УДК: 612.2:591.12
№ держреєстрації 0120U105116

Національна академія наук України
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця
01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4; тел/факс (044) 256 24 04

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту фізіології
ім. О.О. Богомольця
академік НАН України
_____ Веселовський М.С.
(підпис)
(дата)
М.П.

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ
за договорами
від 16 листопада 2020 року № С-16/01-2020
від 6 травня 2021 р № 142/01/0517

«Моделювання гострого респіраторного дистрес синдрому (ARDS) у щурів із визначенням кількості NETs та позаклітинної ДНК в циркулюючий крові, дослідження інгібувальної активності перспективних лігандів щодо PKCB, оцінка ефективності впливу сполук, активних щодо PKCB, на індуковане утворення NETs в культурі, визначення дозозалежності»
(заключний)

Науковий керівник НДР
від співвиконавця
к.б.н., н.с. _____ Пашевін Д.О.
(підпис)
(дата)

2021

Рукопис закінчено 13 грудня 2021 р.

Звіт затверджено на засіданні Вченої ради Інституту 16.12.2021, протокол №2

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР від співвиконавця, к.м.н., н.с. відділу ЗМП Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця,	(підпис) (дата)	Д.О. Пашевін (вступ; розділи 1, 2, 3; висновки) 10.12.2021
Виконавці: Науковий співробітник к.м.н.	(підпис) (дата)	Д.О.Строй (вступ, розділи 2.1-2.5, 3.1-3.4) 10.12.2021
Аспірант	(підпис) (дата)	В.О.Поліщук (розділ 3.5-3.9) 10.12.2021
Аспірант	(підпис) (дата)	Т.О.Козак (розділ 2.6-2.13, 3.10-3.11) 10.12.2021

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 69 с., 43 рис., 3 таблиці, 18 джерел.

Ключові слова*:* нейтрофіли, ГРДС, інгібітори протеїнкінази Cβ, NETs, запалення, цитокіни, позаклітинна ДНК.

Об'єкт дослідження: зміни активності протеїнкінази Cβ та активності NETозу за умов впливу речовин-інгібіторів, зміни профілю цитокінів, НЕТозу та морфологічних змін тканин легень при моделюванні ГРДС та їх корекція пригніченням протеїнкінази С-бета.

Мета роботи: Дослідити таргетні речовини на здатність пригнічувати активність протеїнкінази Cβ та вивільнення нейтрофільних екстрацеллюлярних пасток in vitro, оцінити ймовірність цитотоксичного ефекту, отримати речовини з характеристиками, що відповідають вищезгаданим вимогам, перевірити їх можливість впливати на перебіг гострого респіраторного дистрес синдрому в моделі in vivo.

Методи дослідження: активність спонтанного та індукованого NETозу за допомогою флюоресцентної мікроскопії, ферментний імуносорбентний аналіз (ELISE) рівня цитокінів і протеїнкінази Св, визначення позаклітинна ДНК в плазмі методом спектрофлуориметрії, оцінка експресії прозапальних генів методом Real-time PCR, морфологічні (флуоресцентна та звичайна мікроскопія, конфокальна мікроскопія та морфометрія).

В ході роботи було проведено визначення кількості позаклітинних нейтрофільних пасток (NETs) в ізольованих нейтрофілах, визначено ефективність впливу інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) як ключового ферменту активації нейтрофільних гранулоцитів із утворенням NETs, проведено оцінку дозозалежності їх активності. Також був проведений ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA) для оцінки впливу досліджуваних речовин на активність пурифікованої протеїнкінази С бета in vitro. Таким чином, були визначені перспективні речовини, які можуть застосовуватися в якості блокаторів NETозу для попередження розвитку

ГРДС. Дані речовини-кандидати перевірялися на цитотоксичність (на культурі кардіоміоцитів), також вивчався їх дозозалежний ефект на активність пригнічення РКС-бета. Після даних досліджень відібрані речовини тестувалися на моделі ГРДС *in vivo*. Оцінювалися морфологічні (зміна маси легень, мікроскопічні зміни структури альвеол), імуногістохімічні (ELISE), генетичного (зміни експресії генів), та цитометричні показники, зміни активності ферменту протеїнкінази С-бета в дослідах in vitro, визначення цитотоксичності та дозозалежності досліджуваних речовин.

В результаті проведеної роботи визначені речовини-інгібітори протеїнкінази С-бета, які мали найбільший ефект щодо цього ферменту як в дослідах in vitro, так і на моделях ГРДС *in vitro*. Подальші дослідження даних речовин та інших інгібіторів цього ферменту дозволить в перспективі отримати препарат, здатний значно знизити ушкодження легень при ГРДС, а також бути ефективним при інших патологіях, в патогенезі яких є компонент асептичного запалення.

Abstract

Key words: neutrophils, ARDS, inhibitors of protein kinase Cβ, NETs, inflammation, cytokines, extracellular DNA.

Object of study: changes in protein kinase Cβ activity and NETs activity under the influence of inhibitory substances, changes in cytokine profile, NETosis and morphological changes in lung tissues during ARDS modeling, their correction by inhibition of protein kinase Cβ.

Objective: To investigate target substances for the ability to inhibit protein kinase Cβ activity and releasing of neutrophilic extracellular traps in vitro using cytometric, biochemical, immunohistochemical, genetic and morphological methods, to assess the likelihood of cytotoxic effects, to obtain substances with desirable characteristics and test their ability to influence the course of acute respiratory distress syndrome in vivo model.

Research methods: determination of activity of spontaneous and induced NETosis by fluorescence microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISE) of cytokine levels and activity of protein kinase Cβ, analysis of extracellular DNA in plasma by spectrofluorimetry, evaluation of proinflammatory genes expression, morphological (fluorescence and light microscopy, confocal microscopy and morphometry), modeling of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in vitro.

During our work the number of extracellular neutrophil traps (NETs) in isolated neutrophils was determined, the effectiveness of protein kinase inhibitors C beta (PKCB) as a key enzyme of activation of neutrophilic granulocytes with the formation of NETs was determined, and their dose-dependence was assessed. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was also performed to evaluate the effect of test substances on the activity of purified protein kinase C beta in vitro. These candidate substances were tested for cytotoxicity (in cardiomyocyte culture), and their dose-dependent inhibition activity of PKCB was studied. After these studies, the selected substances were tested on the model of ARDS in vivo, and

evaluated morphological (changes in lung weight, microscopic changes in alveolar structure), immunochemical (ELISA), genetic (changes in gene expression under different conditions) changes.

As a result of this work, there were identified protein kinase C-beta inhibitors, which had the greatest effect on this enzyme in both in vitro experiments and in vitro ARDS models. Further studies of these substances and other inhibitors of the enzyme will allow to obtain a drug that can significantly reduce lung damage in ARDS, as well as be effective in other pathologies in the pathogenesis of which there is an aseptic inflammation component.

ЗМІСТ

Вступ……..……..9
1. Сучасний стан проблеми…….……..10
2. Матеріали і методи дослідження..……13
2.1. Опис тварин, що використовували для отримання циркулюючих нейтрофілів……13
2.2. Оцінка речовин, підібраних методом молекулярного докінгу, на активність формування нейтрофільних екстрацелюлярних пасток…….13
2.3. Визначення дозозалежності відібраних інгібіторів РКСВ на утворення NETs……...15
2.4. Визначення ефективності і дозозалежності низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (РКСВ) *in vitro* методом ферментного імуносорбентного аналізу…….15
2.5. Оцінка кардіотоксичності відібраних сполук на культурі неонатальних кардіоміоцитів ……...16
2.6. Моделювання ГРДС у щурів лінії SHR……...18
2.7. Оцінка набряку легень …….19
2.8. Вимірювання вмісту білку у бронхолегеневому лаважі……20
2.9. Вимірювання концентрації вільної ДНК у бронхоленевому лаважі та плазмі крові щурів…….20
2.10. Вимірювання рівню цитокінів……...21
2.11. Визначення експресії генів, що кодують цитокіни……..21
2.12. Оцінка структури легень за допомогою світлової мікроскопії…..22
2.13 Імуногістохімічні дослідження……...24
3. Результати та їх обговорення
3.1. Оцінка речовин, підібраних методом молекулярного докінгу, на активність формування нейтрофільних екстрацелюлярних пасток……..26

3.2. Визначення дозозалежності відібраних інгібіторів РКСß на утворення NETs……..27

3.3. Визначення ефективності і дозозалежності низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (РКСß) *in vitro* методом ферментного імуносорбентного аналізу……32

3.4. Оцінка кардіотоксичності обраних блокаторів РКСß на культурі неонатальних кардіоміоцитів щура……35

3.5. Оцінка набряку легень……38

3.6. Оцінка вмісту загального білку у бронхолегеневому лаважі……..39

3.7. Оцінка вмісту позаклітинної ДНК у БАЛ та плазмі крові щурів….39

3.8. Визначення рівнів спонтанного та індукованого NETsis за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії у щурів з ГРДС……..42

3.9. Оцінка вмісту цитокінів……...48

3.10. Визначення експресії генів, що кодують цитокіни…….52

3.11 Оцінка ультраструктурних змін у легенях за методом світлової мікроскопії……54

Висновки……...……...65

Перелік джерел посилання……67

ВСТУП

В патогенезі багатьох процесів, що супроводжуються активацією нейтрофільних гранулоцитів на сьогодні важлива роль відводиться формуванню нейтрофільних екстрацеллюлярних пасток (NETs). У відповідь на велику кількість різноманітних стимулів (мікроорганізми та продукти їх діяльності, а також хемокіни) нейтрофіли викидають назовні сітки, що сформовані з їх власної ДНК. На цих сітках сорбовані такі ферменти як еластаза, протеїназа 3, мієлопероксидаза, катепсин G, дефензини та інші речовини з цитотоксичним ефектом. Таке поєднання різко збільшує площу розповсюдження вищезазначених речовин, а також формує матрикс, на якому вони будуть взаємодіяти з майбутніми мішенями, в тому числі із форменими елементами крові, що призведе до тромбоутворення. Природно, що і в патогенезі захворювань дихальної системи також грає роль активація нейтрофільних гранулоцитів з утворенням NETs. Зокрема, показано, що NETоз є одним з ключових патогенетичних механізмів запуску ГРДС [1, 2]. В цій роботі було продемонстровано, що у пацієнтів з ГРДС кількість NETs в бронхолегеневому лаважі корелювала з вираженістю і тяжкістю патологічного процесу. Найбільш цікавою частиною проекту є пошук найбільш ефективних низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) як ключового ферменту активації нейтрофільних гранулоцитів із утворенням нейтрофільних позаклітинних пасток та фізіологічного тестування відібраних молекул, що може забезпечити ефективне пригнічення надмірної імунної реакції. Такий спосіб боротьби с ГРДС може забезпечити швидке та безпечне усунення запалення і таким чином зменшить рівень смертності як при COVID-19, так і при інших вірусних респіраторних інфекціях.

1. СУЧАСНИЙ СТАН ПИТАННЯ

Гострий респіраторний дистрес синдром (ГРДС) є безпосередньою причиною загибелі людей при ураженні легень різного генезу, передусім, при інфікуванні коронавірусами SARS-CoV-2. COVID-19 є високопатогенним і може призвести до смертельних ускладнень, особливо до ГРДС. ГРДС розвивається у 42% пацієнтів, які страждають на пневмонію COVID-19, і у 61-81% пацієнтів, які потребують догляду у відділенні інтенсивної терапії. Смертність від типового ГРДС становить 40,0% (95% CI, 38,1% -42,1%). При COVID-19 від ГРДС смертність становить від 26% до 61,5% у відділеннях інтенсивній терапії, а у пацієнтів, які перебували ШВЛ, смертність може становити від 65,7% до 94%. [3, 4, 5]. У 2020 році з'явилися дані, що NETs мають велике значення в патогенезі коронавірусної хвороби. Так, у роботі Yu Zuo зі спів. показано, що в сироватці крові пацієнтів з COVID-19 підвищується рівень вільної ДНК, кон'югованої з ДНК мієлопероксидази (MPO-DNA) та цитрулінованого гістону H3 (Cit-H3) – основних високоспецифічних маркерів NETs [6]. В іншій роботі показано, що нейтрофіли формують NETs при гострому ураженні легень. Крім безпосереднього ушкодження, NETs провокують поляризацію альвеолярних макрофагів та утворення M1 фенотипу з прозапальною активністю. Було встановлено, що в пацієнтів з ГРДС рівень M1 корелював з NETs, так само, як і при експериментальному відтворенні цього синдрому [7]. Очевидно, що надлишок прозапального фенотипу макрофагів у легенях є ініціальним моментом розвитку важких форм COVID-19, які супроводжуються масивним виділенням прозапальних цитокінів ("цитокіновий шторм") з залученням у пошкодження й інших органів.

У цілому, активне утворення NETs є характерним для людей з груп ризику розвитку тяжкого перебігу COVID-19: це люди похилого віку [8], хворі із серцево-судинною патологією [9], цукровим діабетом та ожирінням [10].

З огляду на вищезгадані дані стає зрозумілою важливість дослідження процесів активації нейтрофільних гранулоцитів в механізмах реалізації ГРДС, зокрема, при COVID-19. Для вирішення цієї наукової проблеми потрібна релевантна модель, що дозволятиме розкрити патогенетичні ланцюги, в які залучені нейтрофільні гранулоцити. На нашу думку, такою моделлю може виступати комбінований вплив гіпервентиляції та одночасного введення Poly(I:C) низької молекулярної маси в верхні дихальні шляхи тварини. Аналоги такої моделі використовувалась раніше [11], було показано, що застосування Poly(I:C) погіршило перебіг ГРДС через активацію TLR3 за умов супутньої гіпервентиляції. Відповідно, відтворення патологічних змін таким способом дасть змогу оцінювати вплив різноманітних агентів на перебіг ушкоджень легеневої тканини. Найбільш перспективною мішенню щодо впливу на участь нейтрофільних гранулоцитів в ГРДС, на нашу думку, є протеїнкіназа С β. Велика кількість досліджень доводять критичну важливість активної PKC для реалізації нейтрофільних пасток [12, 13].

Виходячи з наведених даних, пошук нових препаратів для контролю активності нейтрофільних гранулоцитів та пригнічення утворення NETs є вельми перспективним в якості можливих препаратів, що будуть зменшувати альтернативні процеси при ГРДС. На нашу думку, найкращою мішенню для терапевтичного впливу є протеїнкіназа С бета (PKCB) – ключовий фермент, який активується при активації рецепторів нейтрофілів (ряду толл-лайк рецепторів, CD-14 та інших) та забезпечує залучення усіх сигнальних шляхів реалізації. Маючи підтверджену модель (щури з впливом Poly(I:C) та гіпервентиляцією) ми могли адекватно оцінити вплив різних речовин-інгібіторів PKCB на перебіг ГРДС, та відібрати найефективніші з них у якості перспективних лікарських засобів. Для відбору речовин найбільш ефективними, на нашу думку, було дослідження їх впливу на культуру ізольованих нейтрофільних гранулоцитів і паралельне дослідження ефекту речовин на активність протеїнкінази С бета (PKCB) шляхом ферментного

імуносорбентного аналізу (ELISA) з подальшим дослідженням дозозалежності їх впливу та відсутності цитотоксичного ефекту. Після проведення даних дослідів і отримання найбільш ефективних представників проводився наступний етап, де вивчався вплив *in vivo* на цитологічні, генетичні та морфологічні показники, які мають безпосереднє відношення до розвитку гострого респіраторного дистрес синдрому. Знаючи, що супутні захворювання (ЦД, артеріальна гіпертензія, метаболічний синдром) та похилий вік значно ускладнюють перебіг ГРДС у хворих, дослідження ми проводили на старих щурах (від 16 до 20 місяців) лінії SHR.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Всі процедури були виконані у відповідності до вимог Директиви Європейського союзу 2010/63/EU про захист тварин, що використовуються у наукових цілях та затверджені Комітетом Біомедичної Етики Інституту Фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України.

2.1 Опис тварин, що використовували для отримання циркулюючих нейтрофілів

У експериментах *in vivo* було використано венозну кров дорослих самців кролів масою 6300±300 г та щурів лінії SHR (спонтанно-гіпертензивні щури) віком 16-20 місяців, вагою 375±20 г. Перед експериментами тварин утримували в стандартних умовах віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України при природній тривалості світлового дня та температурному контролі приміщення. Тварини утримувались на збалансованій дієті та мали необмежений доступ до їжі і води. Забір крові кролів проводився після 20 хв утримання тварини без стресу в спеціальній клітці, забір крові у щурів проводили безпосередньо після забою тварин.

2.2. Оцінка впливу речовин, підібраних методом молекулярного докінгу, на активність формування нейтрофільних екстрацелюлярних пасток.

Забір крові проводили з використанням системи для забору крові S-Monovette Sarstedt, стабілізатор-антикоагулянт EDTA). Після забору проводили фракціонування отриманої крові з використанням методики центрифугування в градієнті перколу. Для цього стабілізовану натрієвою сіллю ЕДТА кров розводили 0.9 % розчином хлористого натрію в співвідношенні 1:1, після чого нашаровували на заздалегідь підготовлений градієнтний розчин перколу, який складався з 4 шарів з відносною густиною 72%, 63%, 54%, 45%. Вказані концентрації перколу одержували при змішуванні 9 частин перколу і 1 частини 10-кратного розчину Хенкса (pH 7.0),

після чого необхідна густина досягалася шляхом розбавлення відповідною кількістю 0.9% розчину хлористого натрію. Центрифугування крові проводилося в два етапи: 1) при 400 g протягом 5 хв, після чого відбирався перший надосадовий шар, а відібраний об'єм компенсували додаванням еквівалентної кількості 0.9% розчину хлористого натрію; 2) 800 g протягом 15 хв, по завершенні якого відбувався відбір клітин між шарами густини 45% і 54% (моноцити), 54% і 63% (лімфоцити), 63% і 72% (нейтрофільні гранулоцити); 3) фракцію нейтрофільних гранулоцитів поміщали в пробірку та центрифугували при 1200 g протягом 5 хв. Надосадові залишки градієнта перколу заміщували середовищем для культивування (RPMI-1640 Medium, Sigma-Aldrich), і обережно розводили в ньому осад. Після відмивання кількість отриманих клітин оцінювалася шляхом підрахунку в камері Горяєва, потім отримані нейтрофільні гранулоцити поміщали в плашки, на дні яких були заздалегідь підготовлені скельця та середовище RPMI з розрахунку 800 мкл на лунку. Клітини висаджували на круглі скельця (d=12 mm) з розрахунку 140000-160000/см2, інкубували протягом трьох годин в термостаті при температурі 37ºС. Кожна проба крові поділялася на контрольну (для визначення спонтанного рівня, інкубація без впливів додаткових речовин) та індуковану, де до клітин, що інкубувалися, додавали активатор процесу утворення нейтрофільніх пасток (phorbol-12-myristate-13-acetate, Sigma-Aldrich).

Для оцінки активності процесів утворення нейтрофільних позаклітинних пасток використовували методику підрахунку клітин з подвійним забарвленням флуоресцентними барвниками. Для цього дослідне скло виймали з плашки, промивали PBS, додавали барвник Hoechst 33342 (10 мкл стокового розчину на 780 мкл PBS) та пропідіум йодид (1 мкл стокового розчину на 780 мкл PBS) і залишали на 10 хвилин в термостаті при температурі 37ºС). По закінченні часу ще раз промивали розчином PBS і проводили підрахунок на флуоресцентному мікроскопі Nikon Eclipse E200

використовуючи фільтр DAPI з фотофіксацією за допомогою камери DS-FI-1. На кожному склі підраховували по 500 клітин та визначали відсоток формування нейтрофільних пасток та інтактних нейтрофілів.

2.3. Визначення ефективності низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) на утворення NETs.

Ефективність дії специфічних інгібіторів протеїнкінази С β на активність процесів утворення нейтрофільних екстрацелюлярних пасток визначалася наступним чином: досліджувані речовини розводили в DMSO з отриманням розчинів концентрацією 1 мкМ. Лунки з виділеними нейтрофільними гранулоцитами (виділення за вищеописаною методикою) поділялися на три групи: контрольна (інтактні клітини), стимульована (нейтрофіли, що інкубували з phorbol-12-myristate-13-acetate, активатором NETозу), дослідна (нейтрофіли, що інкубувалися одночасно з phorbol-12-myristate-13-acetate та з досліджуваною речовиною – певним інгібітором протеїнкінази С β).

Інкубація тривала протягом трьох годин в термостаті при 37°С. Результатом дослідження був підрахунок активності NETозу в стимульованих нейтрофілах та зміни його активності за умов додавання досліджуваних речовин. За звітний період була проведена оцінка наступних речовин-можливих інгібіторів протеїнкінази С β.

2.4 Визначення ефективності і дозозалежності низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) in vitro методом ферментного імуносорбентного аналізу.

Визначення активності протеїнкінази Cβ при дії інгібіторів проводили з використанням набору PKC Kinase Activity Kit (ab139437), який забезпечує простий нерадіоактивний і надійний метод кількісного визначення активності всіх ізоформ PKC в нативних, частково очищених лізатах або на чистому

ферменті. Цей набір також використовується для скринінгу фармакологічних інгібіторів або активаторів ПКС. При цьому аналізі спеціальний синтетичний пептид використовується як субстрат, специфічний для ПКК. Цей субстрат, яким попередньо покриті лунки на мікропланшеті, фосфорилюється ПКК після додавання АТФ. Фосфорильований субстрат розпізнається поліклональним антитілом, яке розпізнає лише фосфосубстрат. Згодом фосфоспецифічне антитіло розпізнається вторинним антитілом, яке кон'юговане HRP. Після інкубації із вторинними антитілами, додають розчин ТМБ (3,3`,5,5`-тетраметилбензидин), який розщеплюється пероксидазою хріна та набуває кольору. Фосфорилювання субстрату та колір ТМВ розвиваються пропорційно активності ПКС, яка є у зразку. Процес розвитку кольору припиняється кислотою (Stop solution), а інтенсивність кольору вимірюється в умовних одиницях за допомогою мікропланшетного рідера при OD 450 нм, контрольнім показником, який віднімається від даної оптичної щільності є щільність виміряна при довжині хвилі 630 нм. Оптична густина в контрольній лунці з інтактним ферментом приймається за 100%.

2.5 Оцінка кардіотоксичності відібраних сполук на культурі кардіоміоцитів

Виділення неонатальних кардіоміоцитів. Шляхом цервікальної дислокації щури знерухомлювалися та анестезувалися. Після цього через передній поздовжній розріз виймається серце. Шлуночки відокремлювалися від передсердь і двічі відмивалися у стерильному буферному сольовому розчині (pH 7,4) наступного складу: HEPES – 20 ммоль/л, KCl – 5,4 ммоль/л, NaCl – 116,4 ммоль/л, глюкоза – 5,5 ммоль/л, Na_2HPO_4 – 0,4 ммоль/л та K_2HPO_4 – 0,4 ммоль/л. Після цього вони механічно подрібнювалися ножицями до отримання шматочків тканини розміром близько 1мм^3. Ці шматочки міокарду підлягали ферментативному розщепленню у середовищі виділення, яке на основі зазначеного буферу містило колагеназу II типу (95 ОД/мл) та панкреатин (0,6 мг/мл). Перетравлення відбувалося у п’ять циклів по десять

хвилин кожний. Під час цього процесу шматочки міокарду перемішувалися у середовищі виділення за допомогою магнітного перемішувача. Після кожного з циклів шматочкам міокарду давали осісти, а надосадове середовище зливали. Починаючи з третього циклу, шматочки міокарду додатково підлягали процесу механічного суспендування шляхом піпетування, після чого середовище виділення збиралося у пробірку. Клітини осаджувалися шляхом центрифугування при 400 g протягом 60 с, після чого клітини ресуспендувались у живильному середовищі культивування такого складу: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 - 4:1), бичача сироватка - 8%, Na_2CO_3 – 4,2 ммоль/л, HEPES - 15 ммоль/л та антибіотики (стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл, пеніцилін – 100 ОД/мл). Кількість живих та загиблих клітин визначали за допомогою методу фарбування клітин 0,2 % розчином трипанового синього. Отримані клітини саджали на 96-лункові планшети (20 тисяч клітин на лунку) та інкубували з доксорубіцину гідрохлоридом (Sigma Aldrich) в середовищі DMEM+199 48 годин Культивування проводили у живильному середовищі вищезазначеного складу при 37°С у газовому середовищі, яке містило 5% CO^2 та 95% атмосферного повітря.

