

Анализ роли нейтрофилов в развитии воспаления в монокроталининдуцированной легочной артериальной гипертензии

Г.Н. Семенкова^{1*}, И.Э. Адзериho¹, Н.В. Амаэгбери², Т.Э. Владимирская¹, О.Н. Яцевич¹

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

² Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

* E-mail: galina_semenkova@yahoo.com

Резюме. Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) представляет собой клинический синдром с мрачным исходом. Это заболевание связано с дисфункцией или повреждением эндотелия, ремоделированием легочных сосудов, повышением сосудистого сопротивления и артериального давления в легочной артерии. Все это провоцирует правожелудочковую недостаточность и отек легких, что приводит к преждевременной смерти больных. ЛАГ сопровождается развитием воспалительного процесса, одной из основных причин которого является усиленная продукция активных форм кислорода и хлора стимулированными нейтрофилами.

Цель исследования — изучение роли этих клеток в формировании оксидативного стресса в экспериментальной модели ЛАГ.

Исследования проведены на беспородных белых крысах. Моделирование ЛАГ проводили путем подкожного введения раствора монокроталина в дозе 60 мг/кг. Контрольную группу составили 10 здоровых животных. После инъекции монокроталина животных с ЛАГ разделяли на 4 группы: 10 крыс в 2-недельной группе, 10 крыс в 4-недельной группе, 14 крыс в 6-недельной группе и 20 крыс в 8-недельной группе. После забора периферической крови и выделения нейтрофилов определяли продукцию активных форм кислорода и хлора, секреторную дегрануляцию и концентрацию несвязанных ионов кальция в цитозоле с использованием спектральных методов анализа. Результаты сравнивали с соответствующими данными, полученными для 10 здоровых животных.

Установлено, что развитие ЛАГ у крыс в течение 8 нед сопровождается праймингом нейтрофилов и формированием оксидативного стресса в результате модификации механизмов «респираторного взрыва». Выявлено изменение продукции активных форм кислорода и хлора, нарушение Ca^{2+} -зависимой внутриклеточной сигнализации с вовлечением циклооксигеназ 1/2 и фосфатидилинозитол-3-киназы, усиление секреции миелопероксидазы из нейтрофилов.

Ключевые слова: легочная артериальная гипертензия, нейтрофилы, монокроталин, активные формы кислорода и хлора, миелопероксидаза

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского Республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № M17-113).

Для цитирования: Семенкова Г.Н., Адзериho И.Э., Амаэгбери Н.В., Владимирская Т.Э., Яцевич О.Н. Анализ роли нейтрофилов в развитии воспаления в монокроталининдуцированной легочной артериальной гипертензии. Лабораторные животные для научных исследований. 2023; 4. 71–77. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-04-06>.

Analysis of the neutrophils role in the development of inflammation in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension

G.N. Semenkova^{1*}, I.E. Adzerikho¹, N.V. Amaegberi², T.E. Vladimirskaia¹, O.N. Yatsevich¹

¹ Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

² Belarusian State University, Minsk, Belarus

* E-mail: galina_semenkova@yahoo.com

Abstract. Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a clinical syndrome with dismal outcome. This disease is associated with endothelial dysfunction or damage, pulmonary vascular remodeling, and increased vascular resistance and pulmonary artery blood pressure. All this provokes right ventricular failure and pulmonary edema, which leads to premature death of patients. PAH is accompanied by the inflammatory process development, one of the main causes of which is the increased production of reactive oxygen and chlorine species by stimulated neutrophils. The purpose of our study was to study the role of these cells in the oxidative stress formation in experimental model of PAH.

The studies were conducted on outbred white rats. Modeling of PAH was carried out by subcutaneous administration of a monocrotaline solution at a dose of 60 mg/kg. The control group consisted of 10 healthy animals. After monocrotaline injection, PAH animals were divided into 4 groups: 10 rats in the 2-week group, 10 rats in the 4-week group, 14 rats in the 6-week group, and 20 rats in the 8-week group. After collecting peripheral blood and isolating neutrophils, reactive oxygen and chlorine species production, secretory degranulation and the unbound calcium ions concentration in the cytosol were determined using spectral analysis methods. The results were compared with corresponding data obtained for 10 healthy animals.

