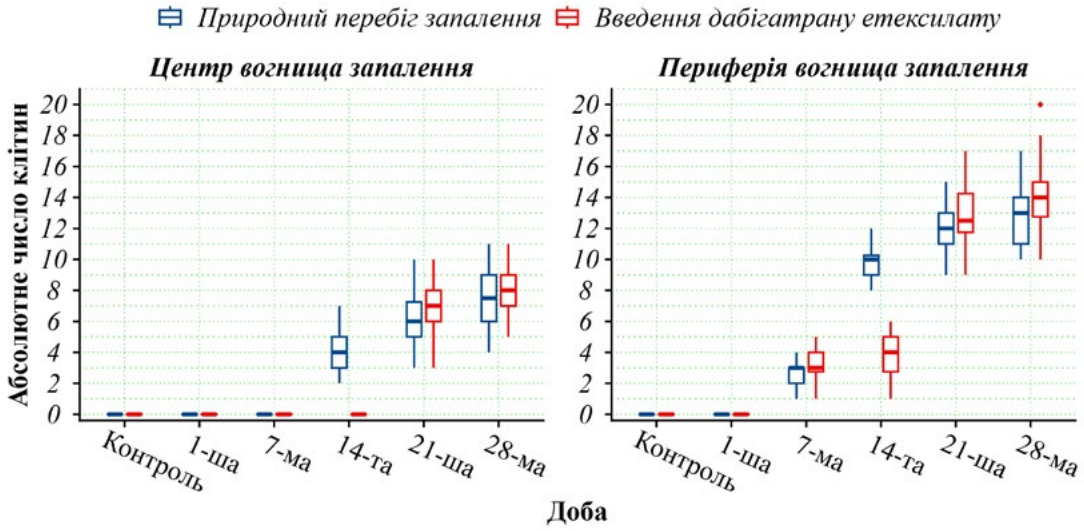

Рис. 9. Кількість клітин фібробластичного ряду у центрі та на периферії вогнищ запалення в залежності від терміну спостереження

Висновки. 1. Дослідження динаміки змін клітинного складу вогнища запалення у щурів за природного перебігу та на тлі введення інгібітора тромбіну дабігатрану етексилату виявило характерні особливості запального процесу. 2. Було встановлено, що пік накопичення базофільних та еозинофільних лейкоцитів припадає на 1-шу добу з послідуючим їх зниженням в наступні терміни спостереження та з певним переважанням кількості клітин у периферійних ділянках майже в усі терміни спостереження. 3. Рівень кількості нейтрофільних лейкоцитів в запальних вогнищах в обох групах на 1-шу добу спостереження також високий, проте піки їх кількості виявляються у центральних ділянках на 7-му добу в групі щурів з природним перебігом запалення та на 14-ту – в групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату. Морфологічним субстратом цього є осередки нагноєння, тобто гнійного чи гнійно-некротичного процесу. При чому кількість нейтрофілів в групі щурів з природним перебігом запалення, будучи відносно високою, менша за таку в групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату, що, скоріше за все, можна пояснити розрідженням запального інфільтрату через виражену некротизацію. І, навпаки, більш високу кількість нейтрофілів у групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату – переважно гнійним і менш вираженим некротичним процесом. 4. Така картина клітинного складу з переважанням вищезазначених клітинних елементів свідчить про фазу ексудації запального процесу, яка у групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату триває і на 14-ту добу спостереження в центральних ділянках вогнищ запалення з попереднім затуханням гостроти запалення на 7-му добу і, відповідно, загостренням на 14-ту добу. 5. У цілому, з 7-ї доби в обох досліджуваних групах виявляються процеси проліферації та організації, що підтверджується змінами у клітинному складі, який характеризується високою кількістю клітин з поступовим переважанням лімфоцитів, моноцитів, макрофагів, плазмоцитів, тканинних базофілів та клітин фібробластичного ряду із значним превалюванням їх кількості в периферійних ділянках запальних вогнищ. Так, на 7-му добу фібробласти спостерігаються лише в периферичних ділянках в обох експериментальних групах. На 14-ту добу вони фіксуються в центральних ділянках вогнищ запалення тільки у групі щурів з природним перебігом запалення, і лише на 21-шу добу фібробласти виявляються в групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату. 6. Варто також зазначити, що на 14-ту добу у щурів з природним перебігом запалення кількість макрофагів збільшилася втричі у центральних ділянках вогнищ запалення, на відміну від групи щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату, де такий приріст відбувся лише на 21-шу добу.