МТТ-тест. Для кількісної оцінки кардіотоксичності відібраних речовин, використовували МТТ-тест (MTT Protocol, Wallertand Provost Lab), котрий базується на здатності живих клітин перетворювати блідо-жовтий водорозчинний 3-(4,5-диметилтіазолін-2)-2,5-дифенілтетразолійбромід (МТТ) в блакитні кристали формазану (МТТ-ф), нерозчинні у воді. Кількість утвореного формазану визначали колориметричним методом після його розчинення в органічних розчинниках. Через добу в кожну лунку додавали по 20 мкл стокового розчину МТТ (5 мг МТТ (Sigma Aldrigh) на 1 мл PBS) та інкубували 4 години. Результат оцінювали шляхом вимірювання на спектрофотометрі CFEX-45 ColorFlex (Hunter Lab Inc, США) оптичної

щільності лізату в лунках, отриманого за допомогою додавання в кожну лунку по 200 мкл DMSO, при довжині хвилі 570 нм.

2.6. Моделювання ГРДС на щурах лінії SHR

Для досліджень було відібрано 40 щурів-самців лінії SHR отриманих із лабораторії Charles River (США). віком 16-20 місяців, середня вага 375±23 г. Наявність артеріальної гіпертензії було підтверджено за допомогою неінвазивного приладу CODA monitor. В дослідження відібрали тварин з наступним тиском: Systolic 190 ± 17,62 мм рт.ст, Diastolic 133,7 ± 22,7 мм рт. ст.

Вони випадково були розподілені на 4 групи: 1. SHAM (вдаване втручання) 10 тварин, 2. ГРДС, 10 тварин 3. ГРДС + введення 1мкМ речовини 146528 (10 тварин) 4. ГРДС + введення 1 мкМ речовини 963975 (10 тварин).

Тварин анестезували (уретан, 1,5 г / кг), вставляли трахеостому (19fr тупа Луєр канюля) та підключали до апарату FlexiVent. У яремну вену вставляли венозний катетер, який використовували для введення NaCl (групи 1 та 2), або блокаторів РКСВ (групи 3 та 4). Відібрані для дослідження *in vivo* речовини (146528 та 963975) вводили у дозі 1мкМ (розведені у 100 мкл NaCl) у венозний катетер за 10 хвилин до початку введення PolyI:C (щури групи 3 та 4). Щурам групи 1 та 2 (SHAM та ГРДС) вводили той самий об’єм фізіологічного розчину.

Тварини підтримувалися за температури 37°С і при дії міорелаксанту (Atracurium-Novo, Novopharm Biosynthes, Україна).

Моделювання гострого респіраторного дистрес синдрому проводили шляхом поєднання інтратрахеального введення PolyI:C та наступної гіпервентиляції протягом 4-х годин.

PolyI:C вводили в дозі 30 мг/кг, попередньо розчинивши його у 300 мкл фізіологічного розчину. Розпилення відбувалося протягом 10 хвилин із зволоженням 20% (в контрольній групі розпилювали фізіологічний розчин за аналогічним протоколом) ультразвуковим розпилювачем (Aeroneb Pro, ANP-1100, Aerogen Ltd, Irland) через струс порт респіратора. Дані молекули імітують вірусну пневмонію і, таким чином, наближають дану модель до ГРДС, яка розвивається при COVID-19.

Одразу після введення PolyI:C вмикали протокол прецизійної гіпервентиляції та проводили її протягом 4 годин із такими параметрами: частота вентиляції 90 разів/хв, tidal volume 35 ml/kg (у групі SHAM 10 ml/kg, дихальний об’єм в перерахунку на масу щура), Peep 0 мм (у групі SHAM 2 мм.в.ст., позитивний тиск на кінець видиху, попереджає (в групі SHAM) або збільшує пошкодження легень), Pmax 30 мм.в.ст. (обмеження по максимальному тиску під час вдиху).

2.7. Оцінка набряку легень

Вміст рідини в легенях, пов'язаний з пошкодженням легень, вимірювали, використовуючи співвідношення ваги вологих легень до сухих. Ліві нижні відділи легень зважували одразу після видалення (мокра маса, wet) і знову зважували після сушіння в духовій шафі при 60°C протягом 72 год (суха маса, dry). Співвідношення ваги легкого і сухого розраховували як відношення вологої ваги до сухої ваги. Таким чином оцінювали ступінь набряку легень, чим більше цей показник, тим більше набряк.

2.8. Вимірювання вмісту білку в бронхолегеневому лаважі (БАЛ)

Бронхоальвеолярне промивання проводили двічі з використанням 1 мл фізіологічного розчину. Отриману рідину центрифугували при 1500 об/хв протягом 10 хв (при 4°C), а надосадову рідину зберігали при –80 ° C до аналізу.

Вимірювання загальної концентрації білку у БАЛ було проведено на приладі Nanodrop 1000 у відповідності до інструкції**.**

2.9. Вимірювання концентрації вільної ДНК у бронхоленевому лаважі та плазмі крові.

Концентрація вільної ДНК була виміряна у плазмі крові на спектрофотометрі Hitachi4000 за допомогою набору для тестування dsDNA Quant-iT PicoGreen (Invitrogen).

Побудова калібрувальної кривої. Для приготування калібрувальної кривої використовувалась стандартна лямбда-ДНК, що надається зі 100 мкг/мл у наборах Quant-iT ™ PicoGreen®. Для отримання концентрації робочого розчину 2 мкг/мл її розводили в 50 разів ТЕ буфером. Концентрацію ДНК підтверджували на хвилі поглинання 260 нм (А260) в кюветі з довжиною шляху 1 см. А 260 0,04 відповідає 2 мкг/мл розчину дволанцюгової молекули ДНК. Стандартну криву створювали в п’яти точках з концентраціями від 1 нг/мл до 1 мкг/мл, потім додавали 1,0 мл робочого водного розчину реагенту Quant-iT™PicoGreen® (після попереднього розведення стокового розчину у 200 разів) до кожної кювети.

Одразу після забору венозної крові проводили центрифугування протягом 10 хв при 1,5 тис g для розділення формених елементів та плазми. Плазму крові вносили у кювети для спектрофлуориметра, додавали 1,0 мл водного робочого розчину реагенту Quant-iT ™ PicoGreen® до кожної кювети. Добре перемішували та інкубували протягом 2–5 хв при кімнатній температурі в темноті. Вимірювали флюоресценцію на таких довжинах хвиль: збудження ~ 480 нм, випромінювання ~ 520 нм. Перерахувували концентрацію вільної ДНК у пробах, використавши побудовану калібрувальну криву. Проби з ДНК внести у кювети для спектрофлуориметра, додати 1,0 мл водного робочого розчину реагенту Quant-iT ™ PicoGreen® до кожної кювети. Добре

перемішати та інкубувати протягом 2–5 хв при кімнатній температурі в темноті. Виміряти флюоресценцію на таких довжинах хвиль: збудження ~ 480 нм, випромінювання ~ 520 нм. Перерахувати концентрацію вільної ДНК у пробах використавши побудовану калібрувальну криву.

2.10. Вимірювання рівню цитокінів

Для вимірювання кількості Il-1beta, Il-6, Il-10 та TNF-alpha використовували метод прямого імуноферментного аналізу. При цьому антиген пасивно приєднується до пластичної твердої фази за період інкубації. Після етапу промивання антиген виявляється шляхом додавання спочатку первинного антитіла, а потім вторинного антитіла, ковалентно зв'язаного з ферментом. Після інкубації та промивання в плашку додається хромоген/субстрат, завдяки чому активність ферменту викликає зміну кольору. Кольорова реакція зупиняться через певний час, а інтенсивність кольору зчитується на спектрофотометрі.

2.11. Визначення експресії генів, що кодують цитокіни.

Визначення кількості матричних РНК генів, що кодують хемокіни та цитокіни (TNFalpha, Il-6, Il-10 тощо) проводили у тканинах легень методом Real-time PCR з використанням флюоресцентномічених зондів.

Виділення РНК з тканин легень. Для виділення тотальної РНК з клітин зразків була використана гуанідин ізотіоцианат-фенол-хлороформна екстракція з використанням реагенту Trizol (Invitrogen). Виділені зразки РНК розводили у 50 мкл дистильованої води, після чого вимірювали концентрацію РНК та оцінювали чистоту спектрофотометричним методом (NanoDrop ND1000).

Зворотна транскрипція. Спочатку готувалася реакційна суміш, яка містила 1 мкл Random Hexamer primer, 5 мкл очищеної від нуклеаз деіонізованої H_2O та 6 мкл тотальної РНК. Отримані зразки інкубували при температурі 70 °C

впродовж 5 хв на ампліфікаторі Gene Amp®PCR System 2700, виробництва Applied Biosystems, США. На другому етапі до суміші додавали 2 мкл dNTP (^{x}10), 4 мкл Buffer RT, 0,5 мкл RiboLock RNAse inhibitor та 1 мкл RevertAid H Minus Reverse Transcriptase. Отримані зразки термостатували при 42°С протягом 60 хв., після чого інкубували при 70°С впродовж 10 хв.

Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі. ПЛР у реальному часі проводилася з використанням приладу 7500 Fast Real Time PCR від Applied Biosystems (США). Для здійснення ПЛР у 96-лунковий планшет вносили по 10 мкл суміші із 5 мкл TaqMan Universal PCR Master Mix, 0,15 мкл зонду для кожного окремого гену (TNFα, IL-6, IL-10) 0,2 мкл Rox (1:9), 2,65 мкл H_2O та по 2 мкл кДНК. Денатурацію кДНК проводили за температури 95°С протягом 15 с. Приєднання зонду та елонгація здійснювалася за температури 60°С протягом 1 хв. Реєстрацію флуоресценції проводили кожного циклу під час етапу елонгації. Програма ПЛР у реальному часі складалася із 50 циклів.

2.12. Світова мікроскопія

Для оцінювання структурних змін в тканинах легень у експериментальних тварин, що перебували в умовах штучної вентиляції легень із загальноприйнятим об`ємом – 10 мл/ кг на фоні інтратрахеального введення фізіологічного розчину n = **5** та в режимі гіпервентиляції на фоні інтратрахеального введення Poly I:C (n=9) ізолювалася інфракардіальна та каудальна долі правої легені легені щурів Тканини легень фіксувалися в 10% забуференому формаліні з подальшою заливкою в парафін та порізкою парафінових зрізів товщиною 7 мкм. Парафінові зрізи фарбувалися гематоксилін-еозином та вивчалися на мікроскопі Nikon Eclipse E200, зображення фіксувалися за допомогою камери Nikon DS-Fi1.

Для об’єктивного визначення стану компонентів тканини легень при різних впливах були включені загальноприйняті методи оцінювання їх геометричних параметрів.

Були проаналізовані наступні морфометричні показники: для оцінювання респіраторного відділу легень визначались об'єм альвеолярного простору та міжальвеолярних перегородок по відношенню до площі, що досліджувалась у відсотках. Для оцінювання стану повітроносних шляхів в поперечних зрізах бронхіол, визначались площа простору обмеженого базальною мембраною бронхіального епітелію, включаючи просвіт бронхіоли, (Abm), зовнішньою межею гладкої мускулатури (Amo) і зовнішньою адвентиціальною межею (Ao). Наступні параметри були розраховані, базуючись на отриманих у результаті вимірів даних: загальна площа стінки бронхіоли, за виключенням площі просвіту (WAt = Ao - Abm), площа внутрішньої області стінки бронхіоли (слизова оболонка), за виключенням площі просвіту бронхіоли (WAi = Amo – Abm) та площа зовнішньої області стінки бронхіоли (підслизова оболонка) (WAo = Ao – Amo). Отримані показники, в свою чергу дозволили визначити площу окремих зон стінки бронхіоли як відсоток від загального простору, а саме: площу внутрішньої області стінки від загальної площі бронхіоли, включаючи просвіт у відсотках- %TAi; площу зовнішньої області стінки бронхіоли від загальної площі бронхіоли, включаючи просвіт у відсотках-%TAo; тотальну площу стінки бронхіоли (слизова та підслизова оболонка) по відношенню до загальної площі бронхіоли, включаючи просвіт – %TAt. А також відсоток площі внутрішньої області стінки бронхіоли (слизової оболонки) від загальної площі бронхіоли без урахування площі просвіту – %Wai та відсоток площі зовнішньої області стінки бронхіоли від загальної площі стінки бронхіоли без урахування площі просвіту – %Wao. (1, 2) Показник %Wab і демонструє динаміку змін площі просвіту бронхіоли. Аналізувались поперечні зрізи бронхіол з діаметром до 0,5 мм, в яких відношення меншого діаметру до більшого діаметру не перевищувало значення 0,5 (це свідчило про те, що зріз бронхіоли є поперечним).

Також морфометрично були проаналізовані товщина міжальвеолярних перегородок та об’єм повітряного простору альвеол.

Морфометричне оцінювання проводилося із використанням програмного забезпечення ImageJ.

2.13. Імуногістохімічні дослідження

Для виявлення рівнів інфільтрації активованими нейтрофілами паренхіми легень тварин, задіяних у експерименті, застосовувався імуногістохімічний метод подвійного мічення. Виявляли маркерний білок нейтрофілів – мієлопероксидаза (anti-MPO Antibody (8F4) Novus Cat/N NBP1-51148)) та маркер активації утворення нейтрофільних позаклітинних пасток (NETs) - цитрулінований гістон H3 (Anti-Histone H3 (citrulline R17) antibody Abcam Cat/N ab219407). Після депарафінізації та регідратації зрізи, товщиною 4 мкм інкубували в цитратному буфері (pH 6.0) при 90°C протягом 40 хв для демаскування епітопів та блокуючому буфері, в склад якого були включені 3% BSA та 10% козячої сироватки протягом 1 год при кімнатній температурі. Первинні антитіла розводились в буфері, що містив 0,3% BSA та 0,1% Triton-X100. Інкубація зрізів в розчині вищезгаданих первинних антитіл проводилась при кімнатній температурі протягом 2 год. Для візуалізації реакції зв’язування первинних антитіл із відповідним білком використовувались вторинні антитіла мічені Alexa 596 для мієлопероксидази та Alexa 488 для цитрулінованого гістону (H3) Матеріал аналізувався за допомогою конфокального мікроскопу FV1000-BX61WI (Olimpus, Japan)

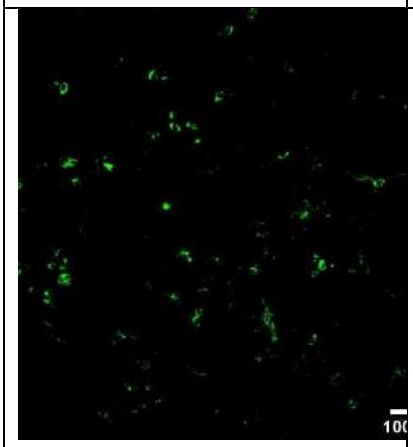
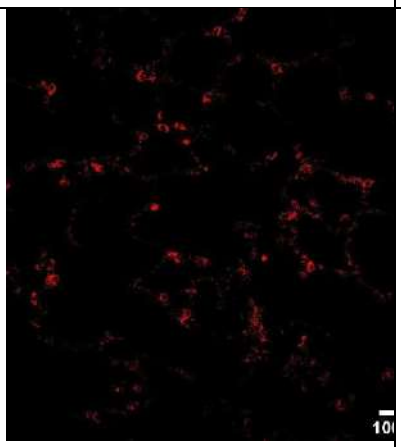
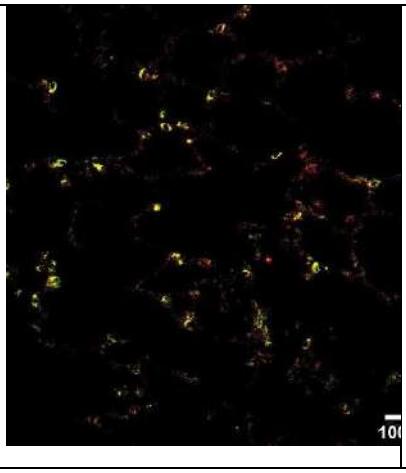
цитрулінований гістон H3	мієлопероксидаза	композит
		

Рис.1. Іммуногістохімічне виявлення нейтрофілів в паренхімі легені щура. Нейтрофіли, які містять маркерний білок мієлопероксидазу (червоний) та цитрулінований гістон H3 (зелений), знаходяться в процесі формування нейтрофільних позаклітинних пасток.

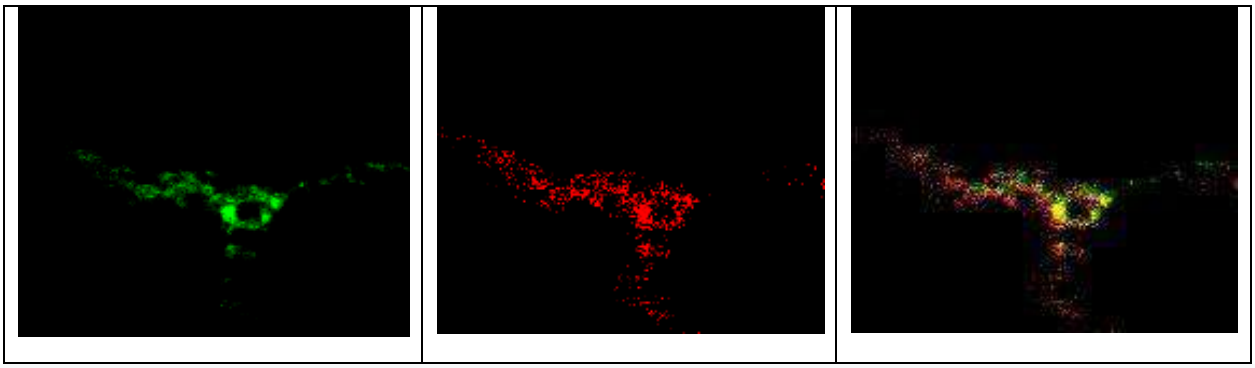


Рис .2 Деталізована ділянка Рис. 1. Нейтрофіл, який сформував позаклітинну пастку.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Оцінка речовин, підібраних методом молекулярного докінгу, на активність формування нейтрофільних екстрацелюлярних пасток

Першим завданням нашої частини досліджень була оцінка ефективності впливу речовин-інгібіторів протеїнкінази С-бета, що були відібрані методом молекулярного докінгу в інституті молекулярної біології і генетики, на розвиток нейтрофільних екстрацелюлярних пасток, що індукувалися форболмірістатацетатом. В таблиці, що приведена нижче, показаний відсоток реалізації різних видів клітинних реакцій за умов впливу досліджуваних речовин. Загальний відсоток клітин становить 100%, співвідношення всіх типів клітин наведений у таблиці у % (Таблиця 1).

Таблиця 1. Відсоток реалізації різних видів нейтрофільної відповіді за умов впливу досліджуваних речовин-інгібіторів протеїнкінази Сβ.

Номер речовини	Живі клітини, %	НЕТоз, %	Незавершений НЕТоз, %	Апоптоз, %
272030	84	11	5	0
826209	63	31	3	3
412247	88	3	8	1
786436	94	1	5	0
786437	92	3	5	0
786440	45	38	15	2
146528	93	5	1	1
146555	87	10	0	3
826603	54	34	6	6
826611	77	8	12	3
826627	54	38	8	0
790668	90	3	7	0
790669	48	33	14	5
790673	91	1	6	2

790714	58	26	10	6
271831	33	7	40	20
271832	83	15	0	2
963842	49	40	11	0
963861	52	32	13	3
963863	44	46	3	7
271871	86	9	5	0
271872	79	15	6	0
963893	61	37	0	2
274901	81	16	3	0
963924	59	30	7	4
271924	57	40	3	0
274927	92	4	4	0
963975	91	3	5	1

На даній таблиці показані результати оцінки нейтрофільних екстрацелюлярних пасток в найбільш ефективних речовин, що були надані для дослідження. Виходячи з відсотку пригнічення активності формування нейтрофільних пасток в умовах виділених ізольованих нейтрофільних гранулоцитів, нами було виділено чотири найбільш перспективні представники (виділені жовтим кольором). Червоним кольором виділені результати по речовинам, які не викликали протекцію.

3.2 Визначення дозозалежності відібраних інгібіторів PKCB на утворення NETs

На наступному етапі була проведені дослідження дозозалежності ефекту відібраних 4-х речовин.

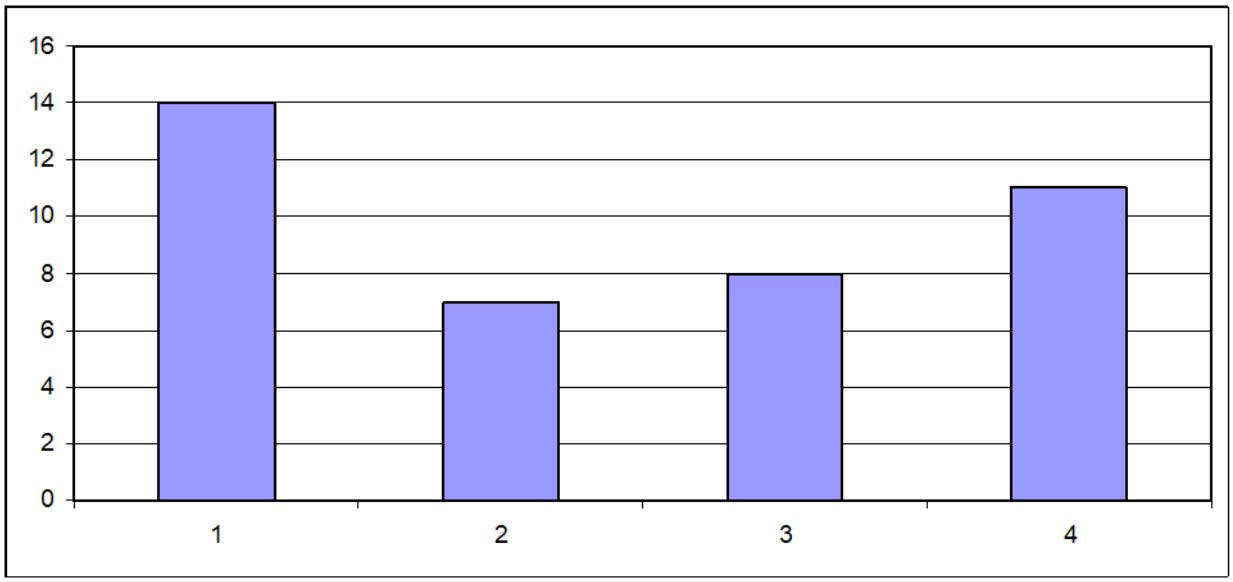


Рис. 3. Дозозалежність впливу речовини 786436 на ефективність формування NETs.

1. відсоток НЕТозу, індукований форболмірістатацетатом. 2. вплив 250 нМ речовини на виділені нейтрофільні гранулоцити. 3. Вплив 500 нМ речовини. 4. Вплив 1 мкМ речовини

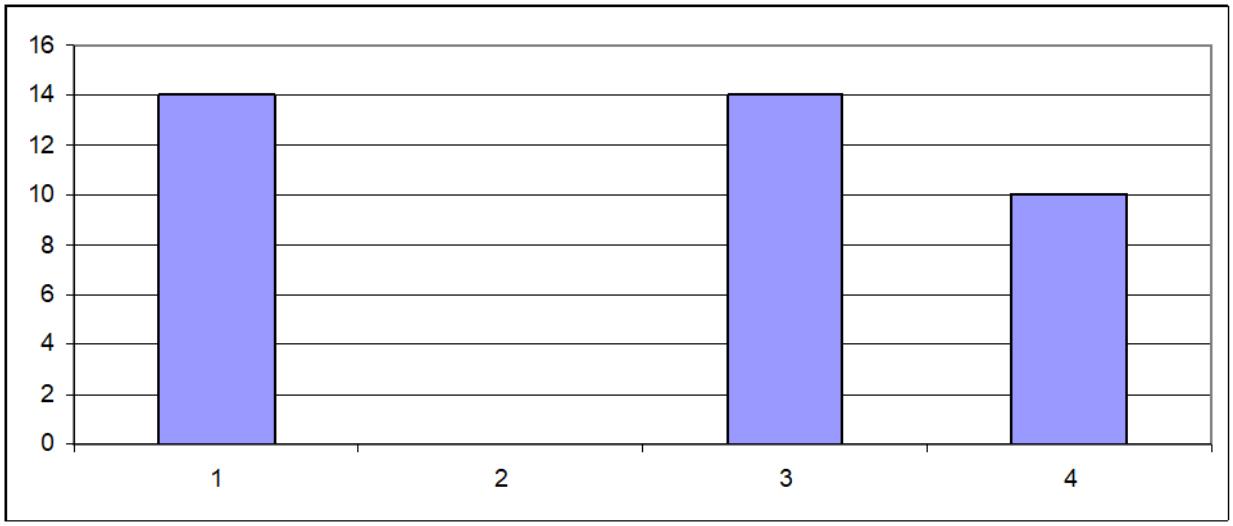


Рис. 4. Дозозалежність впливу речовини 146528 на ефективність формування NETs.