It has been established that the development of PAH in rats over 8 weeks is accompanied by neutrophil priming and oxidative stress formation as a result of “respiratory burst” mechanisms modification. Changes in reactive oxygen and chlorine species production, disruption of Ca²⁺-dependent intracellular signaling involving cyclooxygenase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase, and increased secretion of myeloperoxidase from neutrophils were revealed.

Keywords: pulmonary arterial hypertension; neutrophils; monocrotaline; reactive oxygen and chlorine species; myeloperoxidase

Acknowledgements. This work was supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. M17-113).

For citation: Semenkova G.N., Adzerikho I.E., Amaegberi N.V., Vladimirskaia T.E., Yatsevich O.N. Analysis of the neutrophils role in the development of inflammation in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Laboratory Animals for Science*. 2023; 4. 71–77. <https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-04-06>.

Введение

Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) — клинический синдром, сочетающий в себе патологические состояния различной этиологии и патогенеза. Это заболевание сопровождается ремоделированием и неконтролируемой вазоконстрикцией легочных сосудов, в результате чего повышается давление в системе легочной артерии и увеличивается сосудистое сопротивление. В дальнейшем это провоцирует правожелудочковую недостаточность и отек легких, что приводит к преждевременной смерти больных [1]. Особенностью ЛАГ является изменение иммунитета и развитие в легких воспалительного процесса. Об этом свидетельствуют инфильтрация легочной ткани различными воспалительными клетками (макрофагами, нейтрофилами, Т- и В-лимфоцитами), увеличение

уровня цитокинов и факторов роста в ремоделированных сосудах, а также циркулирующих хемокинов и цитокинов [2, 3]. Установлена связь воспалительного процесса с ремоделированием легочных сосудов при ЛАГ, которое прогрессирует в плексиформную артериопатию [2].

Одной из основных причин воспалительного патогенеза ЛАГ является оксидативный стресс, вызванный перепроизводством свободных радикалов и других оксидантов [4, 5]. Источником активных форм кислорода и хлора (АФКХ) являются фагоциты. При активации НАДФН-оксидазы эти клетки генерируют супероксидные анион-радикалы, которые превращаются в пероксид водорода (H₂O₂), являющийся субстратом миелопероксидазы (МПО), катализирующей образование хлорноватистой кислоты (НОСl). Она выполняет роль основно-

го микробицидного агента и является при этом источником свободных радикалов, что может приводить к повреждению жизненно важных молекул, нарушению клеточных функций или цитодеструкции [6, 7]. Поэтому важной составляющей медикаментозной терапии ЛАГ является снижение последствий оксидативного стресса.

Цель исследования — изучение роли нейтрофилов в формировании оксидативного стресса в экспериментальной модели ЛАГ. Выбор клеток обусловлен тем, что нейтрофилы являются основными продуцентами АФКХ благодаря высокому содержанию НАДФН-оксидазы и МПО.

Материал и методы

В работе использовали: монокроталин (МКТ), гистопак-1077, люминол (5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-дион), люцигенин (N,N'-диметил-9,9'-бисакридиний нитрат), АВАН (гидразид 4-аминобензойной кислоты), LY294002, аспирин, H₂O₂, Triton X-100 (Sigma, США), Fura 2-AM (ThermoFisher Scientific, США), компоненты для приготовления сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) («Анализ Х», Беларусь).

