**АНОТАЦІЯ**

*Сич В. О*. Роль тахікінінів в реакціях системи крові при запаленні. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 — Медицина, галузь знань 22 — Охорона здоров’я, спеціалізація 14.03.04 — патологічна фізіологія. — Харківський національний медичний університет МОЗ України. — Харків, 2021.

Науковий керівник: Шевченко Олександр Миколайович, доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри загальної та клінічної патофізіології імені Д. О. Альперна Харківського національного медичного університету.

У дисертації представлено теоретичне узагальнення і розв’язання актуального наукового звдання — з’ясовано роль тахікінінів у реакціях системи крові при запаленні. На моделі вторинного хронічного запалення шляхом дослідження клітинних реакцій і тканинних змін вогнища запалення, кістковомозкового кровотворення, лейкоцитарної реакції периферичної крові, концентрації фактора некрозу пухлин α, інтерлейкіну 6, С-реактивного білку у крові за карагіненового вторинно хронічного запалення, зокрема, в умовах блокади субстанції P з’ясовано, що інгібіція НК-1 рецепторів субстанції Р зменшує хронізацію запалення.

З метою встановлення ролі тахікінінів у реакціях системи крові в умовах запалення проведено експериментальне проспективне контрольоване рандомізоване дослідження проведено на 132 щурах лінії WAG. Щури контрольних серій протягом терміну експерименту залишалися інтактними щодо запалення або підлягали тільки введенню препарату та утримувалися у незмінних стандартних умовах. Піддослідні щури інтервенційних серій відповідно до завдань підлягали моделюванню запалення та застосування фармакологічного препарату — інгібітору НК-1 рецепторів апрепітанту. Обрано карагіненову модель запалення, застосовано 10 мг α-карагінену (Sigma, США) у 1 мл фізіологічного розчину, який вводили внутрішньом’язово у стегно щура в умовах неглибокого тіопенталового наркозу. Для пригнічення синтезу і ефектів субстанції P застосовували інгібітор НК-1 рецепторів апрепітант, який вводили інтраперитонеально у дозі 10 мг, розчиненого у 1 мл ізотонічного розчину хлориду натрію, щодня протягом усього експерименту. Стратифікацію тварин по окремих серіях експерименту (на 6 годину та на 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 доби) здійснено відповідно поставленим завданням дослідження у кількості по 6 особин. В якості матеріалу для дослідження використовували периферичну кров, кістковий мозок стегнової кістки, м’які тканини вогнища запалення. Всі маніпуляції над тваринами здійснювали у відповідності до міжнародних та національних положень етики та біоетики.

Розв’язання задач дослідження здійснено шляхом дослідження клітинних реакцій і тканинних змін вогнища запалення, кістковомозкового кровотворення, лейкоцитарної реакції периферичної крові, концентрації фактора некрозу пухлин α, інтерлейкіну 6, С-реактивного білку у крові за карагіненового вторинно хронічного запалення, зокрема, в умовах блокади субстанції P, а також розроблено критеріальний комплекс прогнозування реакцій системи крові за карагіненового вторинно хронічного запалення та за блокади субстанції P шляхом застосування засобів логіко-статистичного аналізу і математичного моделювання.

Морфологічне дослідження зразків м’язової тканини показує, що, як за введення тільки карагінену (серії природнього перебігу запалення), так і карагінену та блокатору субстанції P, розвиваються спочатку альтеративні і ексудативні реакцій, слідом за якими настає зміна фаз запалення з ексудації на проліферацію — мультиплікацію клітинних і тканинних елементів, і запалення набуває характеру проліферативного з формуванням гранульом. Процес організації починається з периферійних ділянок, поступово заміщуючи усе вогнище запалення.