1. Відсоток НЕТозу, індукований форболмірістатацетатом. 2. вплив 250 нМ речовини на виділені нейтрофільні гранулоцити. 3. Вплив 500 нМ речовини. 4. Вплив 1 мкМ речовини.

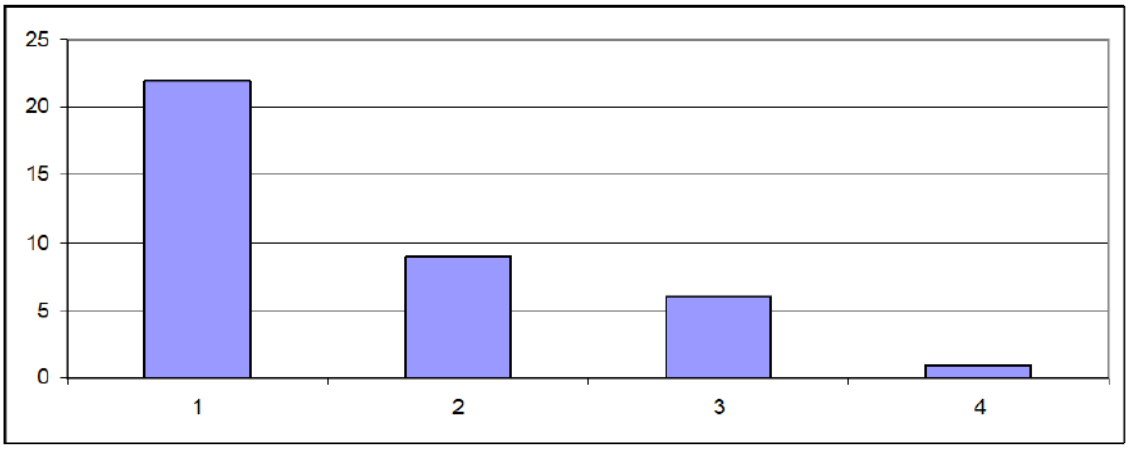


Рис. 5. Дозозалежність впливу речовини 790668 на ефективність формування NETs.

1. Відсоток НЕТозу, індукований форболмірістатацетатом. 2. Вплив 250 нМ речовини на виділені нейтрофільні гранулоцити. 3. Вплив 500 нМ речовини. 4. Вплив 1 мкМ речовини

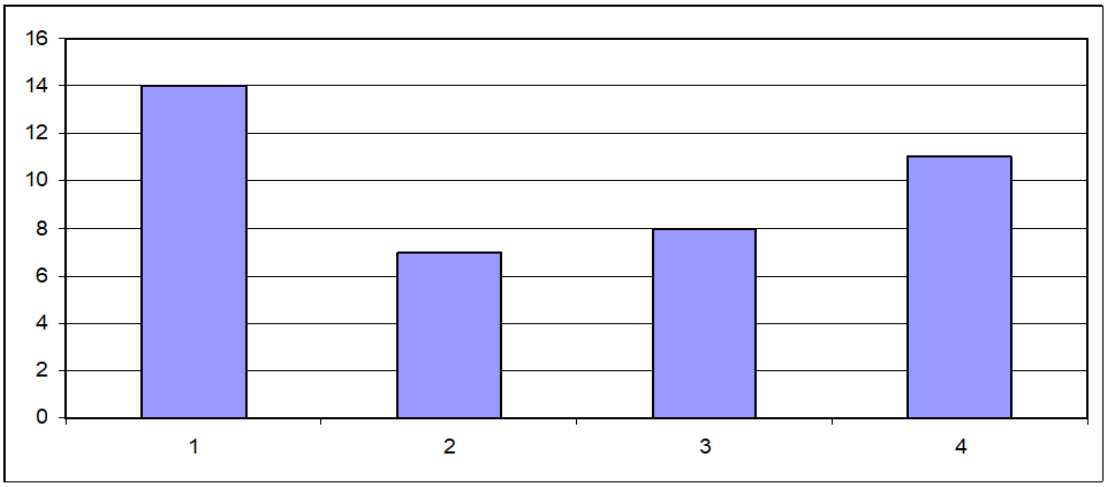
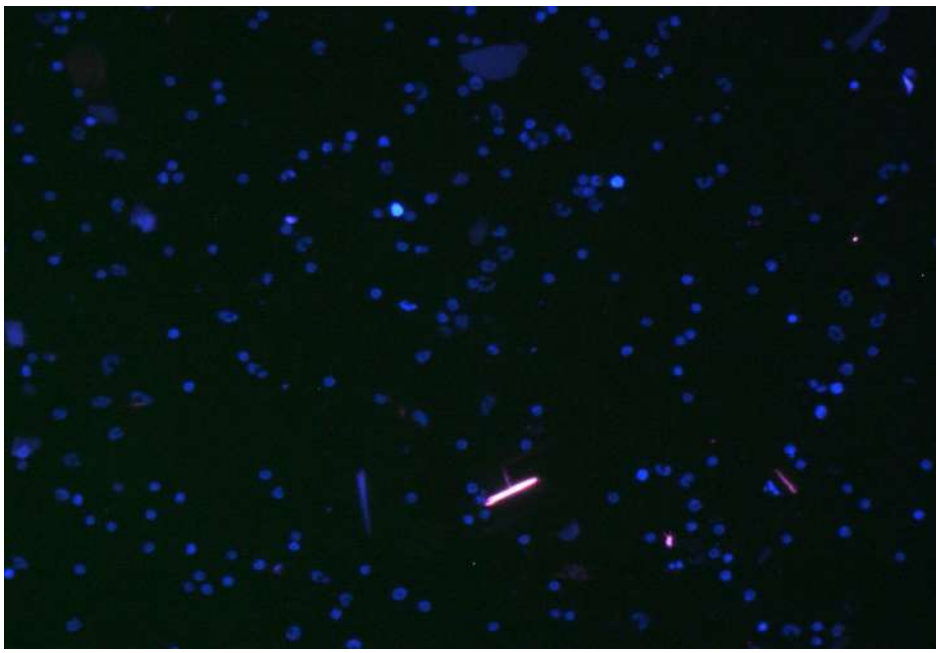
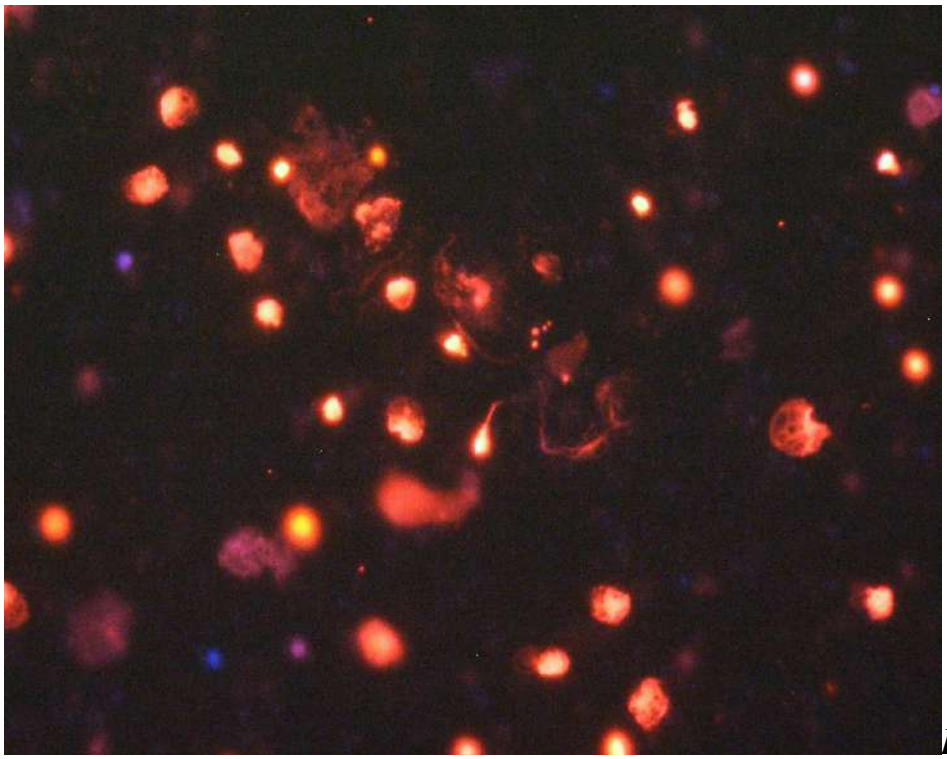


Рис. 6. Дозозалежність впливу речовини 963975 на ефективність формування NETs.

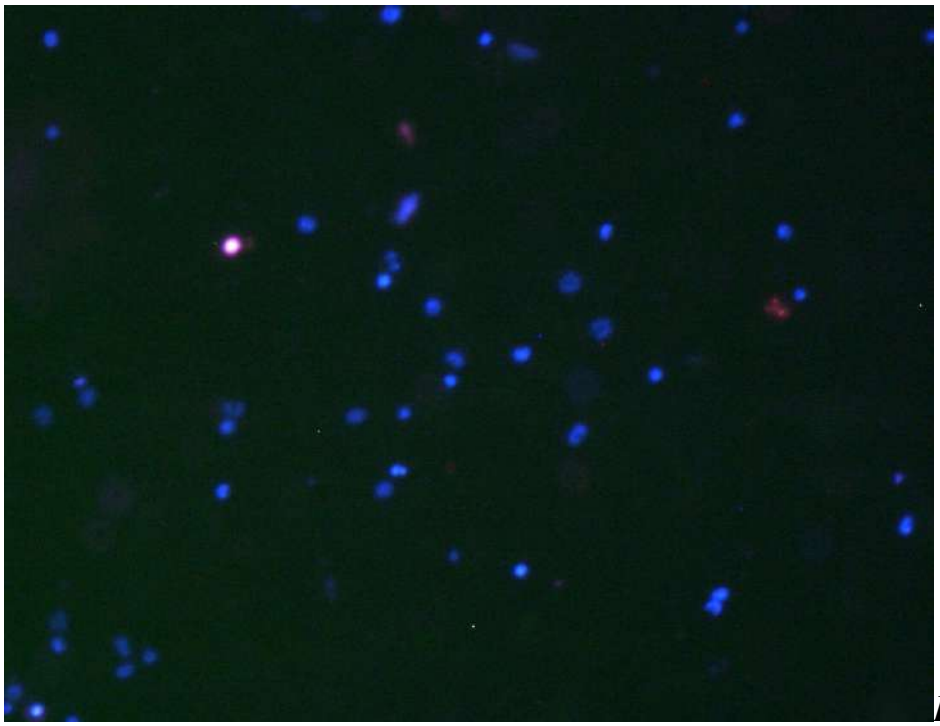
1. Відсоток НЕТозу, індукований форболмірістатацетатом. 2. вплив 250 нМ речовини на виділені нейтрофільні гранулоцити. 3. Вплив 500 нМ речовини. 4. Вплив 1 мкМ речовини



А



Б



B

Рис. 7. Оригінальні фотографії нейтрофілів А. Інтактні нейтрофіли. Б. Стимульований НЕТоз (РМА в концентрації 20 нМ). В. Речовина 790668 на фоні стимульованого НЕТозу.

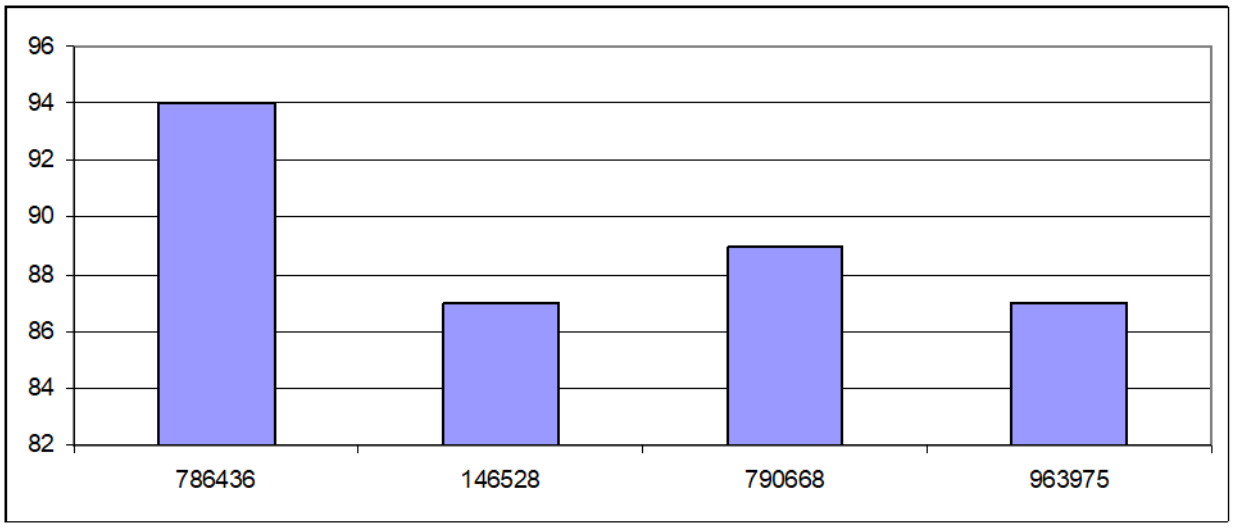


Рис. 8. Відсоток пригнічення активності НЕТозу порівняно з контрольними ізольованими нейтрофілами кроля за умов впливу вищезазначених речовин.

Отримані дані в дослідженні показують наявність поряд з ефектом пригнічення утворення пасток ще і дозозалежність даного ефекту у досліджуваних речовин.

3.3 Визначення ефективності і дозозалежності низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PCKβ) in vitro методом ферментного імуносорбентного аналізу.

Для визначення активності протеїнкінази Cβ при дії інгібіторів використовували протеїнкіназу Protein Kinase C, beta (PRKCB) (AA 342-600) protein (His tag,S tag). В лунки її наносили у кількості 150 нг. Для підбору оптимальної кількості PRKCB спочатку будували калібрувальну криву. Для побудови калібрувальної кривої використовували такі кількості ферменту: 37,5 нг, 75нг, 150 нг, 300 нг (Рис.9)

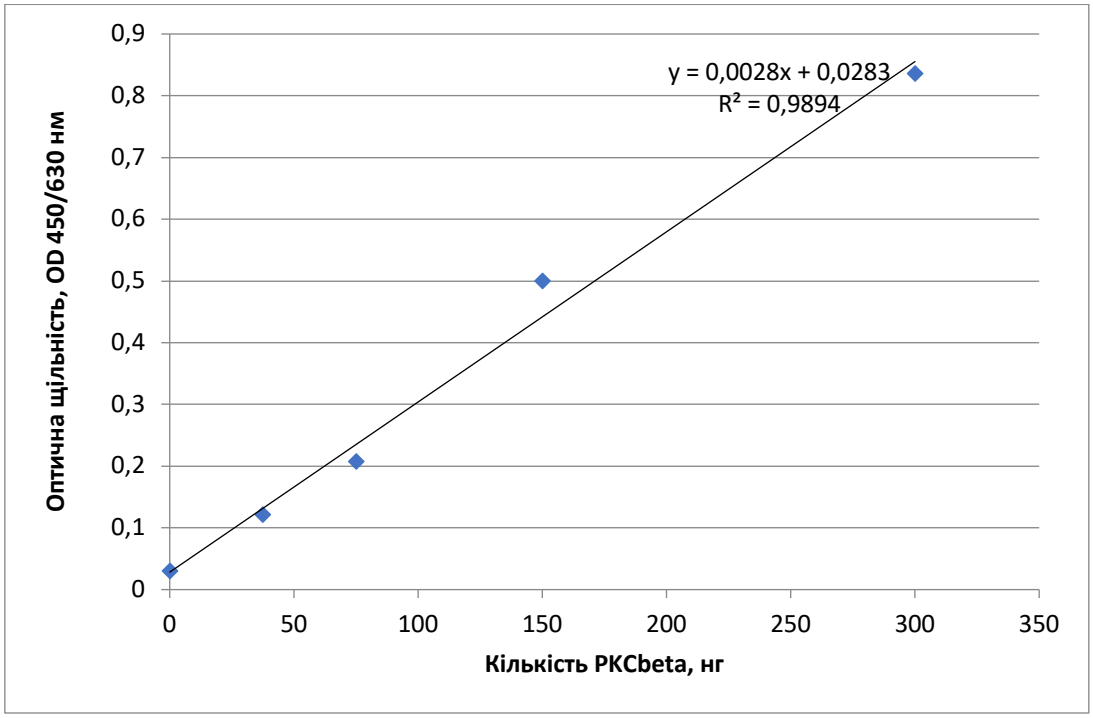


Рис. 9. Калібрувальна крива для ферменту Protein Kinase C, beta (PRKCB) (AA 342-600) protein (His tag,S tag).

Наступним етапом було дослідження дозозалежної здатності речовин пригнічувати активність PCKß. Інгібітори спочатку розводили у ДМСО до концентрації 100мкМ. А потім вносили у лунки у кількості 1 мкМ, 0,5 мкМ, 0,25

мкМ, 0,1 мкМ та інкубували з чистим ферментом (150 нг) протягом 10 хв при 37^0C

При проведенні обрахунків, оптичну щільність лунок з інтактним ферментом в дозі 150 нг усереднювали та приймали за 1, ефективність дії речовин виражали у відсотках від інтактного ферменту. Дані по дозозалежному впливу речовин приведені у Таблиці 2.

Таблиця 2. Ефективность та дозозалежность низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PCKß) in vitro методом ферментного імуносорбентного аналізу.

		1 мкМ, %	0,5 мкМ, %	0,25 мкМ, %	0,1 мкМ, %
1	**272030**	61,383285	58,5014409	52,7377522	22,3768116
2	**826209**	75,792507	72,6224784	47,5504323	53,7288136
3	**412247**	86,455331	81,556196	46,3976945	43,3898305
4	**786436**	89,913545	91,9308357	72,0461095	71,0169492
5	**786437**	70,605187	71,1815562	60,518732	28,5797101
6	**786440**	92,507205	78,962536	55,0432277	42,5423729
7	**146528**	86,455331	83,573487	70,3170029	53,0508475
8	**146555**	88,472622	82,9971182	64,5533141	48,9830508
9	**826603**	76,657061	61,0951009	42,6512968	43,8983051
10	**826611**	79,538905	72,9106628	48,1268012	24,9855072
11	**826627**	79,827089	61,9596542	56,4841499	52,8813559
12	**790668**	88,472622	74,6397695	66,2824207	31,3623188
13	**790669**	72,910663	74,0634006	27,9538905	39,826087
14	**790673**	83,285303	78,3861671	61,9596542	27,2463768
15	**790714**	78,674352	72,0461095	65,7060519	31,6521739
16	**271831**	75,216138	64,8414986	63,9769452	59,8305085
17	**271832**	75,792507	77,2334294	62,2478386	33,1594203
18	**271832**	87,896254	81,2680115	73,4870317	45,4237288
19	**963842**	75,216138	64,8414986	63,9769452	43,7288136
20	**963861**	80,979827	80,9798271	47,5504323	43,8983051
21	**963863**	74,351585	89,0489914	37,4639769	61,5254237
22	**271871**	71,757925	65,4178674	35,1585014	29,7391304
23	**271872**	79,538905	51,8731988	49,5677233	57,2881356
24	**963893**	81,556196	81,556196	47,8386167	ND
25	**274901**	63,400576	63,1123919	63,1123919	38,0289855
26	**963924**	75,216138	75,7925072	54,4668588	40,3389831
27	**271924**	86,167147	91,3544669	83,573487	69,8305085

28	**274927**	68,011527	73,7752161	52,1613833	27,1304348
29	**963975**	81,84438	76,6570605	63,9769452	47,4202899
30	**826611**	77,809798	48,9913545	42,074928	ND
31	**790669**	81,556196	68,8760807	63,1123919	ND

Виходячи з отриманих результатів можна стверджувати, що серед досліджуваних речовин найбільшою мірою проявляє свою здатність до пригнічення протеїнкінази С β речовини 146528, 786436, 963975 та 790668 про що свідчить зниження відсотку нейтрофільних пасток за умов її застосування порівняно зі стимульованими PMA клітинами. Таким чином, відібрані перспективні речовини, які можуть застосовуватися в якості блокаторів NETosis за для попередження розвитку ARDS.

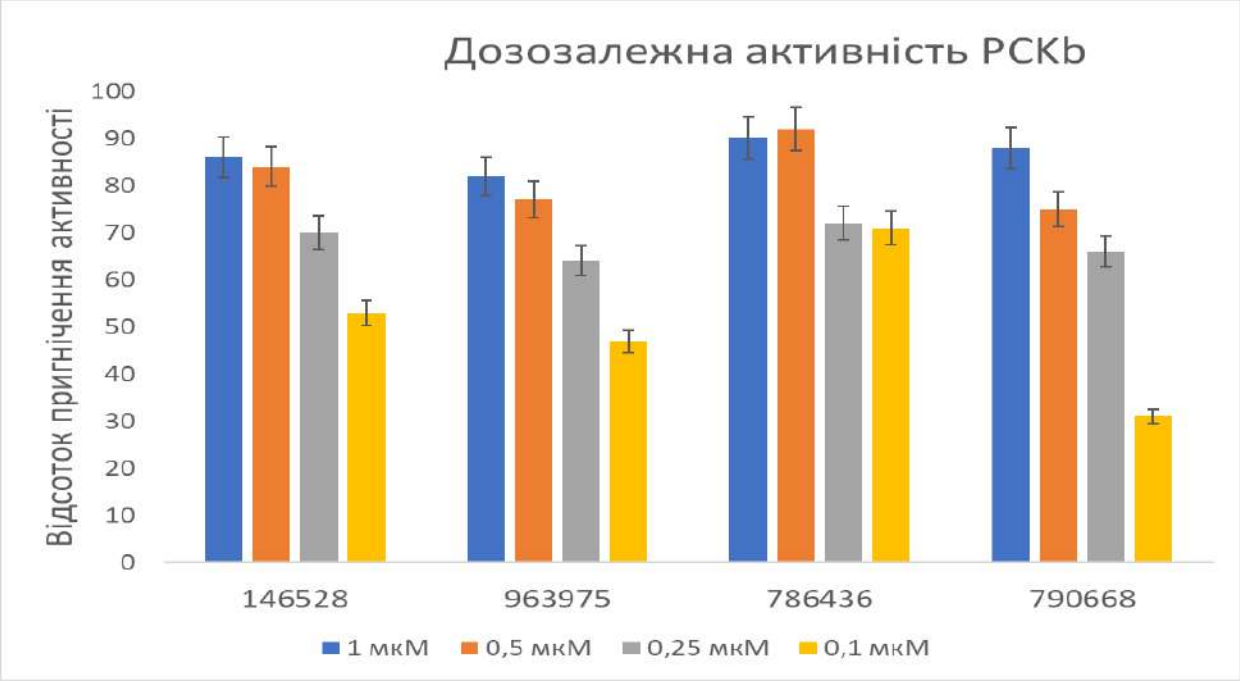


Рис.10. Ефективность та дозозалежность відібраних низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PCKß) in vitro методом ферментного імуносорбентного аналізу (Речовини 146528, 786436, 963975 та 790668).

3.4. Оцінка кардіотоксичності обраних блокаторів РСКβ на культурі неонатальних кардіоміоцитів щура

Наступною задачею була перевірка цитотоксичності відібраних 4-х речовин. Для оцінки цитотоксичності ми використовували методику впливу даних речовин на культуру неонатальних кардіоміоцитів щура у різних концентраціях. Дводенна культура піддавалася впливу речовин в різних концентраціях, і оцінювався рівень некрозу. Наступні чотири речовини показали відсутність вираженої токсичної дії в концентрації 5 мкМ, а значне зниження живих кардіоміоцитів визначалося при концентраціях від 40 мкМ, на яких речовина 790668 давала 100 % некрозу.