Исследования проведены на 64 рандомизированных белых крысах (самцы массой 200–250 г), содержащихся в стационарных условиях вивария Белорусской медицинской академии последипломного образования (БелМАПО) на полноценном стандартном пищевом рационе согласно установленным нормам. Для эксперимента выбирали активных животных с гладким, блестящим шерстным покровом, нормальной окраской видимых слизистых оболочек, охотно поедающих корм. До исследования животные находились под карантинным наблюдением в течение 2 нед, а за 24 ч были лишены корма. В день начала эксперимента проводили дополнительное обследование и взвешивание животных. Компонировка по группам наблюдения проводилась произвольно.

Моделирование ЛАГ у 54 животных осуществляли с помощью МКТ [8, 9]. МКТ растворяли в подогретом до 30 °С 0,9% растворе NaCl; 1 мл полученного раствора вводили крысам утром натощак в дозе 60 мг/кг массы тела подкожно в область холки. После инъекции МСТ крысы с ЛАГ были случайным образом разделены на 4 группы: 2-недельную (10 крыс), 4-недельную (10 крыс), 6-недельную (14 крыс) и 8-недельную (20 крыс) группы, что обусловлено временными промежутками между началом индуцирования патологии и забором крови для анализа. Забор крови проводили утром из нижней полой вены животных под наркозом в стандартных условиях операционного блока вивария. Наркотизацию животных проводили внутримышечным введением раствора кетамина из расчета 0,2–0,3 мл на 100 г массы тела. Результаты сравнивали с соответствующими

данными, полученными для контрольной группы. Контрольную группу составили 10 здоровых животных, которым вместо МКТ вводили эквивалентное количество физиологического раствора. Забор крови у этих животных производили через 2 нед после введения растворителя.

На протяжении всего эксперимента животные содержались индивидуально в стандартных условиях вивария с постоянным доступом к воде и пище. По истечении срока наблюдения животные были выведены из эксперимента с соблюдением принципов биоэтики (в соответствии со стандартами GLP) на фоне внутривенного тиопенталового наркоза из расчета 1 мл 5% тиопентала натрия на 100 г массы тела.

При проведении исследований руководствовались соблюдением требований Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, а также требований и рекомендаций, нормативных, научно-методических и справочных материалов по содержанию, кормлению и выводу их из эксперимента с последующей утилизацией (<https://bioethics.belmapo.by/research-ethics.html>). Настоящее исследование одобрено этической комиссией БелМАПО (№ 4 от 23.09.20).

Нейтрофилы выделяли из периферической крови крыс в градиенте плотности гистопака по стандартной методике [10]. Подсчет клеток проводили с помощью камеры Горяева. Выделенные клетки ресуспендировали в СБСРЭ, pH 7,4.

Генерацию АФКХ изучали методом хемилюминесценции (ХЛ) на биохемилюминометре БХЛ-1 (Минск, Беларусь). Определение АФКХ проводили с использованием 10 мкМ люминола или 10 мкМ люцигенина. «Респираторный взрыв» в нейтрофилах ($1 \cdot 10^5$ клеток/мл) индуцировали с помощью адгезии клеток к поверхности стекла, для чего использовали в процессе измерения ХЛ дно кварцевой кюветы диаметром 40 мм. Вклад в процессы внутриклеточной сигнализации ферментов, которые участвуют в образовании АФКХ, оценивали с использованием специфических ингибиторов: 0,1 мкМ АВАН — ингибитор МПО, 0,1 мкМ LY294002 — ингибитор фосфатидилинозитол-3-киназы (ФИЗК), 1 мкМ аспирина — ингибитор циклооксигеназы 1/2. Время прединкубации клеток с ингибиторами составляло 20 мин.

Активность секретируемой из нейтрофилов МПО оценивали по интенсивности ХЛ, измеренной в течение 10 мин в системе, содержащей 1 мл СБСРЭ (pH 5,2), 10 мкМ H₂O₂, 25 мкМ люминола и 200 мкл внеклеточной жидкости, полученной после центрифугирования суспензии нейтрофилов ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл), как описано в работе [11]. Перед измерением нейтрофилы стимулировали адгезией к поверхности кварцевого стекла в те-

чение 30 мин при 37 °С. Активность секретированной МПО ($\Sigma I_{\text{секр}}/\Sigma I_{\text{общ}} \times 100\%$) оценивали как отношение активности МПО (интегральная интенсивность ЛюмХЛ) во внеклеточной среде стимулированных адгезией клеток ($\Sigma I_{\text{секр}}$) к общей активности МПО в 200 мкл лизата клеток ($\Sigma I_{\text{общ}}$). Лизат нейтрофилов для оценки общей активности МПО получали добавлением 10% раствора Triton X-100.