Морфологічні зміни в обох досліджуваних групах ідентичні, розвиваються приблизно в одні і ті ж терміни з невеликою різницею в інтенсивності процесу. Але блокада субстанції P прискорює процеси проліферації і організації. Так, нейтрофільні лейкоцити за запальної клітинної інфільтрації у серії блокади субстанції P візуально вже зменшуються у кількості у терміні спостереження 2 доби, тоді як у групі природнього перебігу запальна клітинна інфільтрація містить ще достатньо значну кількість нейтрофільних лейкоцитів до 7 доби, разом з цим відповідно у вогнищах запалення починає збільшуватись кількість клітин фібробластичного ряду та лімфомакрофагальних елементів; процес колагеноутворення у серіях блокади субстанції P відмічається у термін спостереження 5 діб, тоді як у групі природнього перебігу запалення — на 7 добу спостереження; поява гранульом у серії блокади субстації P відмічається вже на 10 добу спостереження, а у серії природнього перебігу запалення — лише на 21 добу.

Вивчення динаміки змін клітинного складу запального вогнища виявило, що накопичення нейтрофільних, базофільних і еозинофільних лейкоцитів виявляється в терміни спостереження 6 год.–3 доби з піками їх вмісту: нейтрофілів і базофілів — на 2 добу; при цьому, нейтрофілів — у центральних відділах вогнищу запалення, базофілів — в обох зонах (у центрі й на периферії) з невеликим переважанням кількості клітин у периферичних відділах; еозинофілів — на 1 добу і з незначним зниженням на 2 добу, і так само з переважним їх розташуванням у периферичних зонах. Дана картина клітинного складу з переважанням названих клітинних елементів свідчить про фазу ексудації запального процесу.

З 3–5 діб клітинний склад інфільтрату характеризується переважанням лімфоцитів, моноцитів, макрофагів, плазмоцитів, тканинних базофілів, клітин фібробластичного ряду (які за блокади субстанції P в одиничній кількості з’являються вже на 2 добу), що вказує на розвиток фази проліферації. Найбільша концентрація цих елементів у цілому спостерігається в периферичних зонах і переважає за блокади субстанції P, що, в свою чергу, свідчить про превалювання процесів проліферації та організації в периферичних ділянках.

Особливостями кістковомозкового кровотворення за карагіненового вторинно хронічного запалення на фоні його пригнічення шляхом введення блокатору НКР-1 субстанції Р є менша (р<0,05) на ранніх етапах кількість клітин, які беруть участь у реалізації переважно неспецифічних імунозапальних реакцій та маркерів стану системи коагуляції крові. Виявлено більший вміст клітинної популяції лімфоцитарного ростку кровотворення на фоні блокади фоні блокади субстанції P.

За запалення на фоні блокади нейрокінінових рецепторів 1 типу субстанції Р на 6-у годину відбувається значиме зменшення ЗКЛ у 1,28 разів (р<0,05), а також на 10-у добу значиме зменшення кількості ПЯН у 4 рази (р<0,05) та кількості еозинофілів у 3 рази (р<0,05). В умовах блокади субстанції Р є тенденція до зменшення кількості лімфоцитів у крові через 6 годин та починаючи з 7 доби до кінця дослідження порівняно з такими ж термінами природнього запалення. На 28 добу відбулося підвищення кількості моноцитів у 2 рази (р<0,01) в порівнянні з тим же терміном природнього перебігу запалення. В природніх умовах запалення субстанція Р стимулює лейкоцити крові, а також пролонгує запальну реакцію.

Концентрації ФНП-α, ІЛ-6 у крові у разі блокади речовини Р змінюються, і статистично значущі відмінності виявляються у концентрації ІЛ-6 — через 10 днів (р=0,04). Існують тенденції у відмінностях порівняно з контролем, виявленими для концентрації ФНП-α — через 1 день (p=0,08), через 3 дні (p=0,08), через 7 днів (p=0,08), через 10 днів (p=0,05), через 14 днів (p=0,05); концентрації IL-6 — через 6 годин (p=0,08), через 3 дні (p=0,08), через 5 днів (p=0,08), через 7 днів (p=0,08), через 14 днів (p=0,05). Ця знахідка вимагає більш ретельного дослідження з більшою статистичною потужністю. Концентрація СРБ у крові у разі блокади речовини Р змінюється, і виявляються статистичні тенденції. Виявлені тенденції відмінностей порівняно з контролем щодо концентрації С-реактивного білку — через 6 годин (p=0,08), через 1 день (p=0,08), через 2 дні (p=0,08), через 5 днів (p=0,08), через 7 днів (p=0,08), через 14 днів (p=0,05).