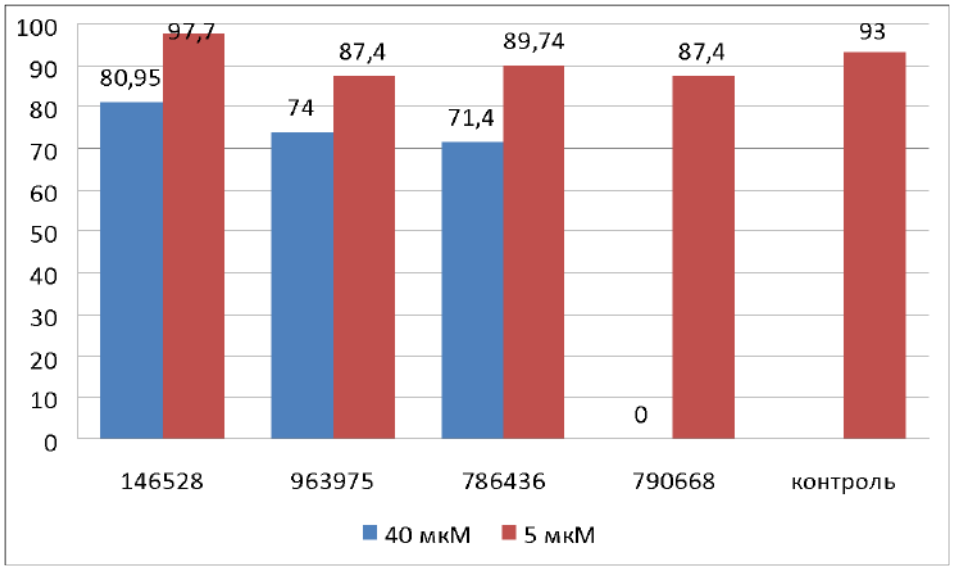
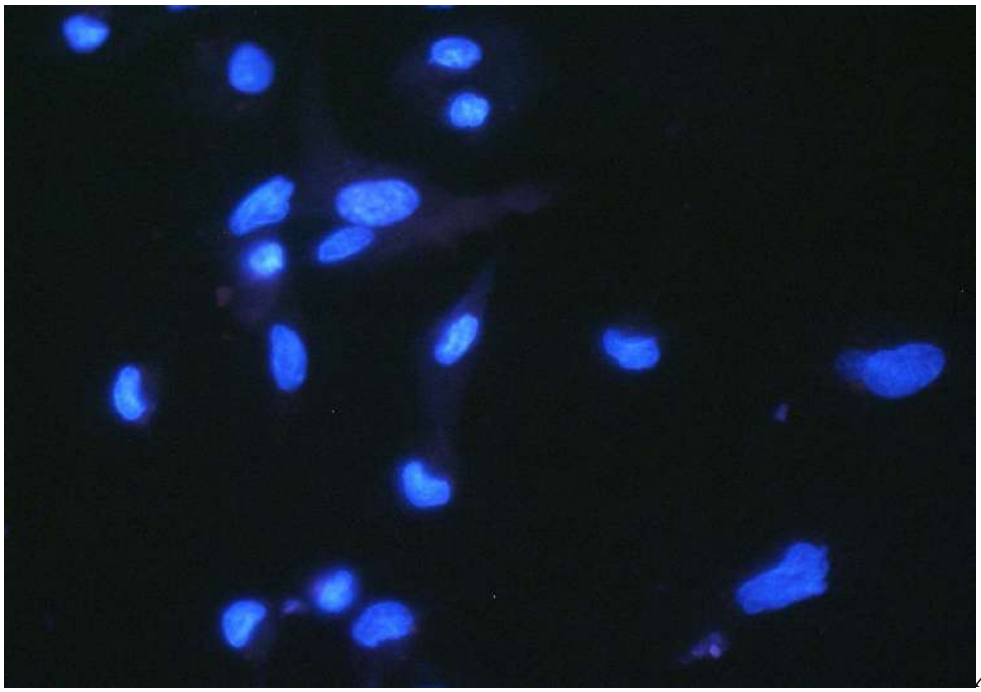
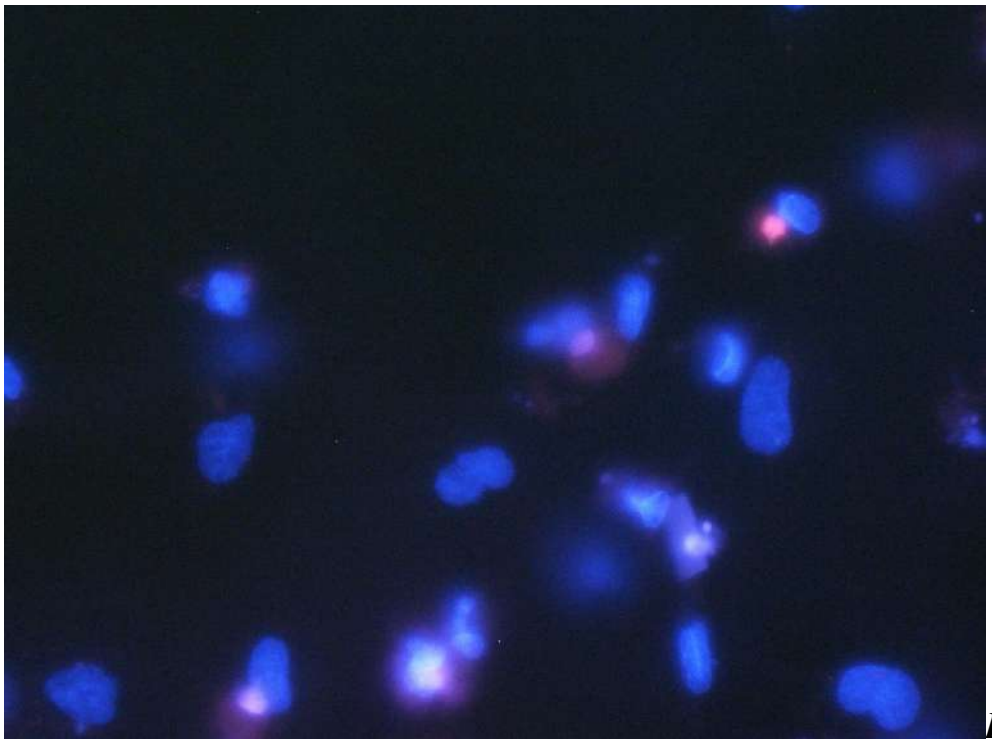


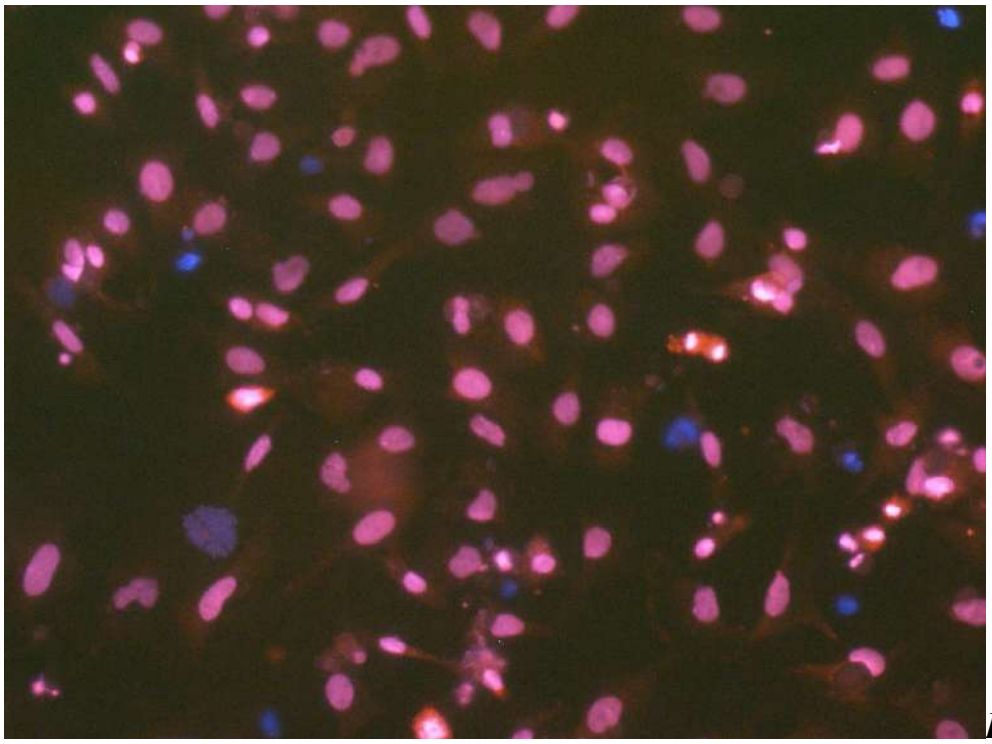
Рис.11. Рівень живих кардіоміоцитів в культурі за умов впливу речовин-інгібіторів РСКß.



А



Б



B

Рис. 12. Зміни в культурі кардіоміоцитів.

А. контроль, Б. Вплив речовини 146528 в концентрації 5 мкМ, В. Вплив речовини 790668 в концентрації 40мікромоль. Подвійне забарвлення Hoechst – PI.

Другим методом, за допомогою якого визначали кардіотоксичність відібраних речовин – МТТ тест. За результатами його проведення найбільш безпечними виявилися речовини 146528 та 963975. В концентрації 1мкМ (тій, яку ми плануємо використовувати в дослідженнях *in vivo*) вони не викликали загибель неонатальних кардіоміцитів в культурі. Дані представлені на рисунку 13.

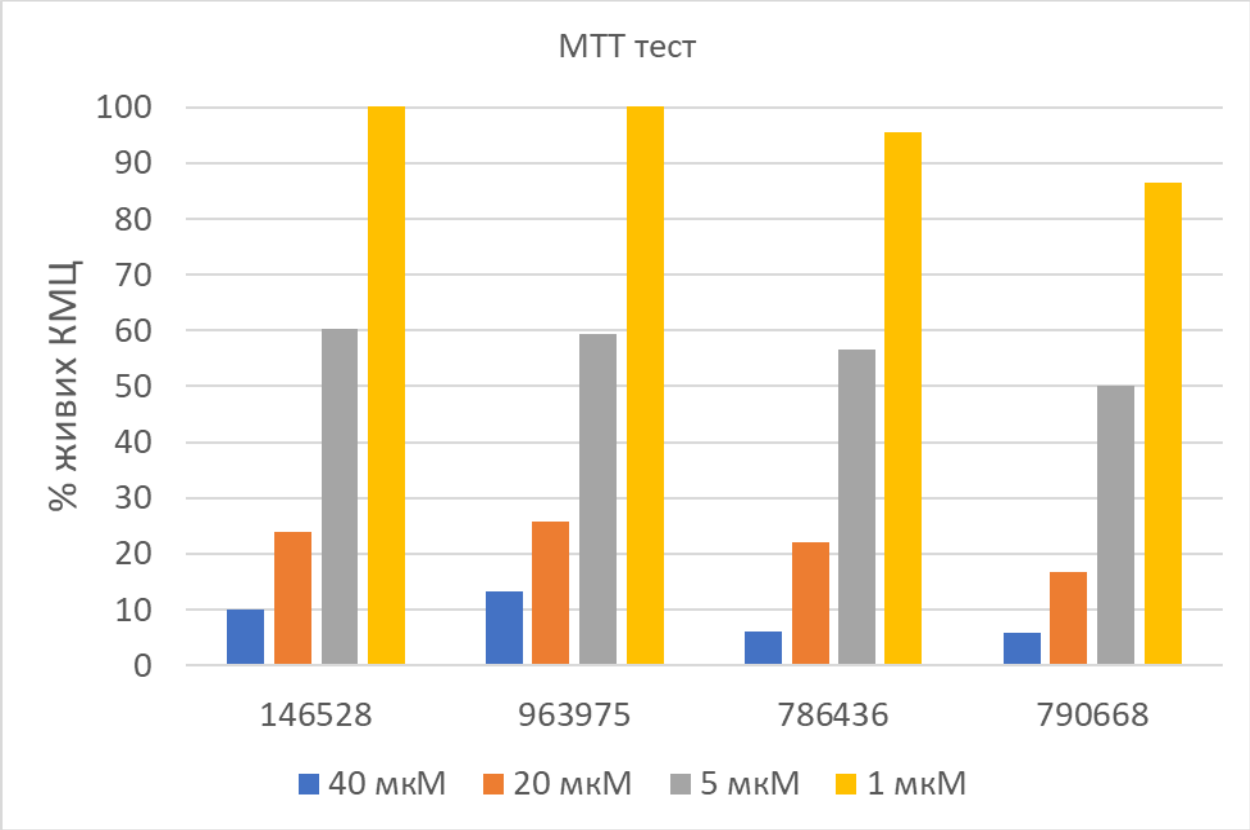


Рис.13. Дані MTT тесту для 4-х відібраних речовин.

3.5. Оцінка набряку легень

Наступним етапом проєкту було дослідження впливу відібраних речовин (146528 та 963975) на попередження розвитку запалення при моделюванні гострого респіраторного дистрес синдрому у старих щурів лінії SHR. Першою методикою, яку ми використовували, була оцінка набряку легень.

Співвідношення ваги легкого і сухого розраховували як відношення вологої ваги до сухої ваги. Таким чином оцінювали ступінь набряку легень, чим більше цей показник, тим більше набряк. Цей коефіцієнт дорівнював 4,32 в контрольній групі та 8,66 у середньому у групі щурів з ГРДС.

Використання блокаторів активності PCKß номер 146528 та 786436 призводило до зменшення набряку легень на 43% та на 34% відповідно. Таким чином використання речовини 146528 призводило до найбільш вираженого зменшення набряку легень у щурів з моделюванням ГРДС.

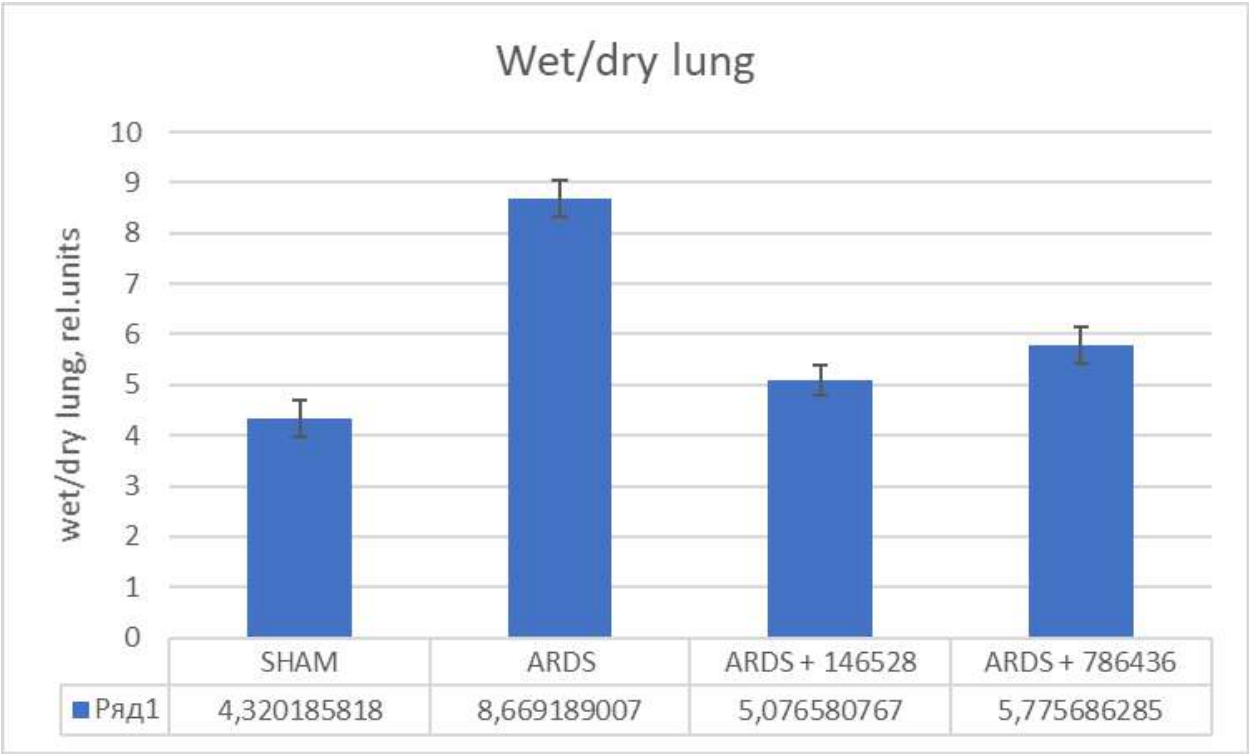


Рис. 14. Оцінка набряку легень – співвідношення wet/dry, у відносних одиницях.

3.6. Оцінка вмісту загального білку у бронхолегеневому лаважі

Даний показник говорить про ступінь проникності легеневих капілярів та аерогематичного бар'єру в цілому – білок фільтрується в просвіт альвеол, чим більше він, тим більше проникність капілярів.

Вміст загального білку у бронхолегеневому лаважі дорівнював 3,015 мг/мл у контрольній групі та збільшувався у 4,14 разів у групі щурів з ARDS (12,483 мг/мл). Використання речовини 146528 зменшило вміст загального білку у 6,6 разів, а речовини 786436 - у 3,6 разів порівняно з групою щурів, яку не лікували (ГРДС) Таким чином використання інгібіторів PCKß призводило до вираженого зменшення ендотеліальної та епітеліальної проникності у щурів з моделюванням ГРДС.

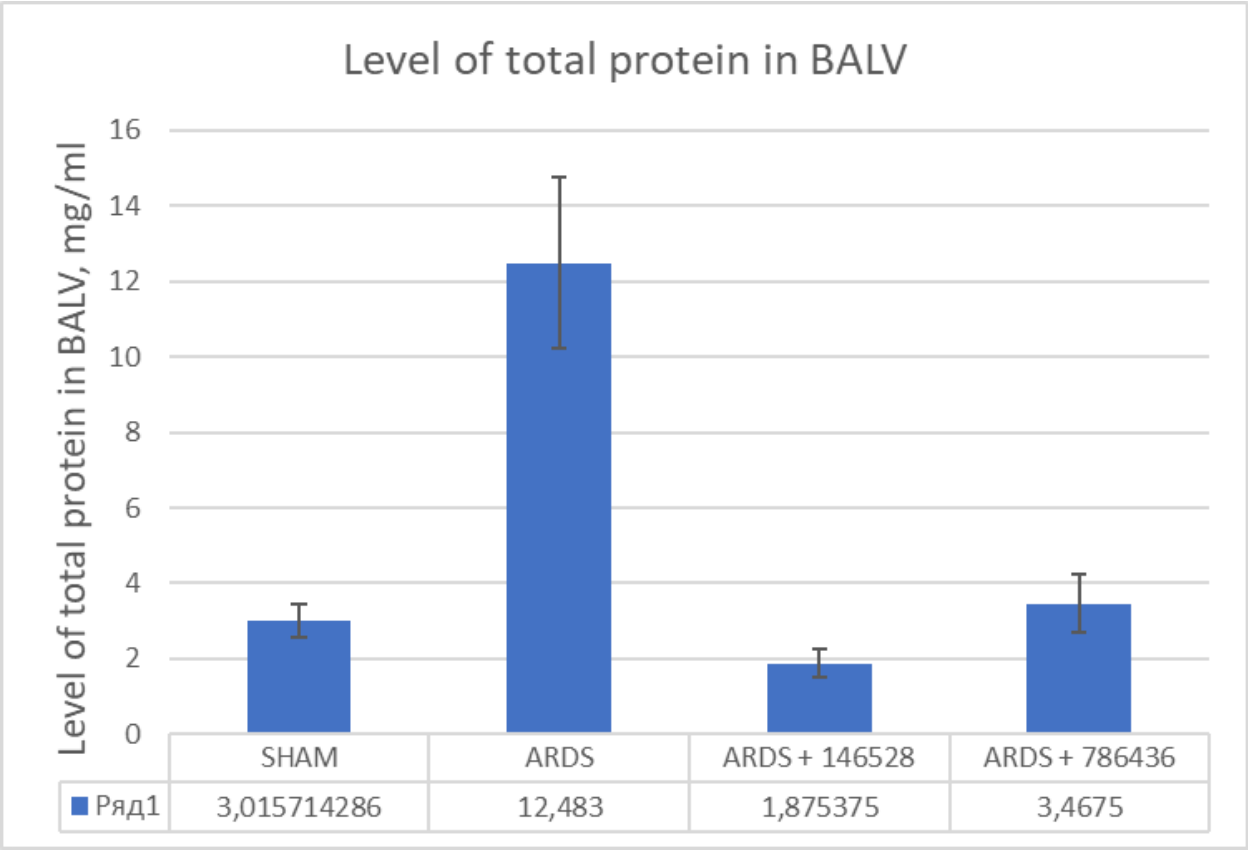


Рис. 15. Вміст загального білку у бронхолегеневому лаважі щурів.

3.7. Оцінка вмісту вільної ДНК у БАЛ та плазмі крові щурів

Вміст вільної ДНК як у бронхолегеневому лаважі, так і у плазмі крові є маркером формування нейтрофільних позаклітинних пасток. На рисунку 16 представлена калібрувальна крива для Пікогріну.

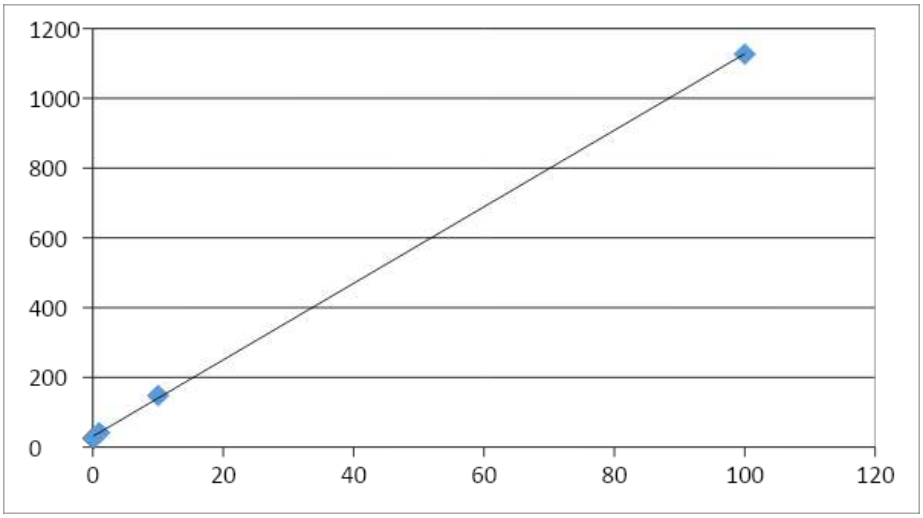


Рис. 16. Калібрувальна крива

Вміст позаклітинної ДНК у бронхолегеневому лаважі щурів із моделюванням ARDS був у 2,46 разів вищім, ніж у щурів групи SHAM (рис.17). У щурів 3-ї групи, яких лікували речовиною 146528 рівень позаклітинної ДНК суттєво не змінювався, а от у щурів 4-ї групи (ARDS + речовина 963975) рівень позаклітинної речовини знизився у 2 рази, порівняно із щурами групи ARDS. А у плазмі крові щурів з ARDS вміст вільної ДНК був на 45% вище порівняно з контролем (рис.18). Використання речовини 146528 та 963975 знижу вміст позаклітинної ДНК на 18% та 23,5% відповідно в порівнянні із щурами, яких не лікували (група 2).

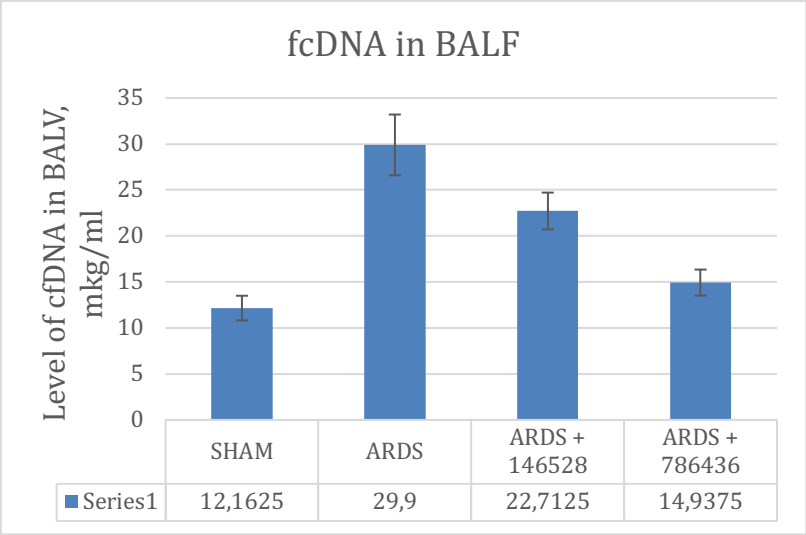


Рис. 17. Вміст позаклітинної ДНК у бронхолегеневому лаважі

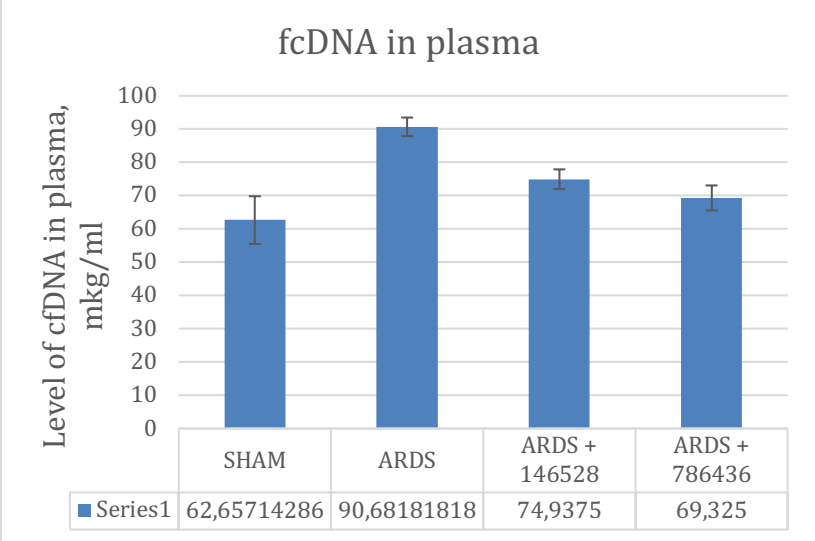


Рис. 18. Вміст позаклітинної ДНК у плазмі крові щурів

3.8. Визначення рівнів спонтанного та індукованого NETозу за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії у щурів з ГРДС.