Концентрацию свободного цитозольного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) определяли с помощью флуоресцентного зонда Fura 2-AM ($\lambda_{\text{ex}}=340/380$ нм, $\lambda_{\text{em}}=510$ нм) на флуориметре (СМ 2203 «Солар», Беларусь) по методике, описанной в работе [12]. Нейтрофилы (10^6 клеток/мл) (рН 7,4) инкубировали с 2 мкмоль/л Fura 2-AM при 37 °С в течение 30 мин. Клетки дважды промывали СБСРЭ и выдерживали при 37 °С в течение 30 мин для завершения дезэстерификации флуоресцентного красителя. После этого клеточную суспензию помещали в кварцевую кювету и регистрировали флуоресценцию в течение 10 мин.

Концентрацию свободных цитозольных ионов кальция в нейтрофилах рассчитывали по уравнению Гринкевича:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times [(R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)] \times B,$$

где $[\text{Ca}^{2+}]_i$ — концентрация несвязанных ионов кальция в цитоплазме (в нМ); K_d — константа связывания ионов Ca^{2+} с зондом Fura-2 (при 37 °С K_d составляет 225); R — отношение интенсивности флуоресценции при $\lambda=340$ нм к интенсивности флуоресценции при $\lambda=380$ нм; R_{min} — отношение интенсивности флуоресценции 340/380 при минимальной концентрации Ca^{2+} в среде; R_{max} — отношение интенсивности флуоресценции 340/380 при максимальной концентрации Ca^{2+} в среде; B — отношение интенсивности флуоресценции

340/380 при максимальной концентрации Ca^{2+} в среде к интенсивности флуоресценции 340/380 при минимальной концентрации Ca^{2+} в среде.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия между контрольной и экспериментальной группой анализировали с помощью критерия Даннета. Результаты представлены как среднее значение трех или более независимых экспериментов \pm стандартное отклонение. Результаты считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучена генерация АФКХ нейтрофилами крыс при прогрессировании ЛАГ. Интенсивность усиленной люминолом (ЛюмХЛ) или люцигенином ХЛ (ЛюцХЛ) отражает концентрацию различных типов АФКХ в модельных и клеточных системах. Люминол известен как ХЛ-индикатор всех типов АФКХ, однако более эффективно он окисляется хлорноватистой кислотой [13]. В то же время люцигенин окисляется преимущественно супероксидными анион-радикалами (O_2^-) [14]. Изменение интегральной интенсивности ЛюмХЛ ($\Sigma I_{\text{ЛюмХЛ}}$) и ЛюцХЛ ($\Sigma I_{\text{ЛюцХЛ}}$) нейтрофилов крыс с ЛАГ и контрольной группы показаны на рис. 1, а и б. Как видно из рис. 1, а, общий выход нейтрофильных АФКХ по сравнению с контролем был значительно снижен в 2-недельной группе и умеренно снижен в 4- и 6-недельных группах животных. К 8-й неделе прогрессирования заболевания отмечалось увеличение (в 2,3 раза) продукции АФКХ нейтрофилами. Прогрессирование ЛАГ приводило к уменьшению интенсивности ЛюцХЛ и, как следствие, продукции супероксидных анион-радикалов в нейтрофилах крыс через 2 или 4 нед после инъекции МКТ с последую-