*Наукова новизна одержаних результатів.* Уперше проведено спеціальне комплексне дослідження і з’ясовано роль тахікінінів у реакціях системи крові при запаленні — основної ефекторної системи цього процесу. Встановлено модулюючий вплив тахікінінів на реакції різних ланок системи крові (вогнище запалення, кістково-мозкових клітин, лейкоцитів периферичної крові).

Вперше:

- визначено взаємозв’язок клітинних реакцій вогнища запалення, кістковомозкового кровотворення, лейкоцитарної реакції периферичної крові, концентрації фактора некрозу пухлин α, інтерлейкіну 6, С-реактивного білку у крові за карагіненового вторинно хронічного запалення, зокрема, на блокади субстанції P;

- оцінено вплив окремих факторів, зокрема, пригнічення синтезу і ефектів субстанції P, на реакції системи крові в умовах карагіненового вторинно хронічного запалення;

- встановлено, що особливістю клітинних реакцій вогнища запалення в умовах блокади субстанції Р є гальмування альтеративних і ексудативних реакцій, зміни фаз запалення з ексудації на проліферацію — мультиплікацію клітинних і тканинних елементів, і запалення набуває характеру проліферативного з формуванням гранульом і фіброзу. Так, накопичення нейтрофільних, базофільних і еозинофільних лейкоцитів виявляється в терміни спостереження 6 год.–3 доби з піками їх вмісту: нейтрофілів і базофілів — на 2 добу (нейтрофілів — у центральних відділах вогнищу запалення, базофілів — у центрі й на периферії) з невеликим переважанням кількості клітин у периферичних відділах; еозинофілів — на 1 добу і з незначним зниженням на 2 добу з переважним їх розташуванням у периферичних зонах (фаза ексудації запального процесу); з 3–5 діб клітинний склад інфільтрату характеризується переважанням лімфоцитів, моноцитів, макрофагів, плазмоцитів, тканинних базофілів, клітин фібробластичного ряду, які за блокади субстанції P в одиничній кількості з’являються вже на 2 добу (розвиток фази проліферації), найбільше в периферичних зонах;

- з’ясовано, що особливостями кістковомозкового кровотворення за пригнічення запалення шляхом введення блокатору НКР-1 субстанції Р є менша кількість клітин, які беруть участь у реалізації переважно неспецифічних імунозапальних реакцій та маркерів стану системи коагуляції крові на ранніх етапах і більший вміст клітинної популяції лімфоцитарного ростку;

- оцінено характеристику периферичної крові на фоні блокади НКР-1 субстанції Р із тенденцією до зменшення кількості лімфоцитів та підвищення кількості моноцитів; за запалення на фоні блокади нейрокінінових рецепторів 1 типу субстанції Р на 6-у годину відбувається значиме зменшення ЗКЛ у 1,28 разів (р<0,05), а також на 10-у добу значиме зменшення кількості ПЯН у 4 рази (р<0,05) та кількості еозинофілів у 3 рази (р<0,05); є тенденція до зменшення кількості лімфоцитів у крові через 6 годин та починаючи з 7 доби до кінця дослідження; на 28 добу відбувається підвищення кількості моноцитів у 2 рази (р<0,01). В природніх умовах запалення субстанція Р стимулює лейкоцити крові, а також пролонгує запальну реакцію;

- виявлено меншу виразність цитокінової активації (ФНП-α, ІЛ-6) та концентрації С-реактивного білку у крові за блокади речовини Р; концентрації ФНП-α, ІЛ-6 у крові у разі блокади речовини Р змінюються, і статистично значущі відмінності виявляються у концентрації ІЛ-6 — через 10 днів (р=0,04).