Визначення рівнів формування нейтрофільних позаклітинних пасток проводили шляхом подвійного забарвлення барвниками Hoechst та пропідіум йодидом. Було показано, що у щурів групи ARDS рівень спонтанного NETsis був у 2,7 разів вищим порівняно із щурами групи SHAM – 8,3 % проти 2,95 % (рис. 19 та 20).

Встановлено, що у щурів групи ARDS рівень індукованого PMA утворення нейтрофільних позаклітинних пасток був у 2 рази вищим порівняно із щурами групи SHAM – 26,7 % проти 13,5 % (рис. 21 та 22).

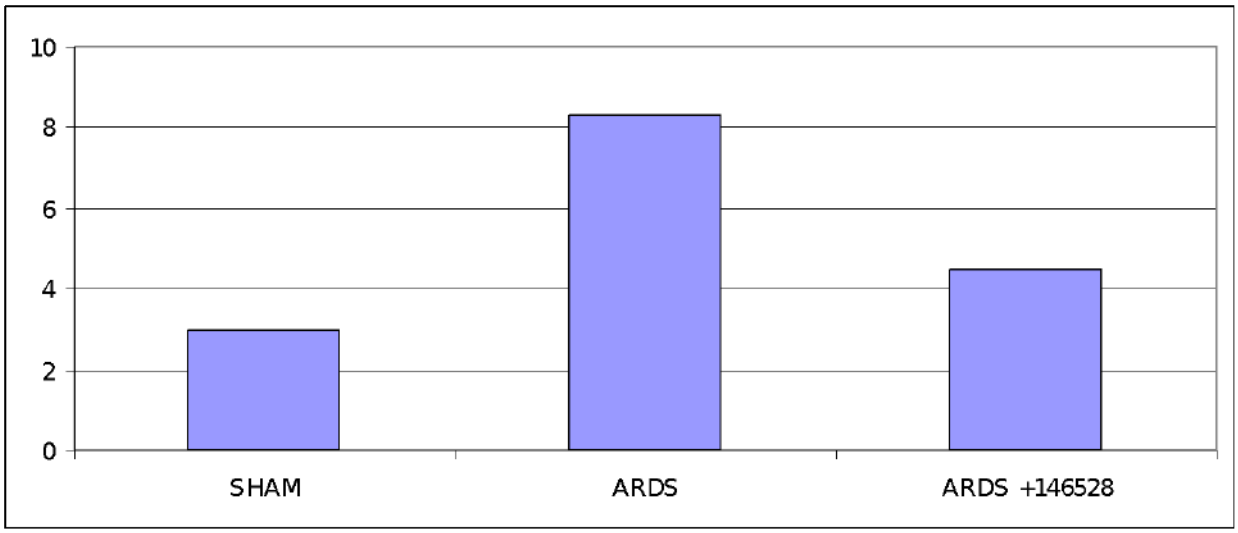


Рис. 19. Зміни (в відсотках) кількості НЕТозу у нейтрофілах, виділених з удавано-оперованих щурів (SHAM), щурів з моделюванням гострого респіраторного дистрес синдрому, та щурів, що паралельно з моделюванням отримували речовину 146528

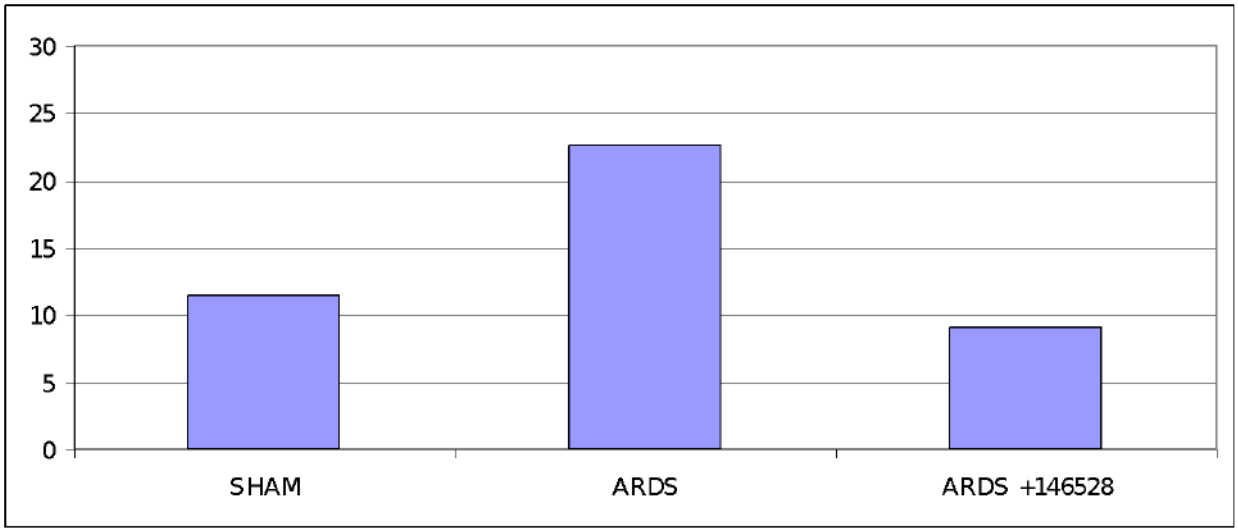


Рис. 20. Зміни (в відсотках) кількості НЕТозу у нейтрофілах, виділених з удавано-оперованих щурів (SHAM), щурів з моделюванням гострого респіраторного дистрес синдрому, та щурів, що паралельно з моделюванням отримували речовину 146528 за умов активації PMA

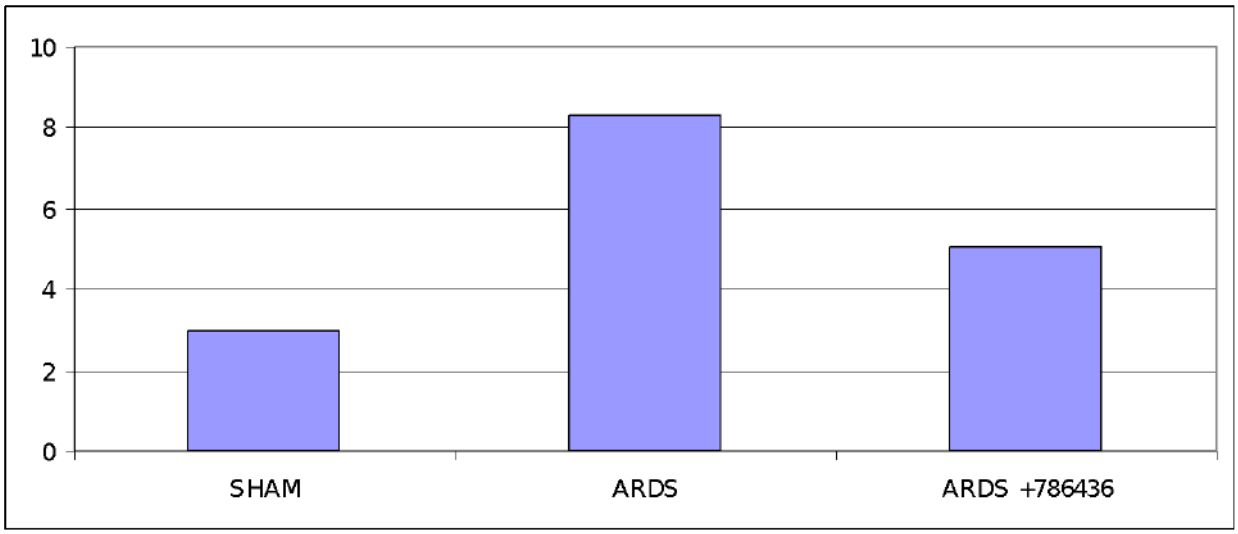


Рис. 21. Зміни (в відсотках) кількості НЕТозу у нейтрофілах, виділених з удавано-оперованих щурів (SHAM), щурів з моделюванням гострого респіраторного дистрес синдрому, та щурів, що паралельно з моделюванням отримували речовину 146528.

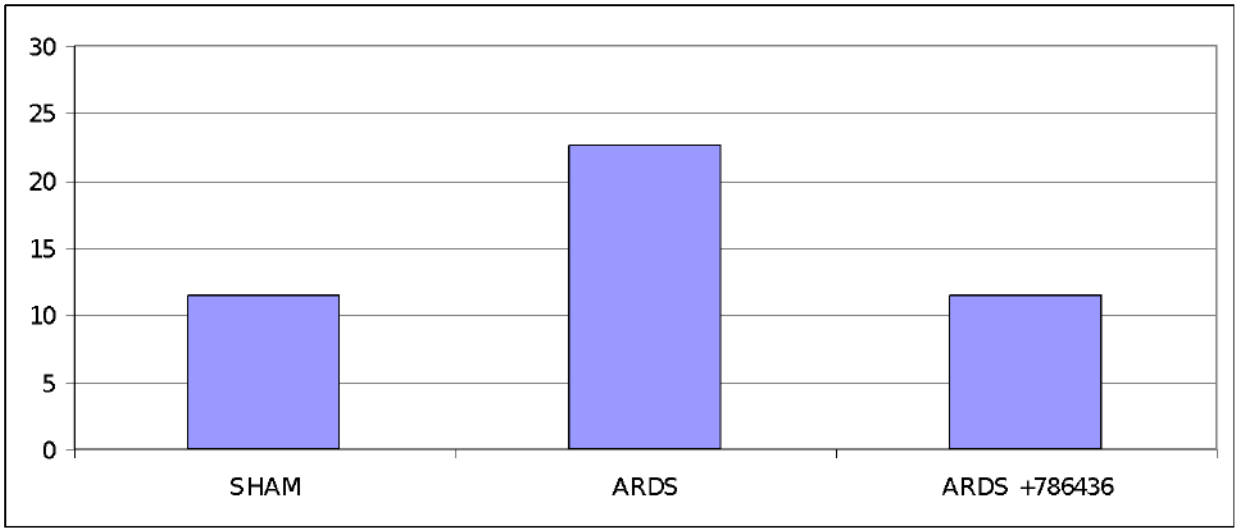
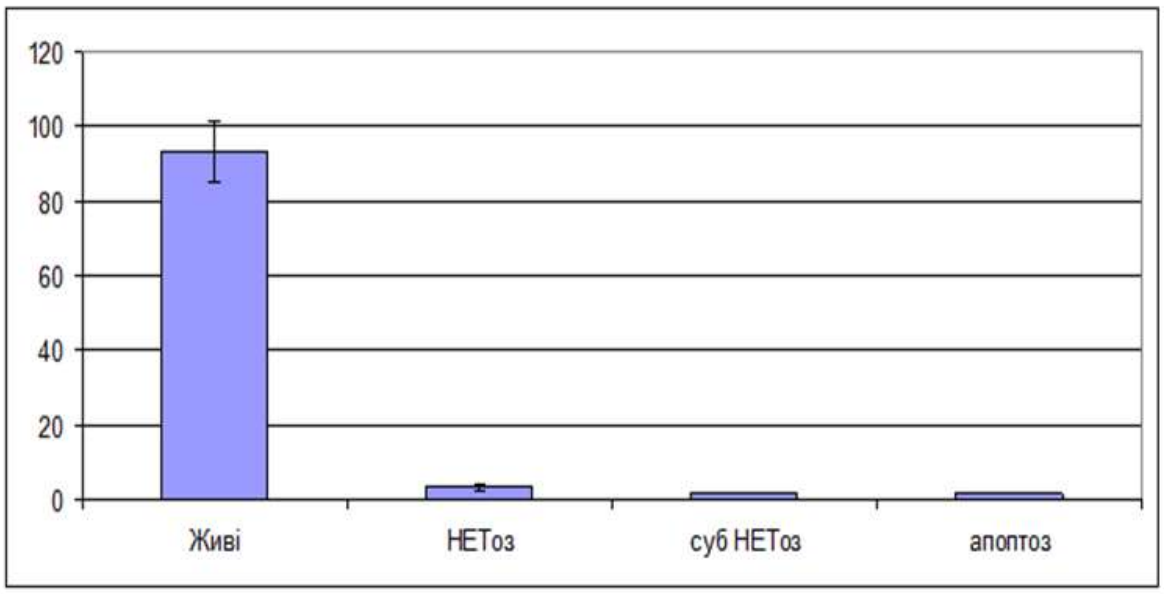
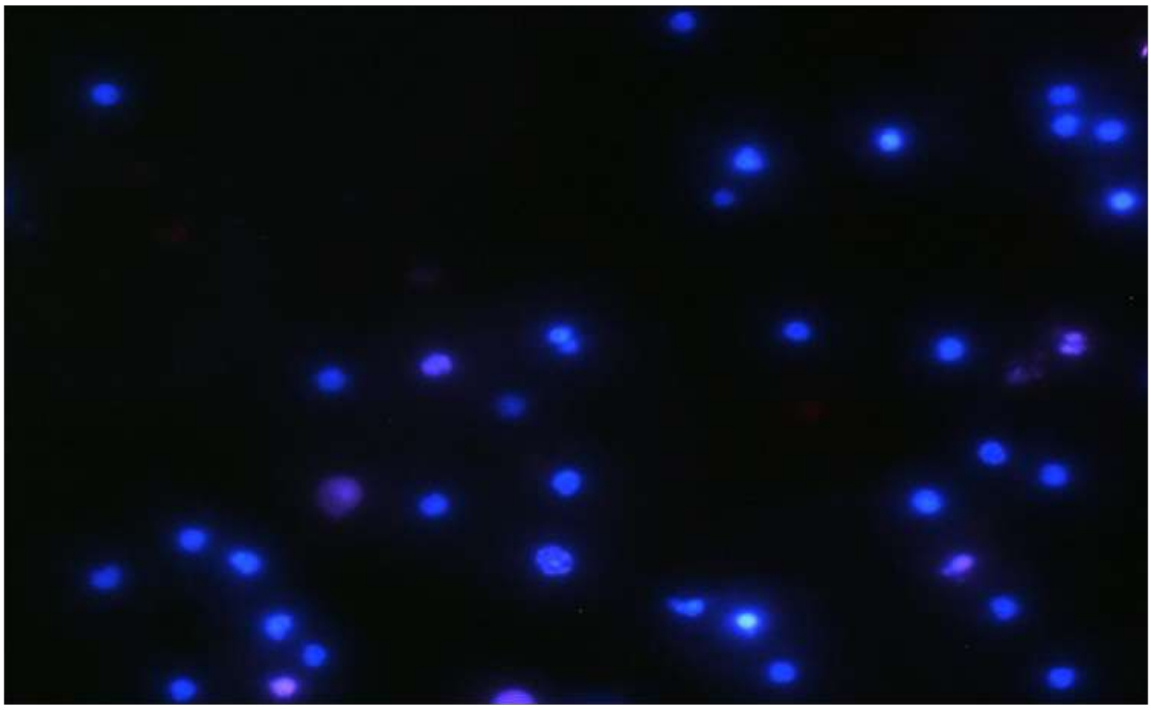


Рис. 22. Зміни (в відсотках) кількості НЕТозу у нейтрофілах, виділених з удавано-оперованих щурів (SHAM), щурів з моделюванням гострого респіраторного дистрес синдрому, та щурів, що паралельно з моделюванням отримували речовину 146528 за умов активації PMA.



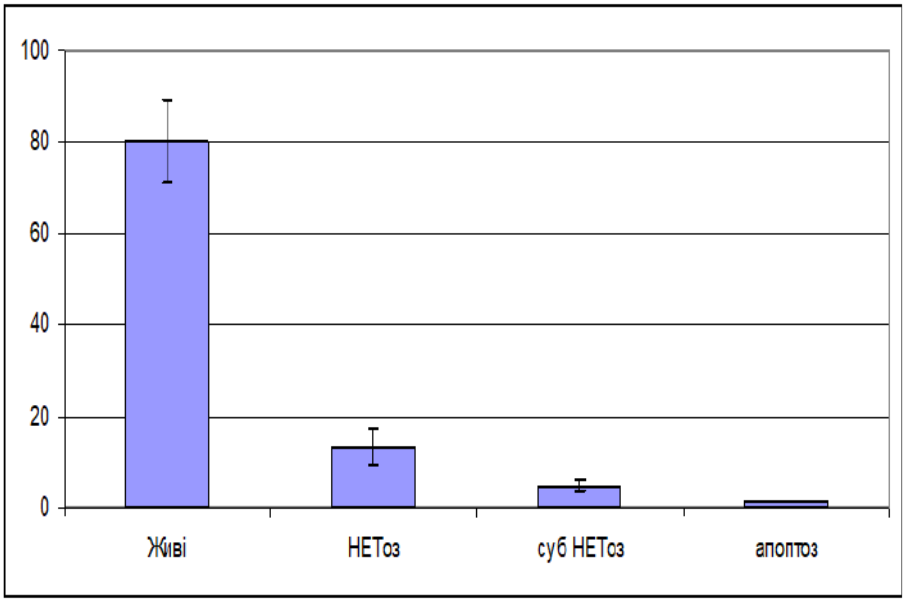
A



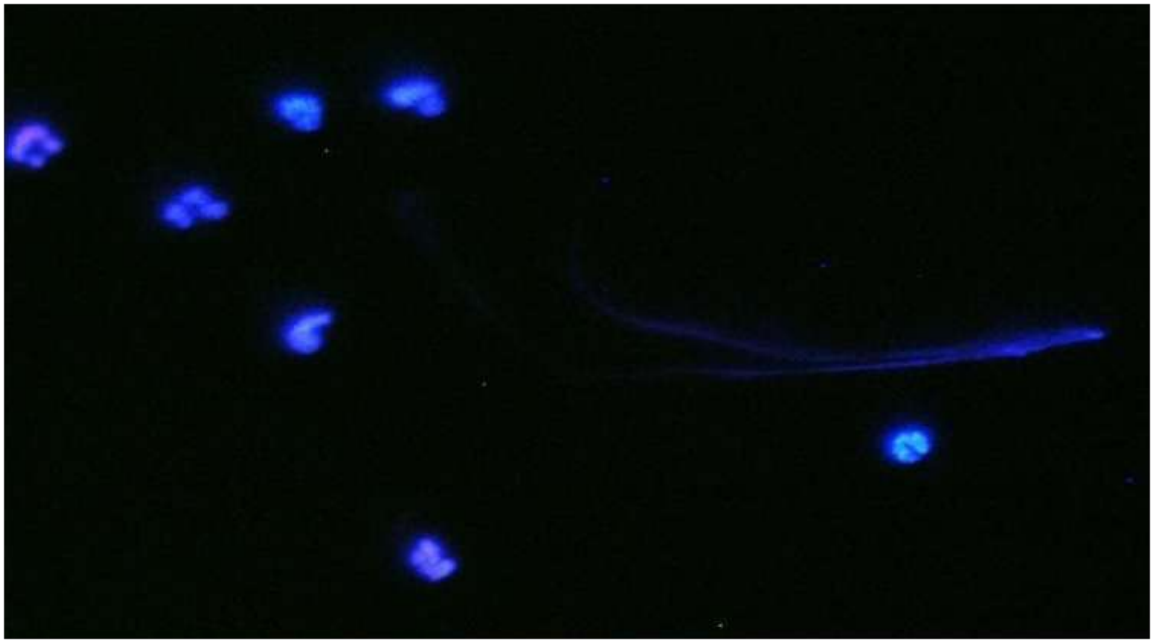
Б

Рис. 23. А) Відсоткове співвідношення нейтрофілів без ознак пасток (Live), з проявами пасток (NETs) та з появами апоптозу (apoptosis), виділених з крові контрольних щурів (група SHAM).

Б) Нейтрофільні гранулоцити, виділені з крові щурів та інкубовані протягом 3х годин в середовищі RPMI (х40, подвійне забарвлення Hoechst - PI)



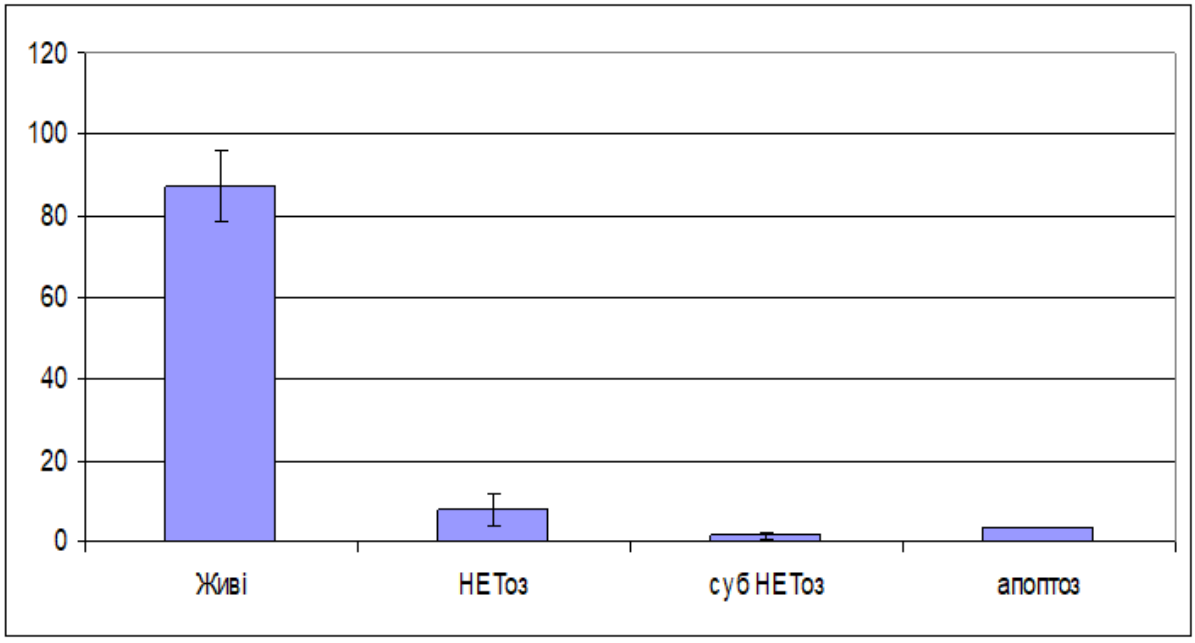
А



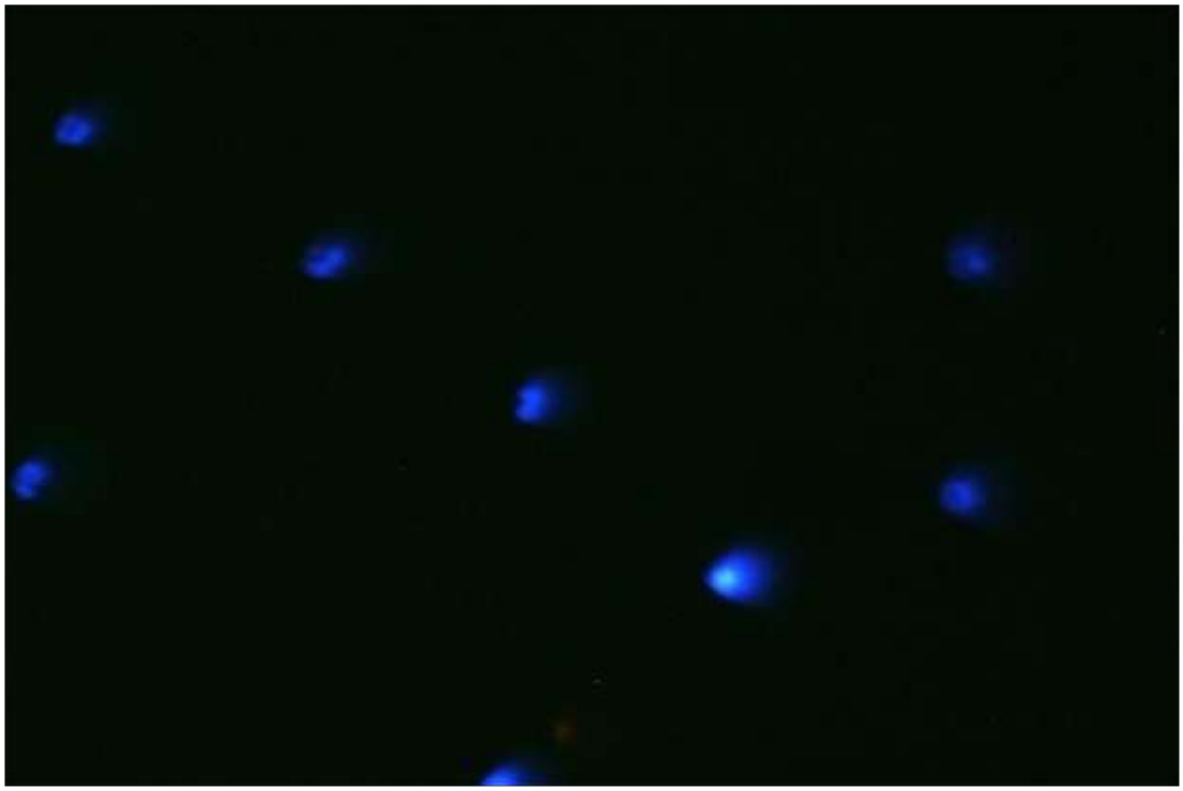
Б

Рис. 24. А) Відсоткове співвідношення нейтрофілів без ознак пасток (Live), з проявами пасток (NETs) та з проявами апоптозу (apoptosis) виділених з крові контрольних щурів (група SHAM) та стимульованих PMA.