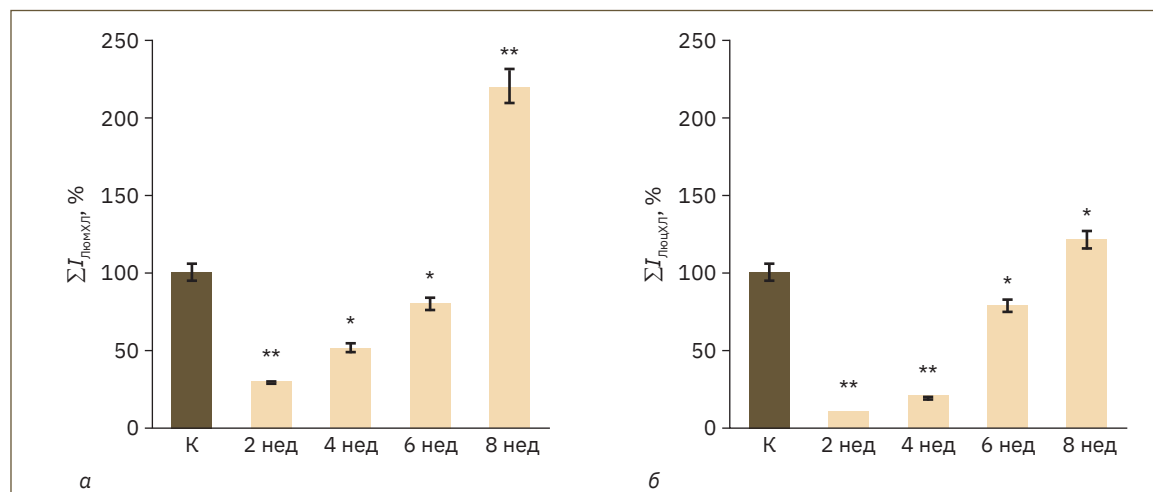


Рис. 1. Генерация АФКХ нейтрофилами здоровых (К) и больных животных на разных стадиях развития ЛАГ: а — образование преимущественно хлорноватистой кислоты (ЛюмХЛ); б — продукция супероксидных анион-радикалов (ЛюцХЛ) клетками. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению с контролем (К)

Таблица 1.
Ингибиторный анализ генерации АФКХ нейтрофилами

Молекулярная мишень	Ингибитор	Контроль	2 нед	4 нед	6 нед	8 нед
		I_i/I_0 , %	$I_{\text{ЛАГ}}/I_{\text{ЛАГ}}$, %			
МПО	АВАН	20±10 ^{##}	32±7*	38±10*	42±7*	59±6*
ЦОГ 1/2	Аспирин	31±9 ^{##}	74±13*	49±8*	41±8	20±11*
ФИЗК	LY294002	70±12 [#]	132±15*	88±9*	125±12 ^{**}	99±8 ^{**}

Примечание. I_0 и $I_{\text{ЛАГ}}$ — интегральные интенсивности ЛюмХЛ в контрольных образцах и образцах с ЛАГ; I_i и $I_{\text{ЛАГ}}$ — интегральные интенсивности ЛюмХЛ в присутствии ингибиторов; I_i/I_0 — отношение интегральных интенсивностей ЛюмХЛ в присутствии и в отсутствие ингибиторов для здоровых животных; $I_{\text{ЛАГ}}/I_{\text{ЛАГ}}$ — отношение интегральных интенсивностей ЛюмХЛ в присутствии и в отсутствие ингибиторов для животных с ЛАГ. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение; [#] $p < 0,05$ и ^{##} $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим контролем в отсутствие ингибитора, * $p < 0,05$ и ** $p < 0,1$ по сравнению с соответствующим параметром группы ЛАГ в отсутствие ингибитора.