Здобуло подальшого розвитку дослідження клітинних реакцій вогнища запалення, характеристика кістковомозкового кровотворення, визначення лейкоцитарної реакції периферичної крові, встановлення закономірності концентрації фактора некрозу пухлин α, інтерлейкіну 6, С-реактивного білку у крові за карагіненового вторинно хронічного запалення.

*Практичне значення одержаних результатів*. Дисертаційна робота належить до фундаментальних досліджень, одержані дані про роль тахікінінів у патогенезі запалення розширюють і поглиблюють існуючі уявлення про механізми даного процесу, що є важливим для розвитку загальної патології запалення і вдосконалення принципів і методів протизапальної терапії.

Аналіз результатів дослідження дозволив розробити рекомендації для регулювання реакцій системи крові в умовах запалення шляхом блокади субстанції P.

**Ключові слова:** хронічне запалення, кровотворення, периферична кров, цитокіни, тахікініни.

**SUMMARY**

*Syсh V. O*. The role of tachykinins in inflammatory blood system reactions. — Qualifying research work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the Philosophy Doctor degree in the specialty of 222 — Medicine, branch of knowledge 22 — Health Care, specialization 14.03.04 — pathologic physiology. — Kharkiv National Medical University MOH of Ukraine, — Kharkiv, 2021.

Scientific adviser: Shevchenko Oleksandr Mykolayovych, doctor of medical sciences, professor, head of the department of general and clinical pathophysiology named after D. O. Alpern of Kharkiv National Medical University.

The dissertation presents a theoretical generalization and solution of a current scientific problem - the role of tachykinins in the reactions of the blood system in inflammation. In the model of secondary chronic inflammation by studying cellular reactions and tissue changes of the inflammatory focus, bone marrow hematopoiesis, peripheral blood leukocyte reaction, tumor necrosis factor concentration α, interleukin 6, C-reactive protein in the blood in carrageenan secondary chronic inflammation, in particular, in substation P it was found that inhibition of NK-1 receptors of substance P reduces the chronicity of inflammation.

With the aim to establish the role of tachykinins in the reactions of the blood system in inflammatory conditions, an experimental prospective controlled randomized study was performed on 132 WAG rats. Control series rats remained intact for inflammation during the experiment or were only administered the drug and kept in unchanged standard conditions. Experimental rats of intervention series in accordance with the tasks were subject to modeling of inflammation and the use of a pharmacological drug - an inhibitor of NK-1 receptors of aprepitant. A carrageenan model of inflammation was selected, and 10 mg of α-carrageenan (Sigma, USA) in 1 ml of saline was administered intramuscularly to the rat thigh under shallow thiopental anesthesia. To inhibit the synthesis and effects of substance P, an NK-1 receptor inhibitor aprepitant was used, which was administered intraperitoneally at a dose of 10 mg dissolved in 1 ml of isotonic sodium chloride solution, daily throughout the experiment. Stratification of animals in separate series of the experiment (for 6 hours and for 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 days) was carried out in accordance with the objectives of the study in the amount of 6 individuals. Peripheral blood, femur, soft tissues of the inflammatory focus were used as material for the study. All animal manipulations were carried out in accordance with international and national ethics and bioethics.

The research problems were solved by studying cellular reactions and tissue changes of the inflammatory focus, bone marrow hematopoiesis, peripheral blood leukocyte reaction, tumor necrosis factor concentration α, interleukin 6, C-reactive protein in the blood in carrageenan secondary chronic inflammation, in particular, in conditions blockade of substance P, and also the criterion complex of forecasting of reactions of system of blood at carrageenan secondary-chronic inflammation and for blockade of substance P by application of means of the logical and statistical analysis and mathematical modeling is developed.

Morphological examination of muscle tissue samples shows that, as the introduction of only carrageenan (series of natural inflammation), and carrageenan and substance blocker, develop first alternative and exudative reactions, followed by a change in phases of inflammation from exudation to proliferation - multiplication of cellular and tissue elements, and inflammation becomes proliferative with the formation of granulomas. The process of organization begins with the peripheral areas, gradually replacing the entire focus of inflammation.