Б) Нейтрофільні гранулоцити, інкубовані протягом 3х годин в середовищі RPMI та PMA (х20, подвійне забарвлення Hoechst - PI).



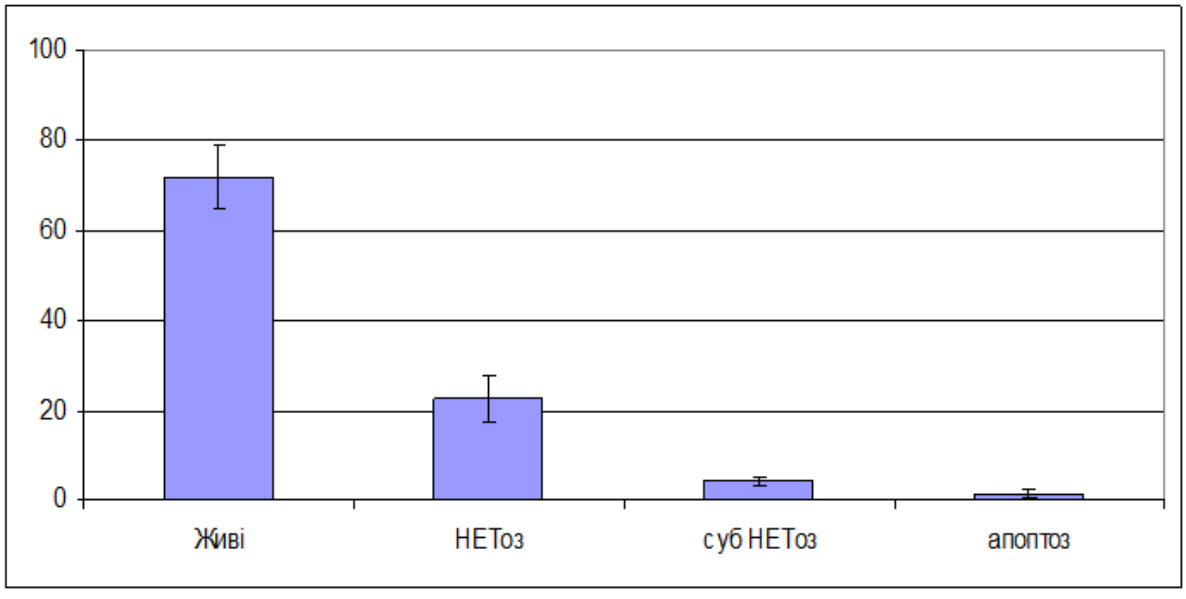
А



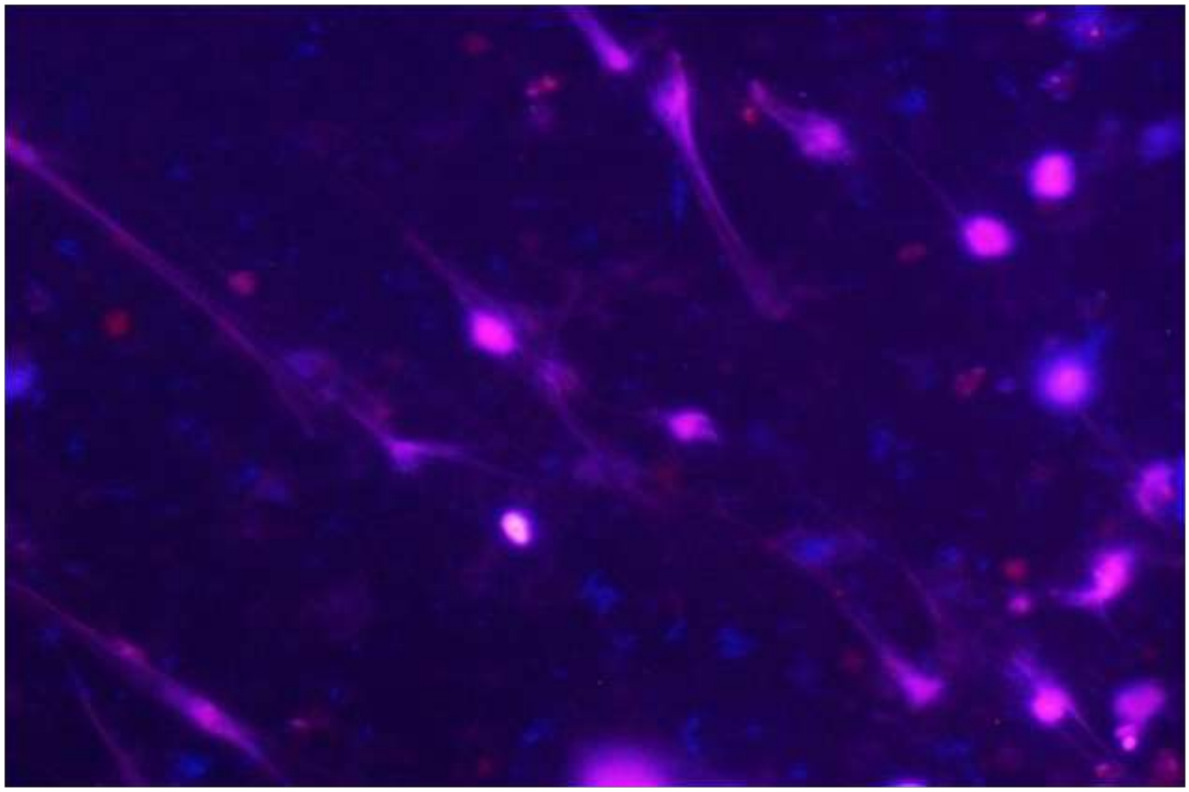
Б

Рис. 24. А) Відсоткове співвідношення нейтрофілів без ознак пасток (Live), з проявами пасток (NETs) та з появами апоптозу (apoptosis) виділених з крові щурів з моделюванням ARDS.

Б) Нейтрофільні гранулоцити, виділені з крові щурів з моделюванням ARDS та інкубовані протягом 3х годин в середовищі RPMI (х20, подвійне забарвлення Hoechst - PI).



А



Б

Рис. 25. А) Відсоткове співвідношення нейтрофілів без ознак пасток (Live), з проявами пасток (NETs) та з появами апоптозу (apoptosis) виділених з крові щурів з моделюванням ARDS після впливу PMA. Б) Нейтрофільні гранулоцити, виділені з крові щурів з моделюванням ARDS та інкубовані протягом 3х годин в середовищі RPMI та активатором NETозу PMA (х20, подвійне забарвлення Hoechst - PI).

3.9. Оцінка вмісту цитокінів у плазмі крові щурів.

Визначення кількості цитокінів у плазмі крові щурів проводили методом ELISE. Дані представлені у вигляді Mean±SEM, розмірні одиниці pg/ml.

У щурів із моделюванням ГРДС рівень IL-1β збільшився у 7 разів, порівняно з групою SHAM. Використання інгібіторів PCKß (146528 та 963975) у щурів з ГРДС зменшила рівень IL-1β у 5,4 та у 3 рази, порівняно з не лікованими тваринами (рис. 26).

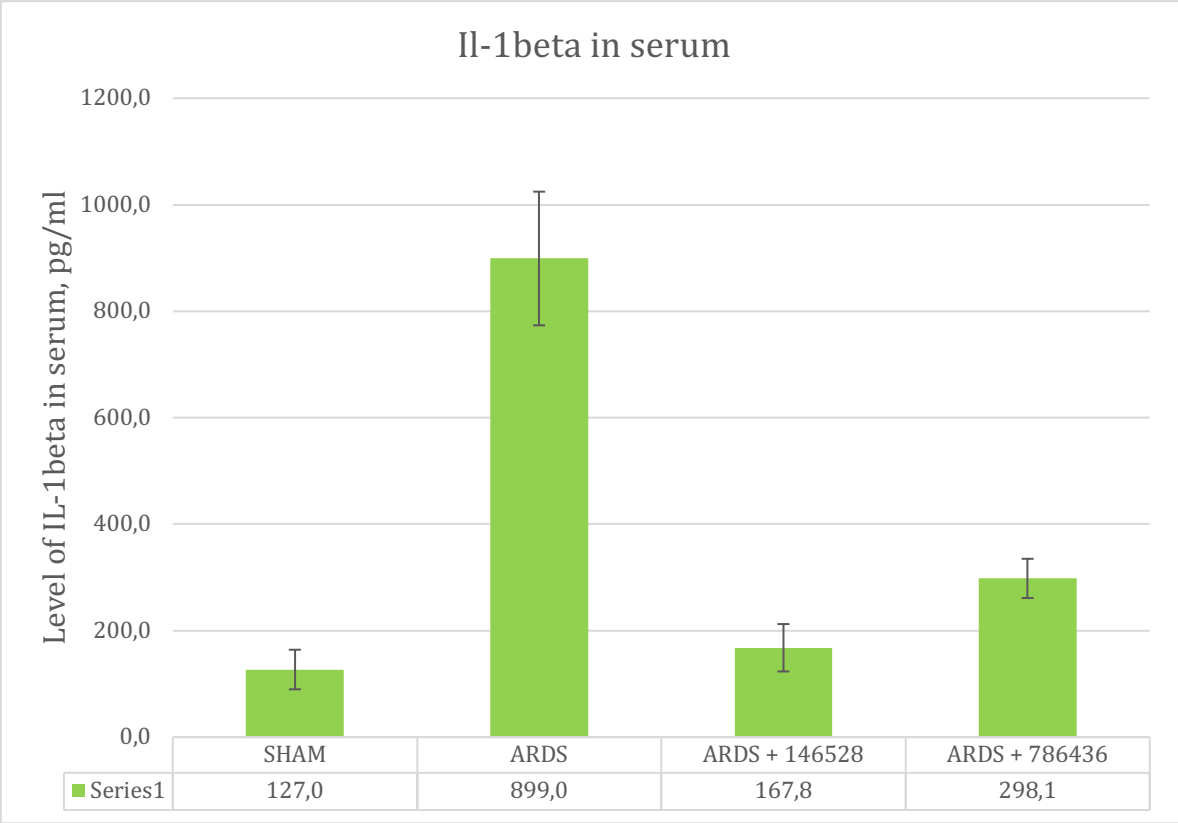


Рис. 26. Вміст IL-1beta у плазмі крові щурів.

У щурів із моделюванням ГРДС рівень інтерлейкіну 6 збільшився у 13 разів, порівняно з групою SHAM. Використання інгібіторів PCKß (146528 та 963975) у щурів з ГРДС достовірно зменшила рівень IL-6 у 6,1 та у 5,8 рази, порівняно з тваринами групи ГРДС (рис. 27).

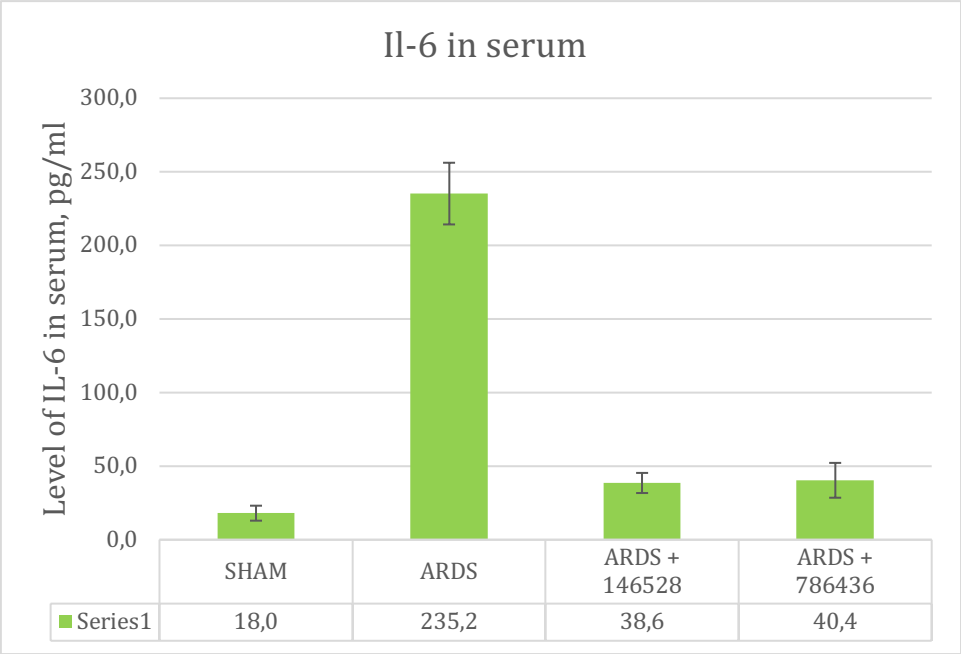


Рис. 27. Вміст IL-6 у плазмі крові щурів.

Рівень ще одного прозапального цитокіну, TNFα, також підвищувався при моделювання гострого респіраторного дистрес синдрому у щурів – 7 разів, порівняно з групою SHAM. Його кількість при ГРДС складає 172,3 пг/мл плазми крові щурів. Використання інгібіторів PCKß (146528 та 963975) у щурів з ГРДС достовірно зменшила рівень TNFα у 3,3 та у 5,3 рази, порівняно з тваринами групи ГРДС (рис.28).

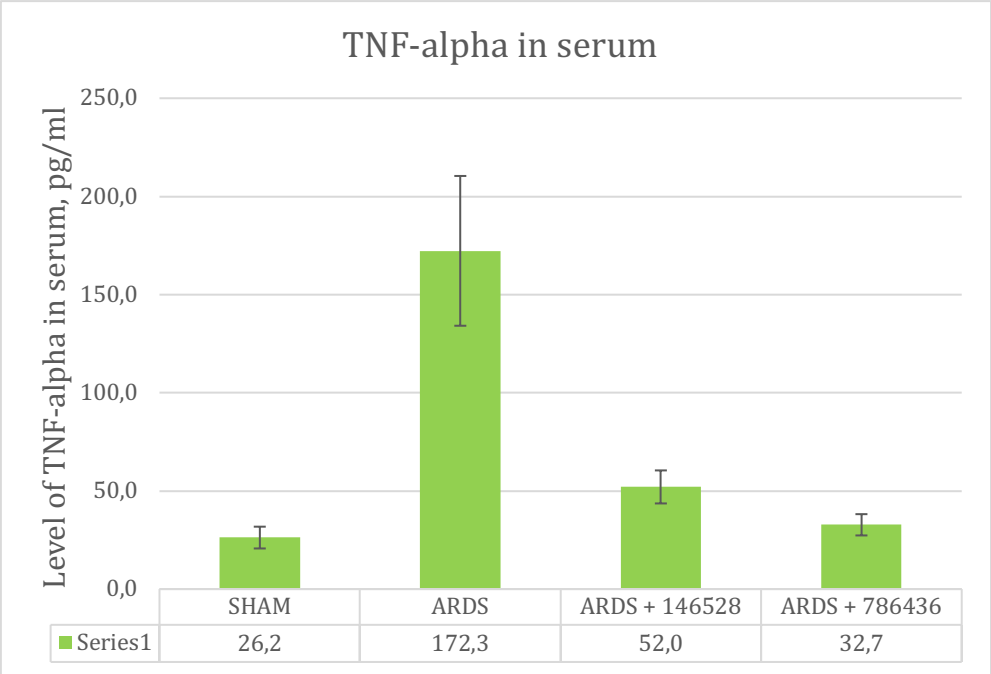


Рис. 28. Вміст TNFalpha у плазмі крові щурів.

Таким чином, було показано, що обидві відібрані для лікування інгібітори РСКß призводять до зменшення інтенсивності системної запальної відповіді організму щура при моделюванні гострого пошкодження легень в тому числі завдяки зменшенню у плазмі циркулюючої крові вмісту Il-1β, Il-6 та TNFα.

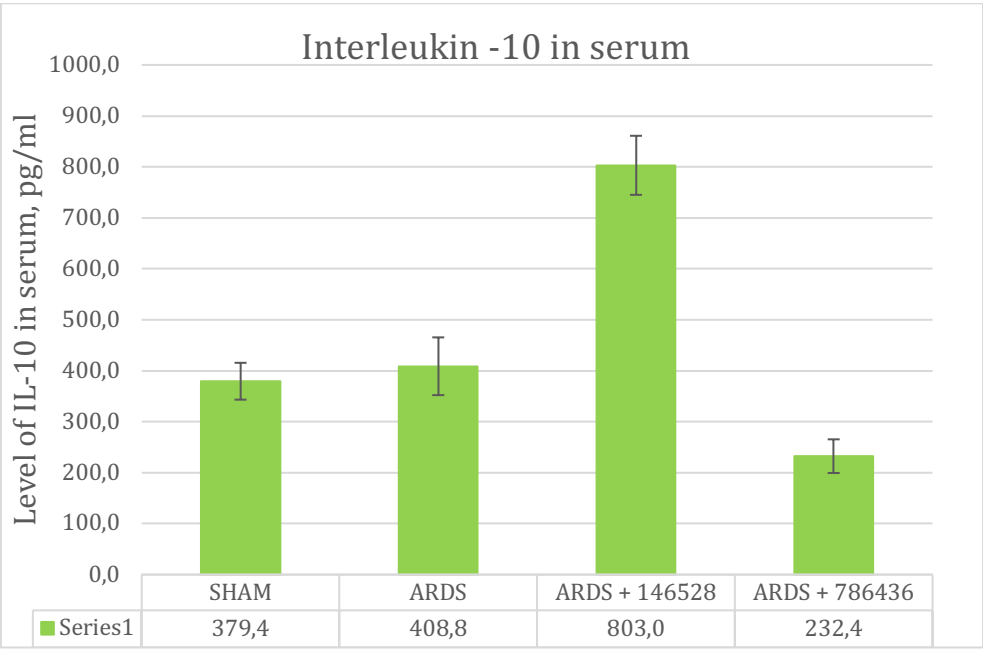


Рис. 29. Вміст IL-10 у плазмі крові щурів.

Далі проводили дослідження вмісту у плазмі крові щурів протизапального цитокіну – інтерлейкіну 10. Було показано, що моделювання ГРДС у старих щурів лінії SHR не призводять до змін вмісту даного цитокіну (рис. 29), хоча ряд досліджень вказують на те, що рівень цього цитокіну може бути маркером важкості пошкодження легень. Проте, використання інгібітору PCKß 146528 у щурів із ГРДС призводить до підвищення вмісту Il-10 в плазмі, що може свідчити про активацію процесів, направлених на зменшення системних проявів запального процесу.

3.10. Визначення експресії генів, що кодують цитокіни

Відомо, що TNFα та Il-6 є прозапальними цитокінами, рівень яких підвищується при розвитку ряду патологічних станів, у тому числі і ARDS [15, 16]. Інтерлейкін 10 є антизапальним цитокіном, але є дані, що під час гострого пошкодження легень (пневмонія, індукована введенням бактеріального ліпополісахариду) [17] експресія гену, що його кодує, суттєво підвищується. У пацієнтів з гострим респіраторним синдромом рівень цього цитокіну також підвищується в плазмі крові [18].

Для оцінки ефективності нашої моделі ГРДС в роботі проводили визначення експресії генів, що кодують цитокіни (TNFα, Il-6, IL-10, тощо) проводили у тканинах легень методом Real-time PCR. Було показано, що при моделюванні ГРДС рівень експресії гену, що кодує TNFα підвищився у 3,5 рази ($p<0,01$), Il-6 – у 2,6 разів($p<0,01$), і вміст мРНК гену IL-10 збільшився майже у 2 рази (рис. 30)

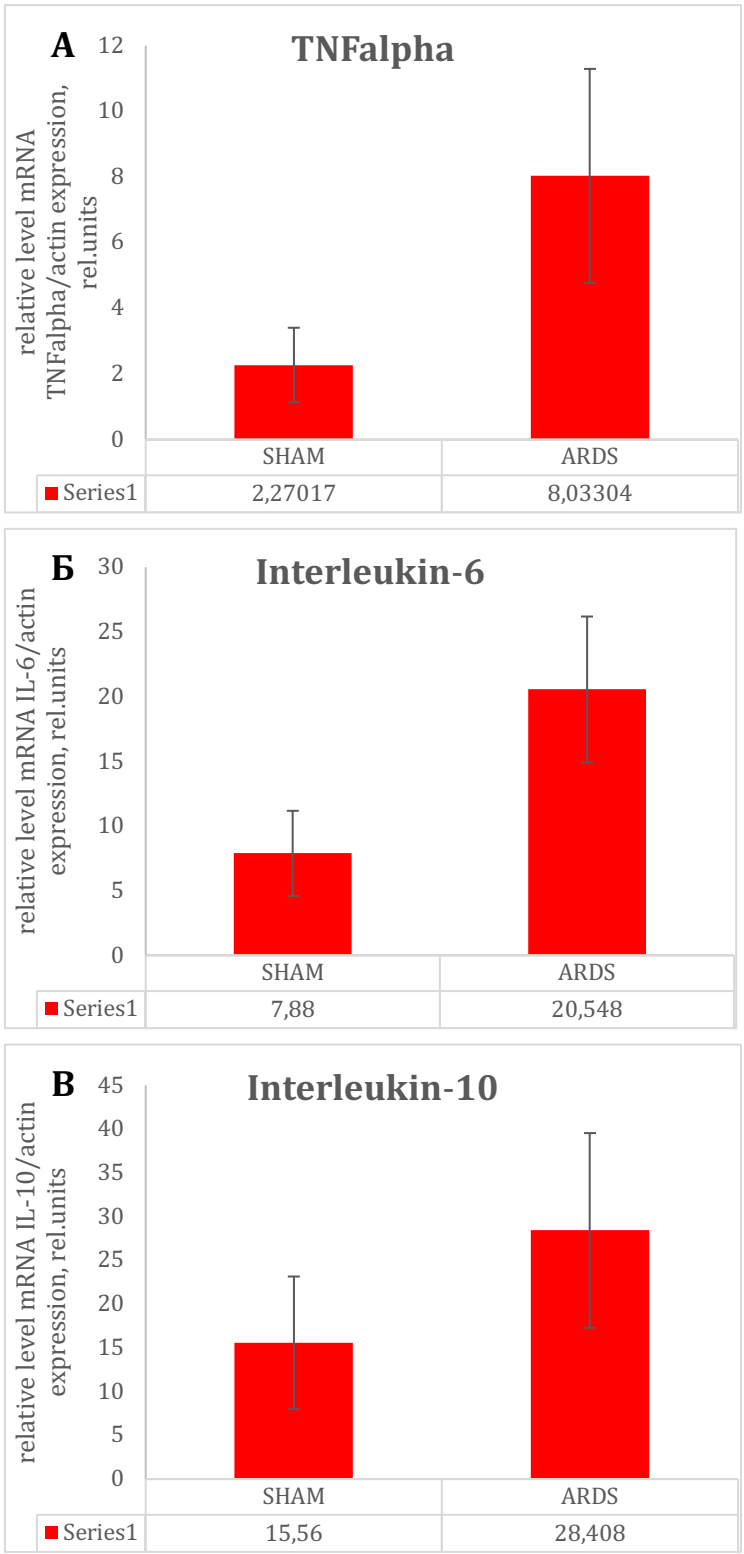


Рис.30. Відносний рівень експресії генів, що кодують цитокіни TNFα (А), Il-6 (Б), IL-10 (В).