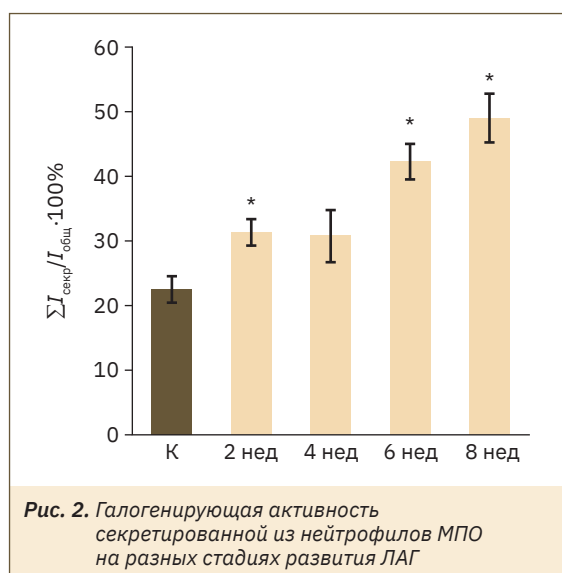


Рис. 2. Галогенирующая активность секретированной из нейтрофилов МПО на разных стадиях развития ЛАГ

ющим умеренным увеличением через 6 нед и значительным повышением (на 20%) через 8 нед (см. рис. 1, б).

Для выявления механизмов образования АФКХ в нейтрофилах крыс с МКТ-индуцированной ЛАГ использовали следующие специфические ингибиторы: АВАН, аспирин и LY294002. Данные, представленные в таблице 1, показывают, что после добавления АВАН к нейтрофилам здоровых животных интегральная интенсивность ЛюмХЛ снизилась до 20±10% от контрольного значения (в отсутствие ингибитора). Однако в обработанных АВАН нейтрофилах крыс, которым вводили МКТ, снижение продукции АФКХ менее выражено при прогрессировании ЛАГ: продукция АФКХ снижается до 32±7, 38±10, 42±7 и 59±6% в группах для 2, 4, 6 и 8-й недели соответственно. Таким образом, наблюдается тенденция к снижению вклада МПО в генерацию АФКХ нейтрофилами животных с ЛАГ. Ингибирование циклооксигеназы 1/2 также приводило к снижению выхода АФКХ в нейтрофилах. Как следует из анализа результатов, представленных в таблице 1, генерация АФКХ клетками, обработанными аспирином, через

2 нед после введения МКТ повышалась более чем в 2 раза, затем снижалась и была ниже контрольного уровня через 8 нед прогрессирования ЛАГ.

Участие РІЗК в продукции свободных радикалов нейтрофилами крыс с ЛАГ имеет сложный характер. Ингибирование ФИЗК способствовало повышению продукции АФКХ во всех группах животных с ЛАГ. В контрольных образцах добавление ингибитора ФИЗК приводило к снижению выхода АФКХ до 70±12%, что свидетельствует о значительном вкладе этого фермента в образование АФКХ. В 2- и 6-недельных группах LY294002 вызывал повышение общей интенсивности ЛюмХЛ. Через 8 нед после инъекции МКТ ФИЗК, вероятно, не была вовлечена в образование АФКХ нейтрофилами. Анализ результатов, полученных с помощью ингибиторов ферментов, вовлеченных в процессы внутриклеточной сигнализации при формировании «дыхательного взрыва» нейтрофилов, свидетельствует, что прогрессирование ЛАГ со 2-й по 8-ю неделю сопровождается снижением вклада МПО, усилением роли циклооксигеназы 1/2 и модификацией передачи сигналов ФИЗК при генерации АФКХ нейтрофилами.

С интенсификацией процессов трансдукции активационного сигнала в клетках связывают повышение концентрации свободных ионов кальция в цитозоле ($[Ca^{2+}]_i$) [15]. Мы исследовали уровень $[Ca^{2+}]_i$ в цитозоле нейтрофилов здоровых и больных крыс через 2 нед после индуцирования ЛАГ с помощью МКТ. Было показано, что $[Ca^{2+}]_i$ в клетках здоровых крыс составляет 296±24 нМ. Через 2 нед после инъекции МКТ этот параметр увеличился в 2,5 раза (до 729±69 нМ), что указывает на активацию процессов кальцийзависимой внутриклеточной сигнализации.