Morphological changes in both study groups are identical, develop in approximately the same time with a small difference in the intensity of the process. But the blockade of substance P accelerates the processes of proliferation and organization. Thus, neutrophils in inflammatory cell infiltration in the series of blockade of substance P are visually reduced in number in the observation period of 2 days, while in the group of natural inflammatory infiltration still contains a significant number of neutrophils up to 7 days, however, in foci. inflammation begins to increase the number of cells of the fibroblastic series and lymphomacrophage elements; the process of collagen formation in the series of blockade of substance P is observed in the observation period of 5 days, while in the group of natural inflammation - on the 7th day of observation; the appearance of granulomas in the series of blockade of substance P is observed already on the 10th day of observation, and in the series of natural course of inflammation - only on the 21st day.

The study of the dynamics of changes in the cellular composition of the inflammatory focus revealed that the accumulation of neutrophilic, basophilic and eosinophilic leukocytes is detected in the observation period of 6 hours – 3 days with peaks of their content: neutrophils and basophils - for 2 days; at the same time, neutrophils - in the central departments of the center of inflammation, basophils - in both zones (in the center and on the periphery) with a small predominance of the number of cells in the peripheral departments; eosinophils - for 1 day and with a slight decrease for 2 days, as well as with their predominant location in peripheral areas. This picture of the cell composition with the predominance of these cellular elements indicates the phase of exudation of the inflammatory process.

From 3–5 days, the cellular composition of the infiltrate is characterized by a predominance of lymphocytes, monocytes, macrophages, plasma cells, tissue basophils, fibroblastic cells (which appear in a single amount of blockade of substance P for 2 days), which indicates the development of the proliferation phase. The highest concentration of these elements is generally observed in the peripheral zones and predominates during the blockade of substance P, which, in turn, indicates the prevalence of proliferation and organization in peripheral areas.

Peculiarities of bone marrow hematopoiesis in carrageenan secondary chronic inflammation against the background of its suppression by administration of the NKR-1 blocker substance P is a smaller (p <0.05) in the early stages number of cells involved in the implementation of mostly nonspecific immunoinflammatory reactions and markers of the coagulation system blood. A higher content of the cell population of the lymphocytic germ of hematopoiesis was revealed against the background of blockade against the background of blockade of substance P.

Inflammation on the background of blockade of neurokinin receptors of type 1 substance P at the 6th hour is a significant decrease in CLL 1.28 times (p <0.05), as well as on the 10th day a significant decrease in the amount of PYAN 4 times (p < 0.05) and the number of eosinophils 3 times (p <0.05). Under conditions of blockade of substance P, there is a tendency to decrease the number of lymphocytes in the blood after 6 hours and from 7 days to the end of the study compared to the same terms of natural inflammation. On day 28, there was a 2-fold increase in the number of monocytes (p <0.01) compared with the same period of the natural course of inflammation. Under natural conditions of inflammation, substance P stimulates blood leukocytes and also prolongs the inflammatory response.

The blood concentrations of TNF-α, IL-6 in case of blockade of substance P vary, and statistically significant differences are found in the concentration of IL-6 – in 10 days (p=0.04). There are the trends in differences comparing with control are identified for concentration of TNF-α – in 1 day (p=0.08), in 3 days (p=0.08), in 7 days (p=0.08), in 10 days (p=0.05), in 14 days (p=0.05); concentrations of IL-6 –in 6 hours (p=0.08), in 3 days (p=0.08), in 5 days (p=0.08), in 7 days (p=0.08), in 14 days (p=0.05). This finding requires more thorough research with higher statistical power.

The blood concentration of CRP in case of blockade of substance P vary, and statistical tendencies are found. Trends in differences comparing with control are identified for concentration of C-reactive protein – in 6 hours (p=0.08), in 1 day (p=0.08), in 2 days (p=0.08), in 5 days (p=0.08), in 7 days (p=0.08), in 14 days (p=0.05).