3.11 Оцінка ультраструктурних змін у легенях методом світлової мікроскопії

Аналіз отриманого матеріалу показав, що нормовентиляція легень навіть в контрольній групі тварин призводила до зміни архітектоніки легеневої тканини, що проявлялось в потовщенні альвеолярної стінки та зменшенні сумарного об'єму альвеолярного простору за рахунок лейкоцитарної інфільтрації. На окремих ділянках зразків спостерігалось розрихлення та набряк периваскулярної строми, розширення судин з агрегованими еритроцитами, крововиливи та ексудат в альвеолярному просторі, вогнещева руйнація альвеолярних перегородок, виявлялися групи розширених альвеол. Ателектази були відсутні.(Рис.1. A,B)

Режим гіпервентиляції на фоні введення PolyI:C в значній мірі посилювало зазначені структурні зміни.

Численні вогнищеві геморагії, виникнення яких пов'язане із порушенням проникності судин, а в окремих випадках і руйнуванням судинної стінки, гіперемія судин та агрегація тромбоцитів, периваскулярний та перибронхіальний набряк, лейкоцитарна генералізована інфільтрація, заповнення альвеолярного простору десквамованими альвеоцитами, еритроцитами та лейкоцитами (в складі яких збільшується відсоток нейтрофілів), а на окремих ділянках досліджуваної тканини заповнення альвеол ексудатом та еозин-позитивними утвореннями (гіалінові мембрани), чередування ателектазних ділянок і зон з ознаками енфіземи, фрагментація базальної мембрани окремих бронхіол, часткове злущування бронхіального епітелію, наявність лейкоцитарних інфільтратів в просвіті бронхів свідчать про значні функціональні порушення, пов'язані із кровопостачанням легень, підвищенням альвеолярного поверхневого натягу, та формуванням численних зон з унеможливленим газообміном. (Рис.31. C,D,I.F)

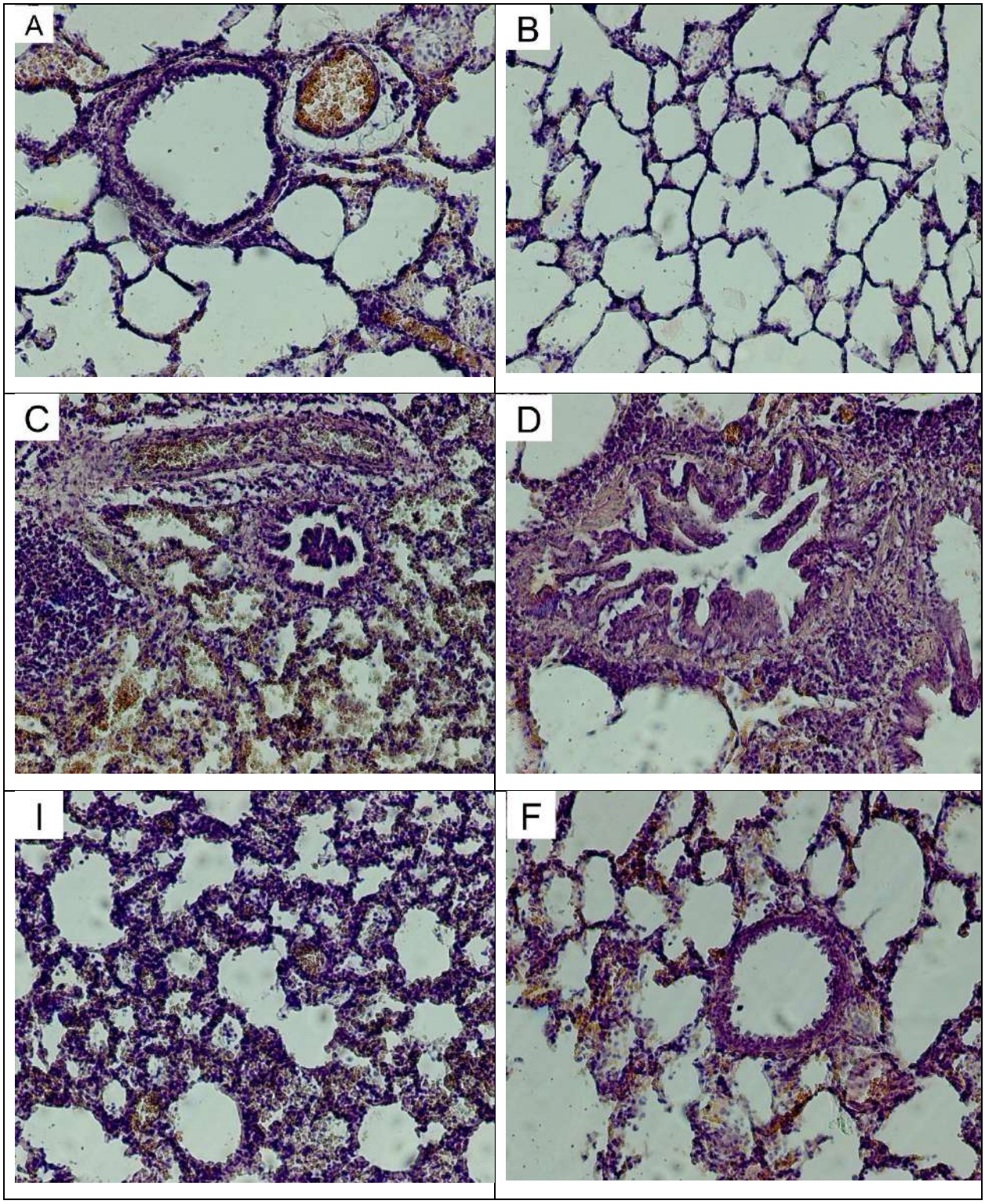


Рис. 31. Гістологічні препарати (гематоксилін-еозин) легеневої тканини експериментальних тварин. А, В - Легені щурів після операції в режимі нормовентиляції із інтратрахеальним введенням фізіологічного розчину . Периваскулярний набряк, в розширених судинах агреговані

еритроцити, альвеоли вогнищево розширені з частковою руйнацією алвеолярних перегородок, незначна інфільтрація лейоцитів Зб.Х100.

C, D, I, F - Легені щурів після операції в режимі гіпервентиляції на фоні ін'єкції PolyI:C. Виражена геморагія, еритроцити щільно заповнюють повітряний простір альвеол, значна лейкоцитарна інфільтрація, як в зоні адвентиції бронхіол, так і в паренхімі легень. Різко скорочені бронхіоли, просвіт бронхіоли, заповнений лейкоцитами та злущеним епітелієм (C, D) Спостерігається значне потовщення міжальвеолярних перегородок та зменшення об'єму альвеолярного простору (I), в окремих альвеолах спостерігаються гіалінові утворення. (F) ЗбХ100.

Застосування інгібіторів протеїнкінази С попереджувало генералізований характер структурних порушень в паренхімі легень піддослідних тварин, що проявлялось в зниженні рівня інтерстиціального набряку, зменшення кількості лейкоцитів, як в повітряному просторі альвеол, так і безпосередньо в між альвеолярних перегородках. Прояви геморагії та гіперемії локально зберігались, проте їх площа на досліджуваних зрізах суттєво знижувалась (рис. 32, 33).

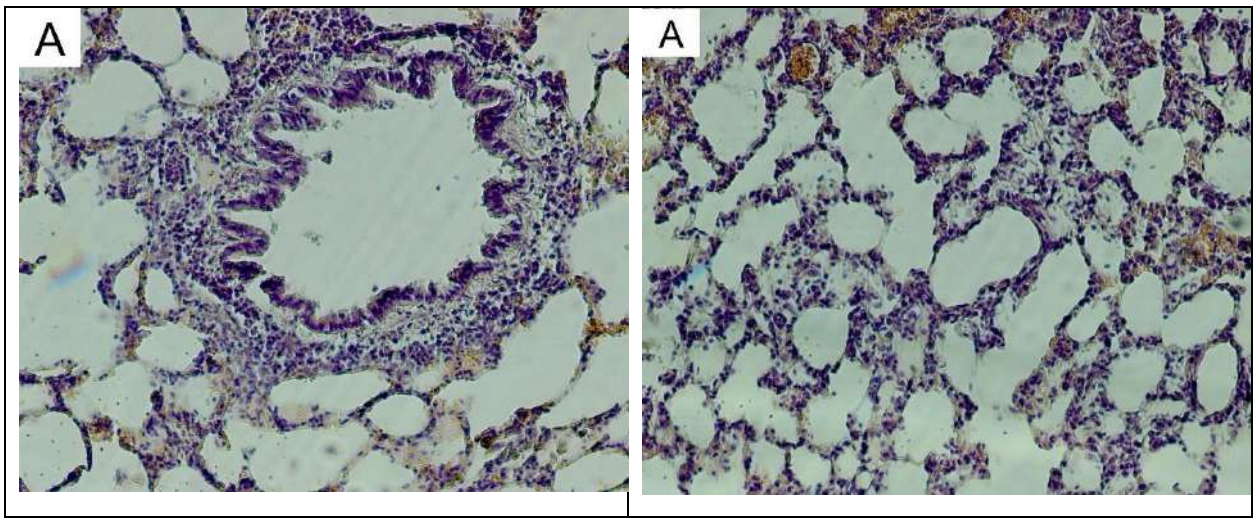


Рис 32. Легені щурів після гіпервентиляції та ін'єкції Poly I:C на фоні введення речовини 146528. Збх100

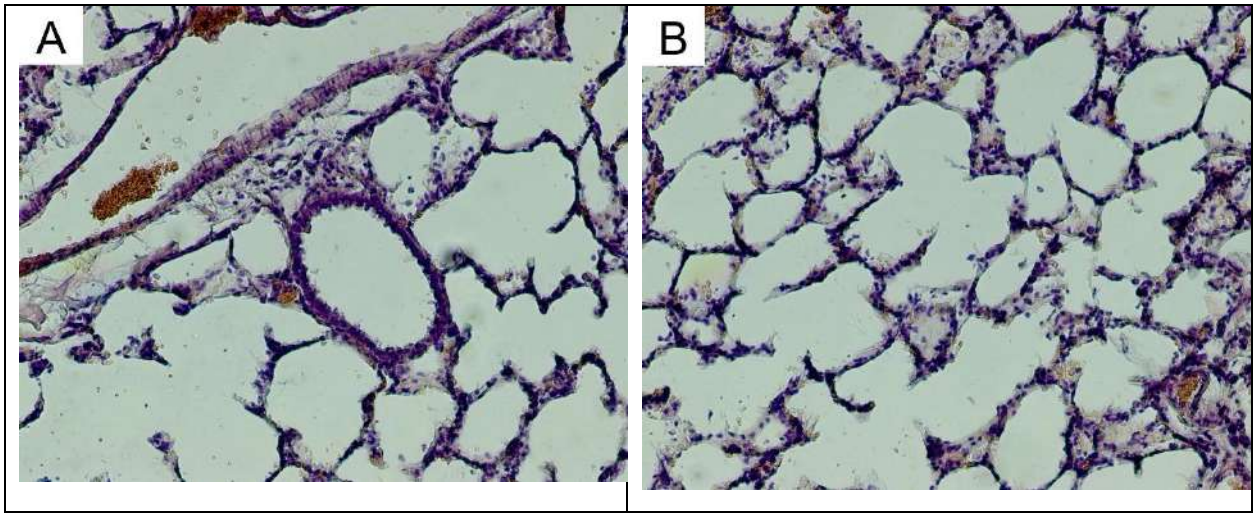


Рис 33. Легені щурів після гіпервентиляції та ін'єкції Poly I:C на фоні введення речовини 963975. Збх100

При іммуногістохімічному виявленні нейтрофільних позаклітинних пасток відмічалось значне зменшення їх кількості, як в паренхімі легень, так і в зонах адвентиції бронхіол. Ефект застосування інгібіторів протеїнкінази С проявився і при морфометричніому вивчені тканин.

Морфометричний аналіз тканини легень показав, що режим гіпервентиляції підвищував більшість показників в тій чи іншій мірі. Так, параметри, які характеризують структурні зміни в субмукозному шарі, а саме: %Tao %Wao підвищувались на 35% ($p \leq 0.01$) та 12% (статистично не достовірно) відповідно, а показник %Tat на 16% ($p \leq 0.01$) в порівнянні із такими в контрольній групі. Значення параметрів, які відображають деформацію мукозного шару у випадку показника %Tai, в розрахунку якого враховуються зміни площі просвіту бронхіоли, підвищувався на 5%, ($p \leq 0.01$) в той час як показник %Wai (в розрахунок якого площа просвіту бронхіоли не включається), знижувався на 13% (статистично не достовірно) в порівнянні з контролем. Така різниця пояснюється суттєвим зменшенням площі просвіту бронхіоли при застосуванні режиму гіпервентиляції, що відображає параметр %Wab, який в дослідах з

моделюванням ГРДС по відношенню до контрольних значень знижувався на 10% ($p \leq 0.01$) (Рис. 34).

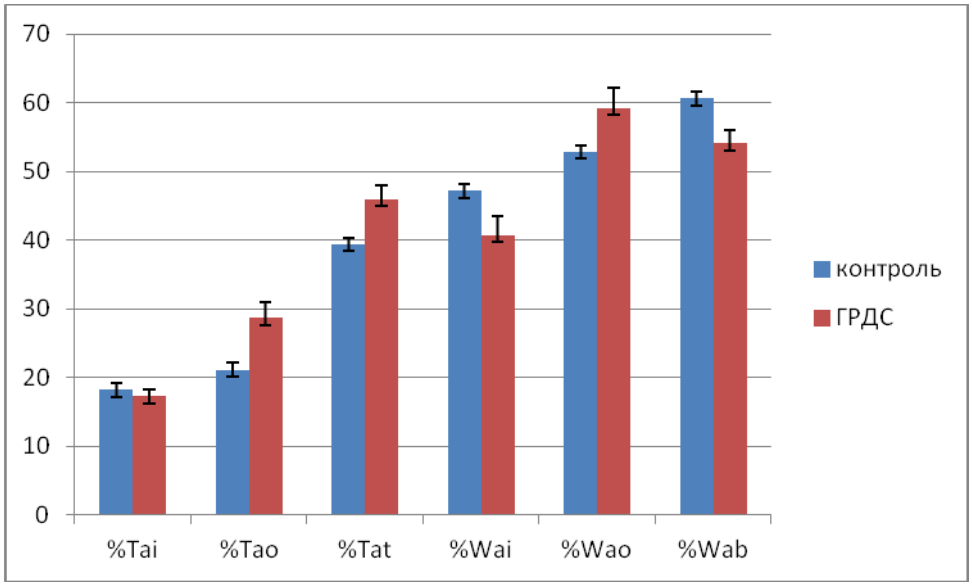


Рис. 34. Морфометричний аналіз параметрів стінок бронхіол в контрольній групі тварин та в групі із моделюванням ГРДС.

Деформація та потовщення стінок бронхіоли відбуваються за рахунок набряку, розрихлення сполучної тканини та лейкоцитарної інфільтрації. Скорочення гладеньких м'язів призводить до звуження просвіту повітроносних шляхів. Інгібітори протеїнкінази С, ефективність яких була проаналізована та доведена в дослідах *in vitro* на культурі нейтрофілів, суттєво змінювали динаміку вищезазначених змін, викликаних застосуванням режиму гіпервентиляції. Так, введення речовини 146528 знижувало такі показники як %Tao, %Wao та %Tat на 20%, 14%, та 6%, а речовина 963975 – на 19%, 10% та 13% відповідно по відношенню до таких в групі із моделюванням ГРДС. Значення показника %Tai у випадку застосування речовини 1 зростало на 17%, а значення %Wai на 20% в порівнянні із групою тварин, які перебували в режимі гіпервентиляції. Застосування речовини 963975 практично не впливає на значення показника %Tai, проте показник %Wai підвищувався в порівнянні із групою ГРДС на 14%, та практично повертався до контрольних значень. Інгібітори протеїнкінази С збільшували

площу просвіту бронхіоли (%Wab) в порівнянні з групою тварин з моделюванням ГРДС, а відповідно, розширювали повітроносні шляхи на 5% у випадку застосування речовини 1 і на 11% у випадку застосування речовини 963975 (рис 35).

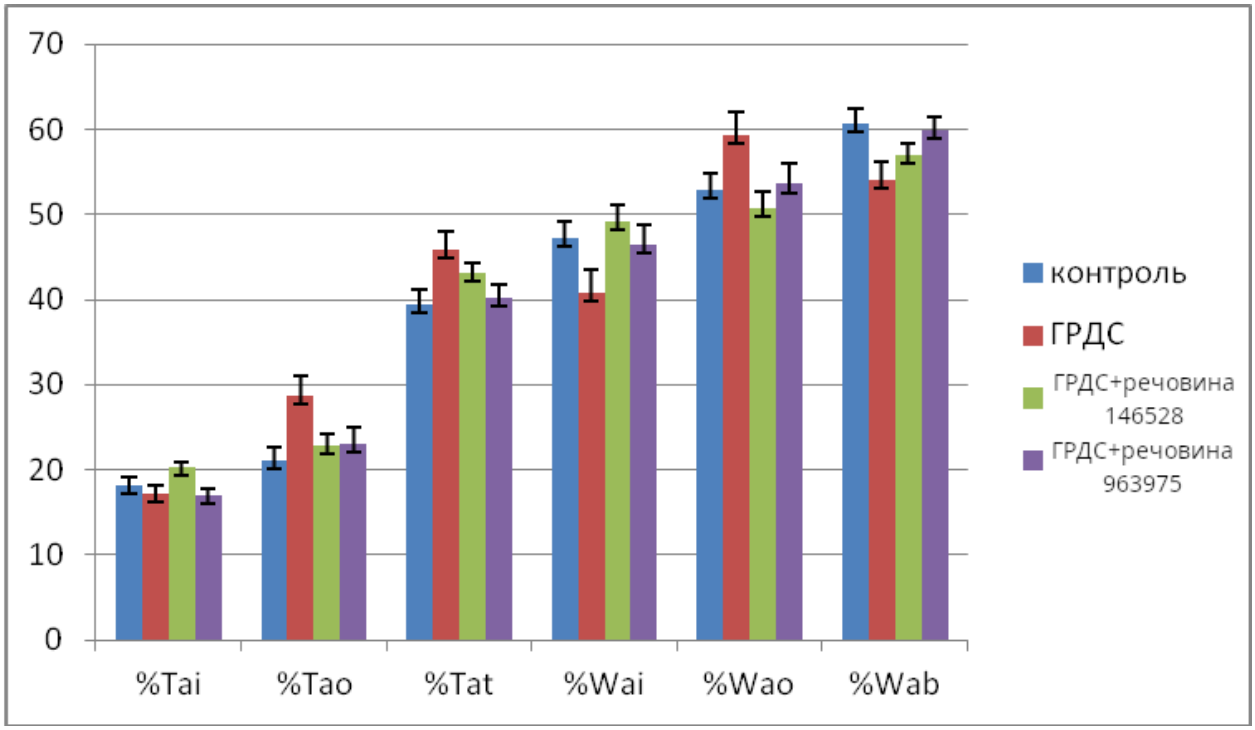


Рис. 35. Морфометричний аналіз параметрів стінок бронхіол в контрольній групі тварин, в групі із моделюванням ГРДС та при застосуванні інгібіторів протеїнкінази С.

Необхідно відмітити, що виходячи із статистичного аналізу структурні зміни, які детектувались у щурів кожної із проаналізованих груп, хоч і були одно направленими, проте мали, в значній мірі, індивідуальний характер. Рис. (36, 37, 38, 39).

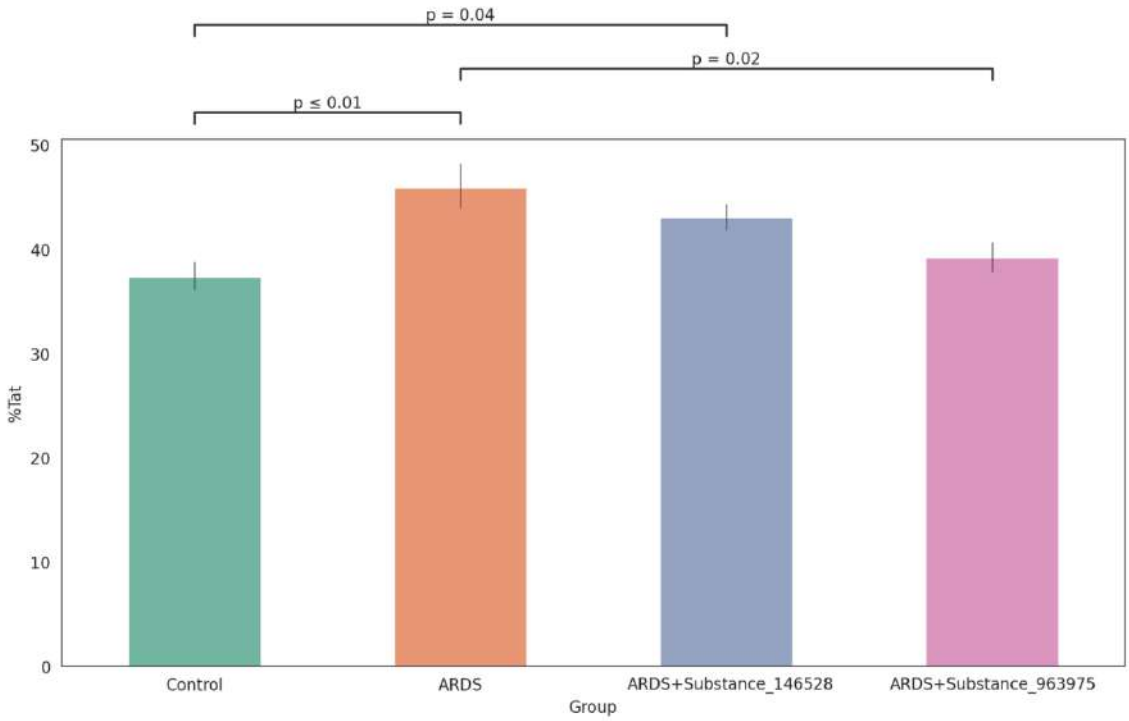


Рис.36. Порівняння достовірності впливу речовин на показник %Tat при моделюванні ГРДС

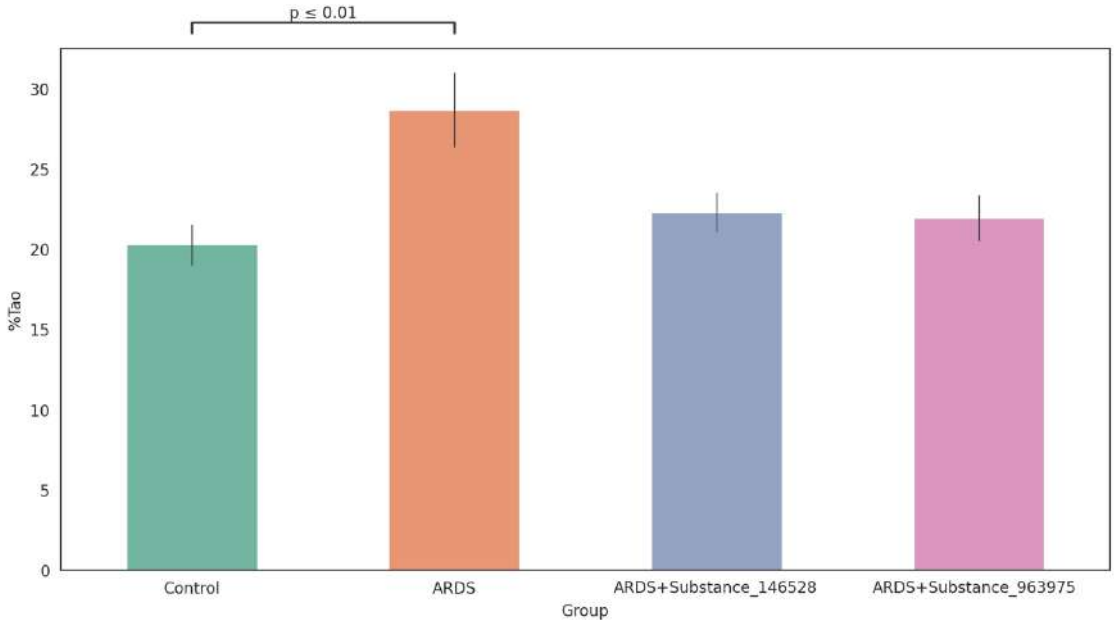


Рис.37. Порівняння достовірності впливу речовин на показник %Tao при моделюванні ГРДС