Отже, якщо на 7-му та 14-ту доби між групами спостерігаються певні відмінності в кількості деяких вищеназваних клітин через тривалість ексудативних процесів у групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату, то з 21-ої доби кількість цих клітин стає приблизно однаковою, що свідчить про превалювання процесів проліферації та організації з активною участю фібробластів та макрофагів у репаративних процесах, переважно в периферичних ділянках і в більшій мірі в групі щурів із запаленням на тлі введення дабігатрану етексилату.

Перспективи подальших досліджень. Подальше дослідження динаміки змін клітинного складу вогнища запалення за впливу інших медіаторів запалення є важливим для глибшого розуміння патогенезу та можливостей корекції хронічного запалення.

Список використаної літератури

1. Calder PC, Albers R, Antoine JM, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, et al. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. British Journal of Nutrition. 2009;101(S1):1-45. https://doi.org/10.1017/S0007114509377867.

2. Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. The American Journal of Pathology. 2015;185(10):2596-606. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.06.001.

3. Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature. 2010;464(7285):104-7. https://doi.org/10.1038/nature08780.

4. Wynn T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. The Journal of Pathology. 2008;214(2):199-210. https://doi.org/10.1002/path.2277.

5. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. Nature Medicine. 2012;18(7):1028-40. https://doi.org/10.1038/nm.2807.

6. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nature Reviews Immunology. 2008;8(12):958-69. https://doi.org/10.1038/nri2448.
7. Wynn T, Barron L. Macrophages: Master regulators of inflammation and fibrosis. Seminars in Liver Disease. 2010;30(03):245-57. https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354.
8. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature. 2013;496(7446):445-55. https://doi.org/10.1038/nature12034.
9. Niehaus JK, Taylor-Blake B, Loo L, Simon JM, Zylka MJ. Spinal macrophages resolve nociceptive hypersensitivity after peripheral injury. Neuron. 2021;109(8):1274-82.e6. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.02.018.
10. Van Der Vlist M, Raoof R, Willemen HLDM, Prado J, Versteeg S, Martin Gil C, et al. Macrophages transfer mitochondria to sensory neurons to resolve inflammatory pain. Neuron. 2022;110(4):613-626.e9. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.11.020.
11. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. Current Opinion in Immunology. 2002;14(1):123-8. https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00307-7.
12. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, Van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. Science. 2011;332(6035):1284-8. https://doi.org/10.1126/science.1204351.
13. Jenkins SJ, Ruckerl D, Thomas GD, Hewitson JP, Duncan S, Brombacher F, et al. IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond homeostatic levels controlled by CSF-1. Journal of Experimental Medicine. 2013;210(11):2477-91. https://doi.org/10.1084/jem.20121999.
14. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. Immunity. 2016;44(3):450-62. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015.
15. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nature Reviews Immunology. 2011;11(11):723-37. https://doi.org/10.1038/nri3073.
16. Lech M, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease. 2013;1832(7):989-97. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.12.001.
17. Muñoz-Cánoves P, Serrano AL. Macrophages decide between regeneration and fibrosis in muscle. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2015;26(9):449-50. https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.07.005.
18. Ueha S, Shand FHW, Matsushima K. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. Frontiers in Immunology. 2012;3:71. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00071.
19. Kiss AL. Inflammation in focus: The beginning and the end. Pathology and Oncology Research. 2022;27:1610136. https://doi.org/10.3389/pore.2021.1610136.
20. Zsiros V, Katz S, Dóczi N, Kiss AL. Autophagy is the key process in the re-establishment of the epitheloid phenotype during mesenchymal-epithelial transition (MET). Experimental Cell Research. 2017;352(2):382-92. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.031.
21. Katz S, Zsiros V, Kiss AL. Under inflammatory stimuli mesenteric mesothelial cells transdifferentiate into macrophages and produce pro-inflammatory cytokine IL-6. Inflammation Research. 2019;68(7):525-8. https://doi.org/10.1007/s00011-019-01247-7.
22. Zsiros V, Kiss AL. Cellular and molecular events of inflammation induced transdifferentiation (EMT) and regeneration (MET) in mesenteric mesothelial cells. Inflammation Research. 2020;69(12):1173-9. https://doi.org/10.1007/s00011-020-01400-7.
23. Ginwala R, Bhavsar R, Chigbu DGI, Jain P, Khan ZK. Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. Antioxidants. 2019;8(2):35. https://doi.org/10.3390/antiox8020035.
24. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals: Eighth edition. Washington, D.C.: The National Academies Press; 2011. https://doi.org/10.17226/12910.
25. Simmonds RC. Bioethics and animal use in programs of research, teaching, and testing. In: Weichbrod RH, Thompson GA (Heidbrink), Norton JN (eds.) Management of animal care and use programs in research, education, and testing. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press;2017:35-62. https://doi.org/10.1201/9781315152189-4.