На рис. 2 приведены значения интенсивности ХЛ, отражающие уровень образования НОСІ под действием МПО, секретированной из нейтрофилов во внеклеточную среду после их стимуляции адгезией в течение 30 мин. Данный параметр характеризует галогенирующую ак-

тивность МПО [11]. Как видно на рис. 2, через 2 и 4 нед после инициирования ЛАГ наблюдалось небольшое увеличение продукции НОС1 в внеклеточной среде. Через 6 и 8 нед уровень НОС1 был повышен на 100–150%. Эти данные показывают, что прогрессирование ЛАГ сопровождается усилением процессов секреторной дегрануляции нейтрофилов, в результате чего из клеток во внеклеточную среду высвобождается больше МПО.

Заключение

Полученные данные указывают на важную роль нейтрофилов в развитии воспаления в МКТ-индуцированной ЛАГ. Изменение продукции АФКХ нейтрофилами крыс в динамике ЛАГ свидетельствует о модификации функциональной активности этих клеток, что выражается в усиливающейся преактивации (прайминге), сопряженной с нарушением кальцийзависимых процессов трансдукции активационного сигнала с участием МПО, циклооксигеназы 1/2 и ФИЗК. При этом через 2–8 нед после индуцирования ЛАГ в результате нарастающей секреторной дегрануляции наблюдается увеличение выхода из нейтрофилов важнейшего медиатора воспаления фермента МПО, который катализирует реакцию образования НОС1 и, как следствие, является потенциальным индуктором оксидативного/галогенирующего стресса в организме.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Galiè N., Hoepfer M.M., Humbert M. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension // *Eur. Respir. J.* 2009. Vol. 34. N. 6. P. 1219–1263. DOI: 10.1183/09031936.00139009.
2. El Chami H., Hassoun P.M. Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension // *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2012. Vol. 55. N. 2. P. 218–228. DOI: 10.1016/j.pcad.2012.07.006.
3. Tang C., Luo Y., Li S. et al. Characteristics of inflammation process in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats // *Biomed Pharmacother.* 2021. Vol. 133. P. 111081. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.111081.
4. Touyz R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? // *Hypertension.* 2004. Vol. 44. P. 248–252. DOI: 10.1161/01.HYP.0000138070.47616.9d.
5. Rafikova O., Al Ghoulé I., Rafikov R. Focus on early events: pathogenesis of pulmonary arterial hypertension development // *Antioxid. Redox. Signal.* 2019. Vol. 31. N. 13. P. 933–953. DOI: 10.1089/ars.2018.7673.
6. Arnhold J. The dual role of myeloperoxidase in immune response // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. P. 8057. DOI: 10.3390/ijms21218057.
7. Hawkins C.L., Pattison D.I., Davies M.J. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins // *Amino Acids.* 2003. Vol. 25. N. 3–4. P. 259–274. DOI: 10.1007/s00726-003-0016-x.
8. Padrez Y., Golubewa L., Kulahava T. et al. Quantitative and qualitative analysis of pulmonary arterial hypertension fibrosis using wide-field second harmonic generation microscopy // *Scientific reports.* 2022. Vol. 12. N. 1. P. 7330. DOI: 10.1038/s41598-022-11473-5.
9. Wilson D.W., Segall H.J., Pan L.C. et al. Mechanisms and pathology of monocrotaline pulmonary toxicity // *Crit. Rev. Toxicol.* 1992. Vol. 22. P. 307–325. DOI: 10.3109/10408449209146311.
10. Bøyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages // *Scand. J. Immunol.* 1976. Suppl. 5. P. 9–15.
11. Kavalenka A.I., Semenkova G.N., Cherenkevich S.N. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro // *Cell Tissue Biol.* 2007. Vol. 1. N. 6. P. 551–559.
12. Patel A., Hirst R.A., Harrison C. et al. Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in whole cell suspensions using fura-2 // *Methods Mol. Biol.* 2013. Vol. 937. P. 37–47. DOI: 10.1007/978-1-62703-086-1_2.
13. Рощупкин Д.И., Белакина Н.С., Мурина М.А. Усиленная люминолом хемилюминесценция полиморфноядерных лейкоцитов кролика: природа оксидантов, непосредственно вызывающих окисление люминола // *Биофизика.* 2006. Т. 51. № 1. С. 99–107. [Roshchupkin D.I., Belakina N. S., Murina M.A. Luminol-enhanced chemiluminescence of rabbit polymorphonuclear leukocytes: the nature of oxidants directly responsible for luminol oxidation // *Biophys.* 2006. Vol. 51. N. 1. P. 99–107. (In Russ.)].
14. Li Y., Zhu H., Kuppasamy P. Roubaud V., Zweier J.L., Trush M.A. Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. N. 4. P. 2015–2023. DOI: 10.1074/jbc.273.4.2015.
15. Immler R., Simon S.I., Sperandio M. Calcium signaling and related ion channels in neutrophil recruitment and function // *Eur. J. Clin. Invest.* 2018. Vol. 48. P. e12964. DOI: 10.1111/eci.12964.