*Scientific novelty of the obtained results*. For the first time, a special comprehensive study was conducted to determine the role of tachykinins in the reactions of the blood system to inflammation - the main effector system of this process. The modulating effect of tachykinins on the reactions of various parts of the blood system (inflammatory focus, bone marrow cells, peripheral blood leukocytes) has been established.

For the first time:

- the relationship between cellular reactions of the inflammatory focus, bone marrow hematopoiesis, leukocyte reaction of peripheral blood, concentration of tumor necrosis factor α, interleukin 6, C-reactive protein in the blood in carrageenan secondary chronic inflammation, in particular, blockade of substance P;

- the influence of certain factors, in particular, inhibition of synthesis and effects of substance P, on the reaction of the blood system in the conditions of carrageenan secondary chronic inflammation;

- it is established that the peculiarity of cellular reactions of the inflammatory focus in the conditions of substance P blockade is inhibition of alternative and exudative reactions, changes of inflammatory phases from exudation to proliferation - multiplication of cellular and tissue elements, and inflammation acquires proliferative character with granuloma formation. Thus, the accumulation of neutrophilic, basophilic and eosinophilic leukocytes is detected in the observation period of 6 hours to 3 days with peaks of their content: neutrophils and basophils - for 2 days (neutrophils - in the central foci of inflammation, basophils - in the center and periphery) with a small the predominance of the number of cells in the peripheral departments; eosinophils - for 1 day and with a slight decrease for 2 days with their predominant location in peripheral areas (phase of exudation of the inflammatory process); from 3-5 days the cellular composition of the infiltrate is characterized by a predominance of lymphocytes, monocytes, macrophages, plasma cells, tissue basophils, fibroblastic cells, which during blockade of substance P in a single amount appear for 2 days (development of the proliferation phase), mostly in peripheral areas ;

- it was found that the features of bone marrow hematopoiesis by suppressing inflammation by administering the NKR-1 blocker substance P is a smaller number of cells involved in the implementation of mainly nonspecific immunoinflammatory reactions and markers of the blood coagulation system in the early stages and higher cell population lymphocyte growth. ;

- the characteristics of peripheral blood against the background of blockade of NKR-1 substance P with a tendency to decrease the number of lymphocytes and increase the number of monocytes; for inflammation on the background of blockade of neurokinin receptors of type 1 substance P at the 6th hour there is a significant reduction in CLL 1.28 times (p <0.05), as well as on the 10th day a significant reduction in the number of PYAN 4 times (p < 0.05) and the number of eosinophils 3 times (p <0.05); there is a tendency to decrease the number of lymphocytes in the blood after 6 hours and from 7 days to the end of the study; on day 28 there is an increase in the number of monocytes in 2 times (p <0,01). Under natural conditions of inflammation, substance P stimulates blood leukocytes and also prolongs the inflammatory response;

- less pronounced cytokine activation (TNF-α, IL-6) and the concentration of C-reactive protein in the blood during the blockade of substance P; concentrations of TNF-α, IL-6 in the blood in the case of blockade of substance P change, and statistically significant differences are found in the concentration of IL-6 - after 10 days (p = 0.04).

The study of cellular reactions of the inflammatory focus, characterization of bone marrow hematopoiesis, determination of leukocyte reaction of peripheral blood, establishment of regularity of concentration of tumor necrosis factor α, interleukin 6, C-reactive protein in blood at carrageenan secondary chronic inflammation was further developed.

*The practical significance of the obtained results*. The dissertation is a fundamental research, the data on the role of tachykinins in the pathogenesis of inflammation expand and deepen existing ideas about the mechanisms of this process, which is important for the development of general pathology of inflammation and improvement of principles and methods of anti-inflammatory therapy.

Analysis of the results of the study allowed to develop recommendations for regulating the reactions of the blood system in inflammatory conditions by blocking substance P.

**Keywords:** chronic inflammation, hematopoiesis, peripheral blood, cytokines, tachykinins.