26. Percie Du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. Boutron I (ed.) PLOS Biology. 2020;18(7): e3000410. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410.
27. Radhakrishnan R, Moore SA, Sluka KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. Pain. 2003;104(3):567577. https://doi.org/10.1016/S0304-3959(03)00114-3.
28. Dittmeier M, Wassmuth K, K. Schuhmann M, Kraft P, Kleinschnitz C, Fluri F. Dabigatran etexilate reduces thrombin-induced inflammation and thrombus formation in experimental ischemic stroke. Current Neurovascular Research. 2016;13(3):199-206. https://doi.org/10.2174/1567202613666160517122605.
29. Durmaz S, Kurtoğlu T, Faruk Rahman Ö, Tataroğlu C, Yılmaz M, Barbarus E, et al. Direct oral anticoagulant agents attenuate temporary aortic occlusion-induced renal oxidative and inflammatory responses in rats. Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2022;30(2):184-91. https://doi.org/10.5606/tgkdc.dergisi.2022.22831.
30. AVMA Panel on Euthanasia. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association; 2020. Available from: https://www.avma.org/resources-tools/avma-policies/avma-guidelines-euthanasia-animals.
31. Vogler GA. Chapter 19 – Anesthesia and analgesia. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL (eds.) The laboratory rat. 2nd ed. Burlington, MA: Academic Press; 2006. p. 627-64. https://doi.org/10.1016/B978-012074903-4/50022-4.
32. Mahmoodi M, Hadad MK, Shamsizadeh A, Azarang A, Rayeni RA. Effect of trifluoperazine on carrageenan-induced acute inflammation in intact and adrenalectomized rats. International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. 2009;1(2):150-3. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3047245.
33. Abdi-Azar H, Abbasi-Maleki S. Comparison of the anesthesia with thiopental sodium alone and their combination with Citrus aurantium L. (Rutaseae) essential oil in male rat. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences. 2014;3(Special Issue V):37-44. https://bepls.com/spl_v_2014/8.pdf
34. Ferreira JRP, Sucupira ID, Carvalho GMC, Paiva FF, Pimentel-Coelho PM, Rosado-de-Castro PH, et al. A combination of ex vivo and in vivo strategies for evaluating how much new oral anticoagulants exacerbate experimental intracerebral bleeding. TH Open. 2023;07(03): e195-e205. https://doi.org/10.1055/s-0043-1770782.

DYNAMICS OF CHANGES IN THE CELLULAR COMPOSITION OF THE FOCUS OF CHRONIC INFLAMMATION WITH DABIGATRAN ETEXILATE ADMINISTRATION

Abstract. Inflammation is a natural defense reaction of the body to infections and injuries, aimed at eliminating pathogens and promoting tissue repair to maintain homeostasis. It is triggered in response to pathogen- or damage-associated molecular patterns, initiating a complex process that involves the recruitment and activation of both hematopoietic and non-hematopoietic cells, such as neutrophils, macrophages, fibroblasts, and others. These cells interact to coordinate tissue repair and regeneration. When this process is well-controlled, tissue structure is properly restored. However, if inflammation becomes chronic or uncontrolled, pathological fibrosis can develop, disrupting tissue function and potentially leading to organ failure or death. Therefore, healing processes must be strictly regulated to maintain normal tissue function.