Информация об авторах

Г.Н. Семенкова¹, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, galina_semenkova@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0001-6048-4383>

И.Э. Адзерихо¹, доктор медицинских наук, профессор, <https://orcid.org/0000-0001-6572-8842>

Н.В. Амаэгбери², кандидат биологических наук, научный сотрудник, <https://orcid.org/0000-0001-8907-867X>

Т.Э. Владимирская¹, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, <https://orcid.org/0000-0002-0777-192X>

О.Н. Яцевич¹, научный сотрудник, <https://orcid.org/0000-0001-8633-2628>

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования, 220013, ул. Бровки, д. 3, Минск, Беларусь.

² Белорусский государственный университет, 220030 пр-т Независимости, д. 4, Минск, Беларусь.

Information about the authors

G.N. Semenкова¹, PhD (Biology), associate professor, leading researcher, galina_semenkova@yahoo.com, <https://orcid.org/0000-0001-6048-4383>

I.E. Adzerikho¹, PhD, MD (Medicine), professor, <https://orcid.org/0000-0001-6572-8842>

N.V. Amaegberi², PhD (Biology), researcher, <https://orcid.org/0000-0001-8907-867X>

T.E. Vladimirskaia¹, PhD (Biology), associate professor, leading researcher, <https://orcid.org/0000-0002-0777-192X>

O.N. Yatsevich¹, researcher, <https://orcid.org/0000-0001-8633-2628>

¹ Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Brovki st., 3, 220013, Minsk, Belarus.

² Belarusian State University, Nezavisimosti Ave., 4, 220030, Minsk, Belarus.

Вклад авторов в написание статьи

Г.Н. Семенкова — концепция и дизайн исследования, написание текста статьи.

И.Э. Адзерихо — концепция и дизайн исследования.

Н.В. Амаэгбери — получение, обработка экспериментальных данных.

Т.Э. Владимирская — получение, обработка, анализ экспериментальных данных.

О.Н. Яцевич — получение, обработка экспериментальных данных.

Все авторы прочитали окончательную версию рукописи и согласились с ней.

Сведения о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дата поступления рукописи в редакцию: 16.10.2023

Дата рецензии статьи: 01.11.2023

Дата принятия статьи к публикации: 09.11.2023

Authors contribution

G.N. Semenкова — concept and design of the study, writing the text of the article.

I.E. Adzerikho — concept and design of the study.

N.V. Amaegberi — obtaining and processing experimental data.

T.E. Vladimirskaia — obtaining, processing, analysis of experimental data.

O.N. Yatsevich — obtaining and processing experimental data.

All authors read and agreed to the final version of the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Received: 16.10.2023

Reviewed: 01.11.2023

Accepted for publication: 09.11.2023