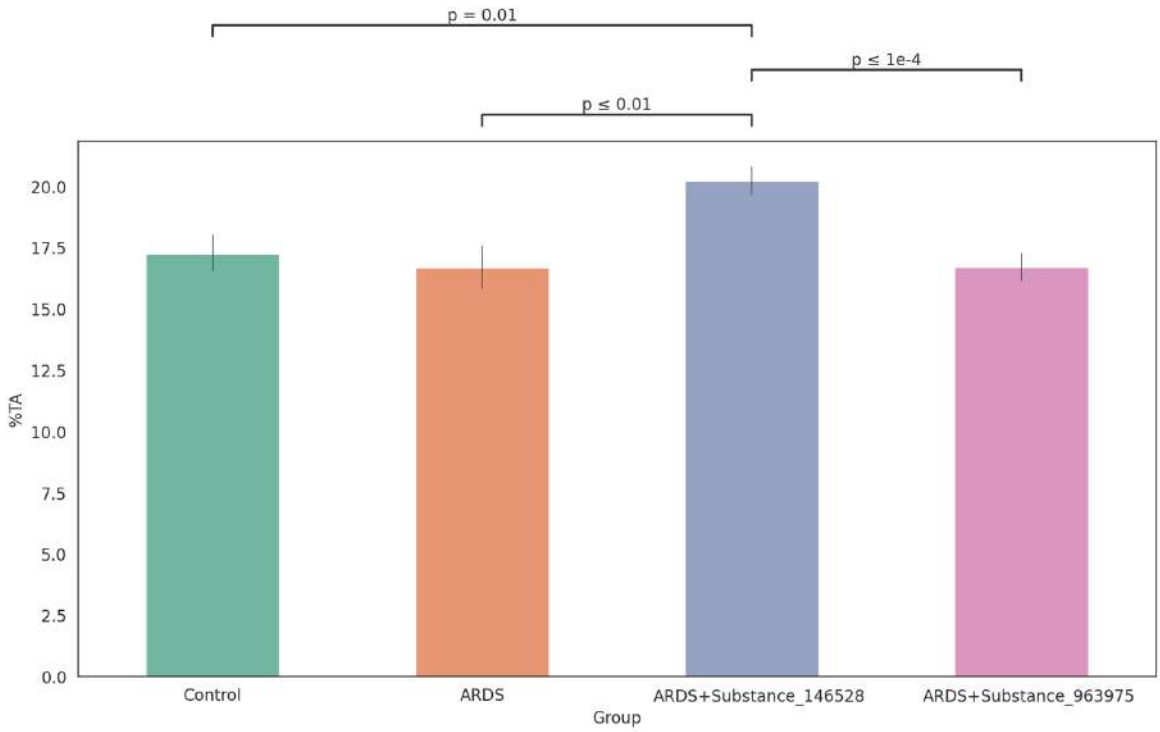


Рис.38. Порівняння достовірності впливу речовин на показник %Таі при моделюванні ГРДС

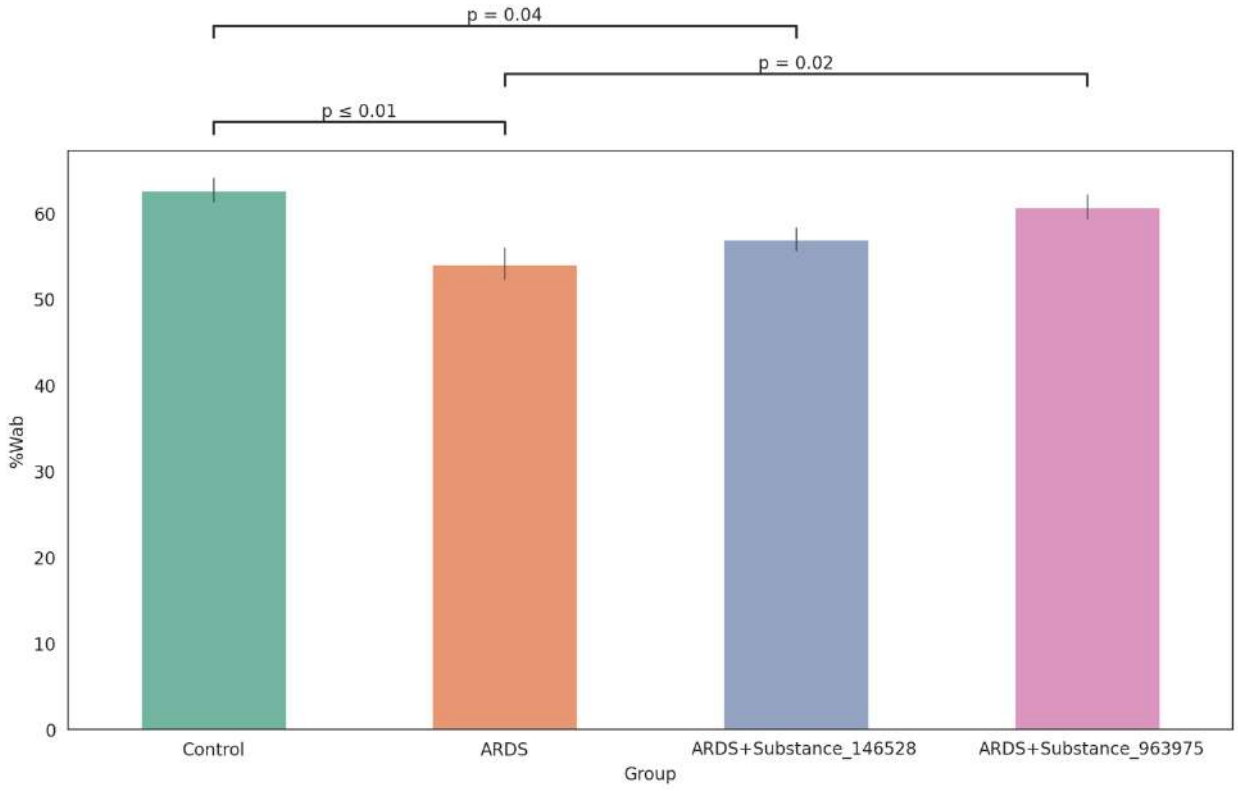


Рис.39. Порівняння достовірності впливу речовин на показник %Wab при моделюванні ГРДС

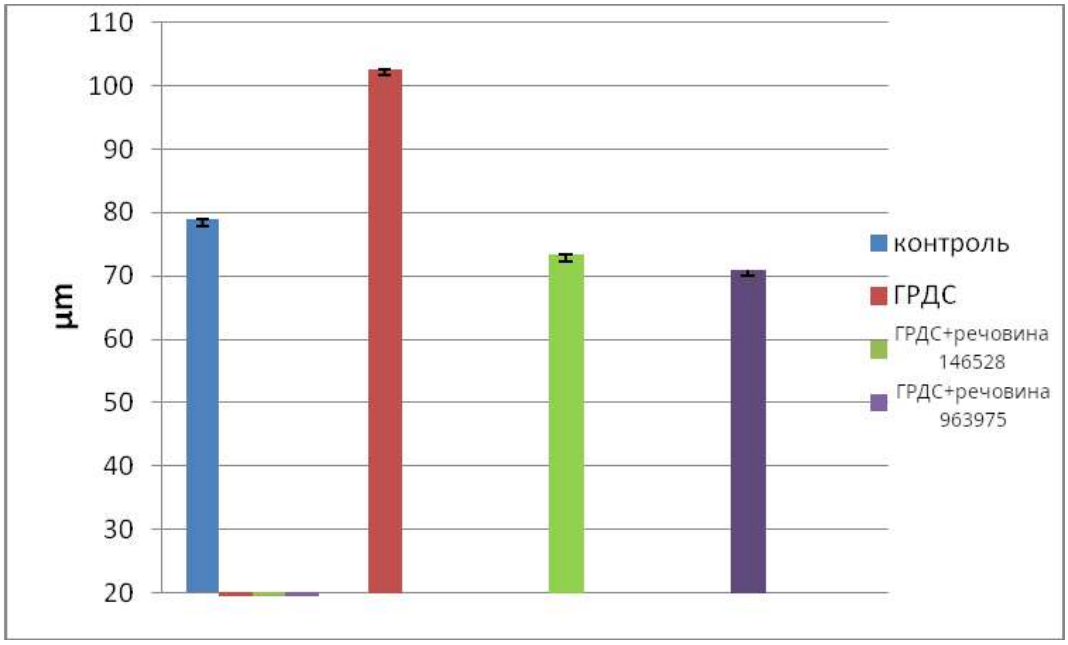


Рис. 40. Товщина міжальвеолярних перегородок в усіх експериментальних групах тварин.

В експериментах із моделюванням ГРДС також спостерігалось значне потовщення стінок альвеол за рахунок інтерстиціального набряку та лейкоцитарної інфільтрації. Відповідно суттєво зменшився об'єм повітряного простору альвеол. Морфометричний аналіз показав, що режим гіпервентиляції підвищував товщину міжальвеолярних перегородок на 30% ($p \leq 1e\text{-}5$) і знижував об'єм альвеол на 17% ($p \leq 1e\text{-}5$) в порівнянні з контролем . Речовини в деякій мірі попереджали цей ефект, знижуючи рівні набряку та лейкоцитарної інфільтрації. Зокрема, застосування речовини 146528 знижувало товщину стінок альвеол на 28% ($p \leq 1e\text{-}5$), у випадку введення речовини 963975 цей показник знижувався на 30% ($p \leq 1e\text{-}5$) в порівнянні із групою з моделюванням ГРДС (Рис. 40, 42). Суттєво зменшилась кількість нейтрофілів, які містили цитрулінований гістон Н3 і вже сформованих нейтрофільних позаклітинних пасток. Об'єм альвеол зростав на 45% ($p \leq 1e\text{-}5$) і 46%($p \leq 1e\text{-}5$) відповідно (рис 41, 43).

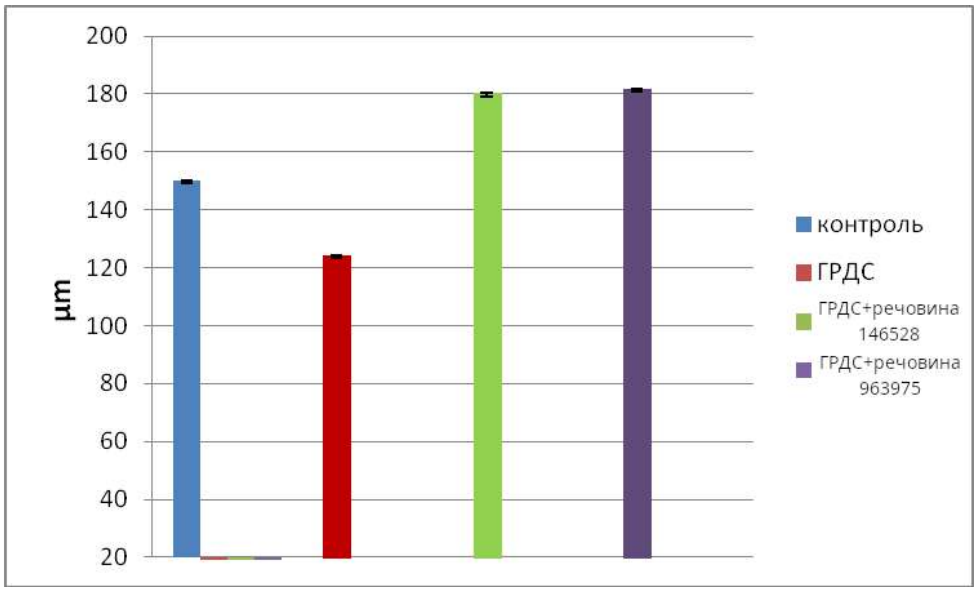


Рис. 41. Об’єм повітряного простору альвеол в усіх експериментальних групах

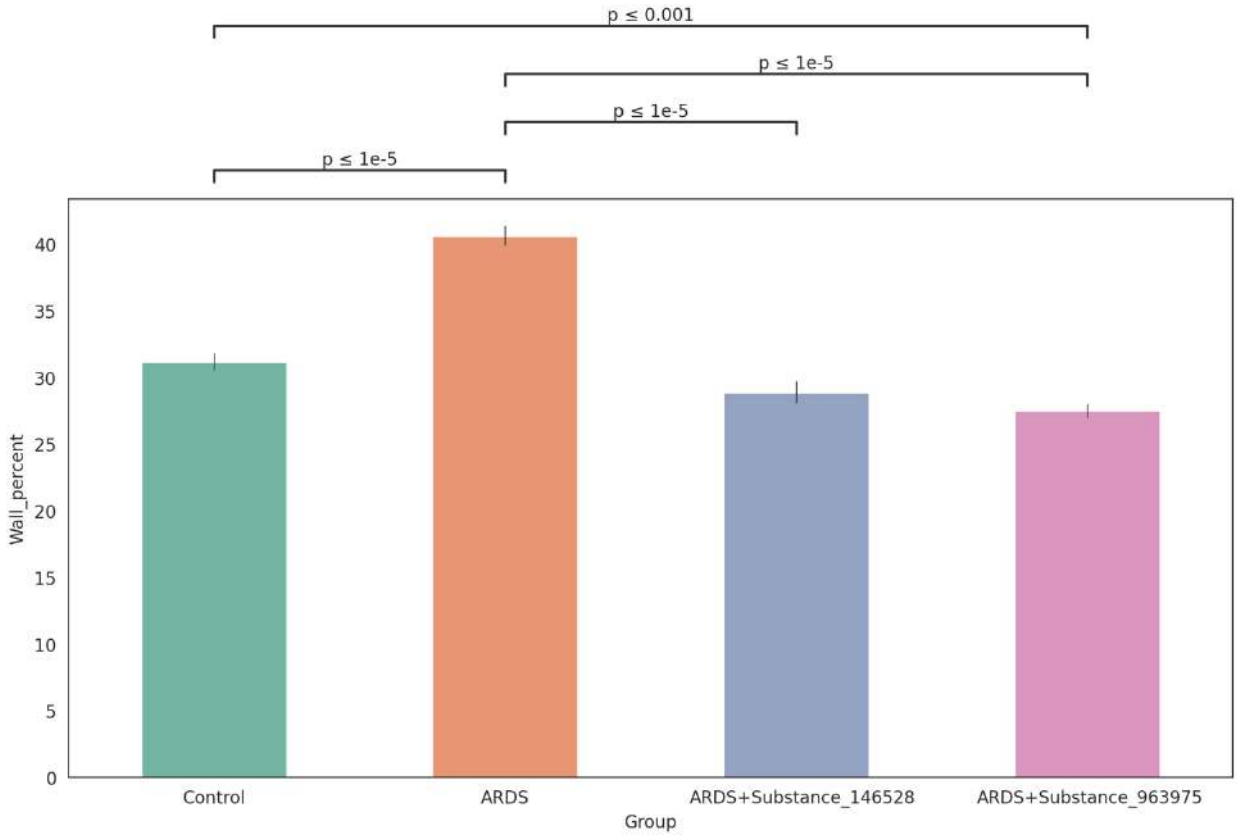


Рис. 42. Порівняння достовірності впливу речовин на товщину стінок альвеол при моделюванні ГРДС.

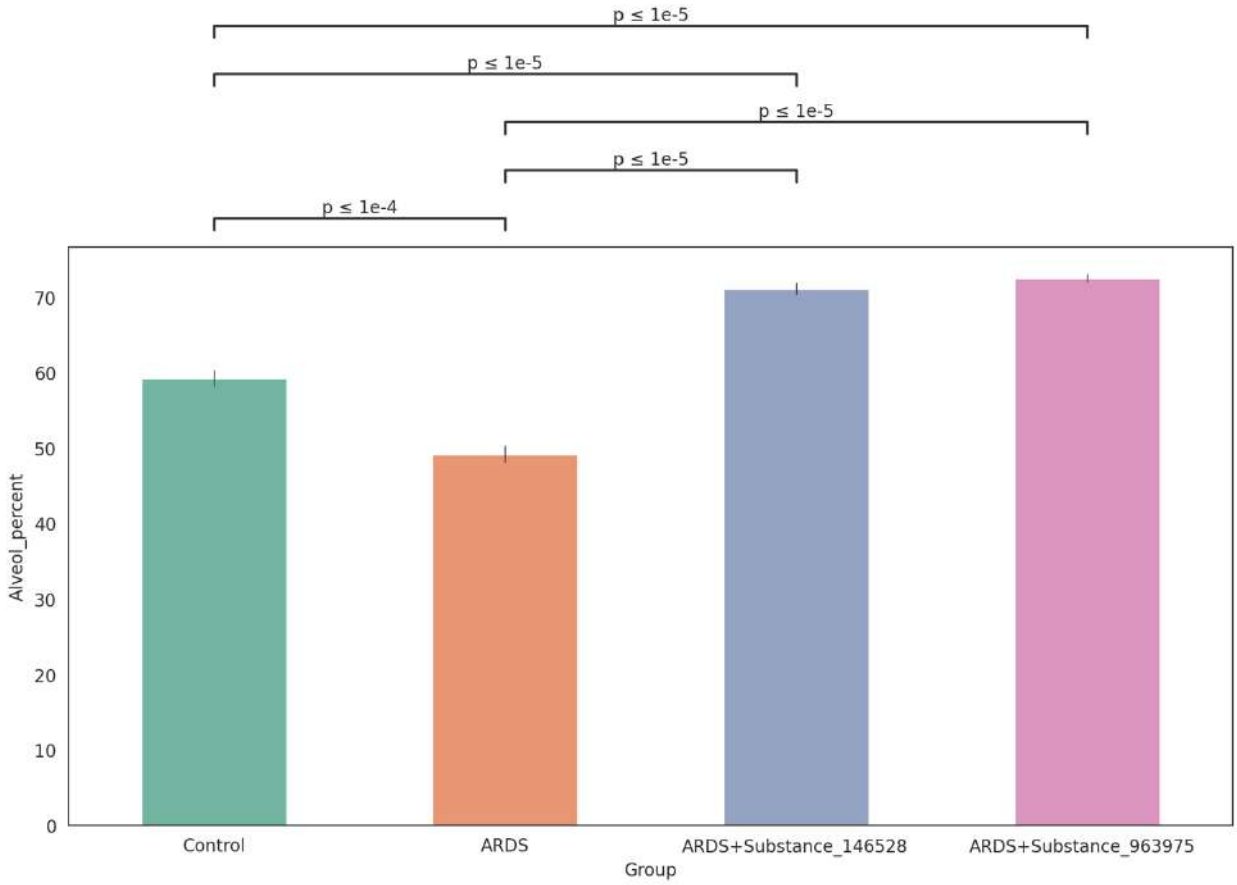


Рис. 43. Порівняння достовірності впливу речовин на об’єм повітряного простору альвеол при моделюванні ГРДС.

Таким чином, режим гіпервентиляції протягом 4 годин призводить до значних пошкоджень в структурі паренхіми легень експериментальних щурів. Ці зміни відображають суттєві порушення мікроциркуляції в тканинах, порушення проникності та руйнування стінок судин, вказують на розвиток запальних процесів і значне зниження функціонального потенціалу органу в цілому. Застосування інгібіторів протеїнкінази С попереджувало ці структурні зміни, особливо це стосується речовини 963975, яка, як показала морфометрія, повертала більшість проаналізованих показників практично до контрольних значень.

ВИСНОВКИ

1. Моделювання ГРДС за допомогою інтратрахеального введення PolyI:C і гіпервентиляції призводить до збільшення опору верхніх дихальних шляхів, а також зменшення їх розтяжності і зниження тканинної еластичності.

2. Даний вплив супроводжувався змінами концентрації вільної ДНК у бронхолегеневому лаважі, а також у плазмі крові щурів із ГРДС порівняно із щурами з вдаваним втручанням, що пов’язано із збільшенням формування нейтрофільних екстрацелюлярних пасток.

3. При моделюванні ГРДС підвищувався рівень NETозу у виділених нейтрофільних гранулоцитах дослідних тварин, крім того, їх стимуляція давала більш виражений NETоз порівняно з контрольною групою.

5. Рівень експресії генів, що кодують TNF-α, IL-6, IL-10 достовірно підвищувався в моделі ГРДС

6. Всі вищезазначені зміни супроводжувалися значними відмінностями морфологічної картини тканин легень, що мали особливості, характерні для початкових стадій розвитку гострого респіраторного дистрес синдрому.

7. Визначено ефективність впливу трьох низькомолекулярних інгібіторів протеїнкінази С бета (PKCB) як ключового ферменту активації нейтрофільних гранулоцитів із утворенням NETs.

8. Відібрані речовини демонстрували відсутність цитотоксичності та наявність дозозалежності в активності щодо протеїнкінази С-бета

9. На моделі гострого респіраторного дистрес синдрому показано зниження відповіді нейтрофільних гранулоцитів у вигляді НЕТозу (як спонтанного, так і індукованого).

10. Взяті разом, отримані результати свідчать про те, що відібрані речовини є перспективними кандидатами для подальшого дослідження їх якостей для можливого використання в фармакології і затвердження у якості медичних препаратів з властивістю пригнічення протеїнкінази С.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Haitao Li, Xiaoting Zhou, Hongyi Tan, Yongbin Hu et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI/ARDS // Oncotarget. 2017 Nov 28;9(2):1772-1784.
2. E Lefrançais, Beñat Mallavia, Hanjing Zhuo, Carolyn S Calfee et al. Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury // JCI Insight. 2018 Feb 8;3(3).
3. G. Bellani, John G. Laffey, Tài Pham, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries // JAMA. 2016; 315(8): 788-800.
4. Peter G Gibson, Ling Qin and Ser Hon Puah. COVID‐19 acute respiratory distress syndrome (ARDS): clinical features and differences from typical pre‐COVID‐19 ARDS/ Med J Aust 2020; 213 (2): 54-56.
5. Koichi Yuki, Miho Fujiogi, S Koutsogiannaki. COVID-19 pathophysiology: A reviewClin Immunol, 2020 Jun; 215: 108427.
6. Yu Zuo, Srilakshmi Yalavarthi, Hui Shi. Neutrophil extracellular traps in COVID-19/ JCI insight 10.1172/jci.insight.138999
7. Chao Song, Haitao Li, Yi Li. NETs promote ALI/ARDS inflammation by regulating alveolar macrophage polarization / Exp Cell Res. 2019 Sep 15;382(2):111486.
8. W. Ortmann, E. Kolaczkowska. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation // Cell Tissue Res. 2018 Mar;371(3):473-488.
9. Obama T, Itabe H. Neutrophils as a Novel Target of Modified Low-Density Lipoproteins and an Accelerator of Cardiovascular Diseases // Int J Mol Sci. 2020 Nov 5;21(21):8312.
10. Huan Wang, Li-Li Sha, Tian-Tian Ma, Lu-Xia Zhang, Min Chen, and Ming-Hui Zhao. Circulating Level of Neutrophil Extracellular Traps Is Not a Useful

Biomarker for Assessing Disease Activity in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis // PLoS One. 2016; 11(2): e0148197.

11. Chun, C.D., Liles, W.C., Frevert, C.W. et al. Mechanical ventilation modulates Toll-like receptor-3-induced lung inflammation via a MyD88-dependent, TLR4-independent pathway: a controlled animal study // BMC Pulm Med 10, 57 (2010). https://doi.org/10.1186/1471-2466-10-57.
12. Robert D Gray, Christopher D Lucas, Annie Mackellar, Adriano G Rossi. Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps // Journal of Inflammation, 2013, 10(1):12.
13. Thiago DeSouza-Vieira, Anderson Guimarães-Costa, Natalia C Rochael, Maria N Lira, Michelle T Nascimento, Phillipe de Souza Lima-Gomez, Rafael M Mariante, Pedro M Persechini, Elvira M Saraiva. Neutrophil extracellular traps release induced by Leishmania: role of PI3Kγ, ERK, PI3Kσ, PKC, and [Ca2+] //J Leukoc Biol, 2016 Oct;100(4):801-810. doi: 10.1189/jlb.4A0615-261RR. Epub 2016 May 6.
14. Wang, Y., Luo, L., Braun, O.Ö. et al. Neutrophil extracellular trap-microparticle complexes enhance thrombin generation via the intrinsic pathway of coagulation in mice. Sci Rep 8, 4020 (2018). https://doi.org/10.1038/s41598-018-22156-5.
15. Mengting Qin and Zhongpeng Qiu. Changes in TNF-α, IL-6, IL-10 and VEGF in rats with ARDS and the effects of dexamethasone // Exp Ther Med. 2019 Jan; 17(1): 383–387.
16. Deme Swaroopa, Kakarla Bhaskar,1 T. Mahathi, Shivakrishna Katkam,2 Y. Satyanarayana Raju, Naval Chandra, and Vijay Kumar Kutala. Association of serum interleukin-6, interleukin-8, and Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score with clinical outcome in patients with acute respiratory distress syndrome // Indian J Crit Care Med. 2016 Sep; 20(9): 518–525.
17. Shan Lang, Libing Li, Xuning Wang, Jianxin Wang. CXCL10/IP-10 Neutralization Can Ameliorate Lipopolysaccharide-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome in Rats// PLoS ONE, 2017, 12(1) :e0169100

18. Z. Chen, Y. Hu, T. Xiong, C. Chen, X.-X. Su, Y. Huang, L. Zhang. IL-10 promotes development of acute respiratory distress syndrome via inhibiting differentiation of bone marrow stem cells to alveolar type 2 epithelial cells // European Review for Medical and Pharmacological Sciences 2018; 22: 6085-6092