Aim of the study: to investigate the dynamics of changes in the cellular composition of the focus of secondary chronic carrageenan-induced inflammation with the administration of the thrombin inhibitor dabigatran etexilate.

Material and methods. The study was conducted on 72 adult male WAG rats, weighing 180-200 g. The model of inflammation was secondary chronic aseptic inflammation induced by intramuscular injection of 10 mg λ-carrageenan into the right thigh area. The thrombin inhibitor dabigatran etexilate was administered intragastrically via gavage at a dose of 15 mg/kg/day throughout the experiment. The dynamics of cellular composition changes in the focus of inflammation were studied on days 1, 7, 14, 21, and 28 of the experiment.

Results. The study of the dynamics of cellular composition changes in the focus of secondary chronic carrageenan-induced inflammation with the administration of the thrombin inhibitor dabigatran etexilate confirmed its ability to influence the course of the inflammatory process. Peaks in basophil and eosinophil accumulation were observed on day 1, followed by a gradual decrease in their numbers, with predominant

localization in the peripheral areas of the inflammatory foci. Lymphocytes, monocytes, and plasma cells also reached their peak values in the central areas of the inflammatory foci on day 1. Neutrophil levels were high in both experimental groups on day 1 (peaking in the periphery of the inflammatory foci). In the central areas, the peak neutrophil accumulation occurred on day 14 in the group of rats with dabigatran etexilate administration, later than in the group with the natural course of inflammation, where it peaked on day 7, albeit with a lower absolute number of cells. This delay was accompanied by less pronounced necrosis and a predominance of purulent processes. Fibroblasts were identified on day 7 only in the peripheral areas of the inflammatory foci in both experimental groups. In the central areas, they were detected on day 14 in the group with the natural course of inflammation and only on day 21 in the group with dabigatran etexilate administration. The number of macrophages in the central areas tripled on day 14 in the group with the natural course of inflammation, while in the group of rats with dabigatran etexilate administration, such an increase occurred only on day 21, when the number of cellular elements equalized between the groups. Overall, compared to the natural course of inflammation, inflammation with thrombin inhibitor administration was associated with a delay in the organizational processes and the proliferation of fibroblasts and macrophages, which began later.
Conclusions. The administration of the thrombin inhibitor dabigatran etexilate significantly affects the dynamics of neutrophil, macrophage, and fibroblast counts in the inflammatory foci, prolonging the exudative phase and slowing down the processes of proliferation and organization. This leads to a more prolonged purulent inflammation and delays in reparative and regenerative processes compared to the natural course of inflammation. However, by day 21, the number of fibroblasts and macrophages in the inflammatory foci of the group of rats with dabigatran etexilate administration becomes similar to that in the group with the natural course of inflammation, indicating the predominance of reparative and regenerative processes, which occur mainly in the peripheral areas, especially in the group of rats with dabigatran etexilate administration.
Key words: cellular composition of the inflammatory focus, secondary chronic carrageenan inflammation, connective tissue, thrombin, thrombin inhibitor, rats.

Відомості про авторів:
Шевченко Владислав Олександрович – аспірант кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д. О. Альперна Харківського національного медичного університету, м. Харків;
Павлова Олена Олексіївна – доктор медичних наук, професор, професор кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д. О. Альперна Харківського національного медичного університету, м. Харків.

Information about the authors:
Shevchenko Vladyslav O. – PhD Student of the Department of General and Clinical Pathophysiology named after D. O. Alpern, Kharkiv National Medical University, Kharkiv;
Pavlova Olena O. – Doctor of Medical Science, Professor, Professor of the Department of General and Clinical Pathophysiology named after D. O. Alpern, Kharkiv National Medical University, Kharkiv.

Надійшла 15.08.2024 р.