

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-092

Темнов А.А.¹, Волкова А.Г.¹, Мелерзанов А.В.², Новоселов В.И.¹

Эффект кондиционированной среды, полученной из культивированных мезенхимальных стволовых клеток, на регенерацию эндотелия при HCl-индуцированном повреждении трахеи у крыс

¹ ФГБУН «Институт биофизики клетки РАН», 142292, Московская область, г. Пущино, Россия, ул. Институтская, д. 3

² МФТИ, 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Россия, Институтский пер., д. 9

Цель — изучение регенерации респираторного эпителия крысы при ингаляционной травме трахеи парами соляной кислоты. **Методика.** Активация процессов регенерации проводилась после химического ожога путем аппликации в трахею кондиционированной среды, полученной при культивировании аллогенных мезенхимальных стволовых клеток (кМСК). **Результаты.** Показано, что на 3-и 7-е сут. после аппликации препарата кМСК эпителий трахеи практически полностью восстанавливается. При этом в процессе регенерации в подслизистом слое эпителия образуются замкнутые структуры, содержащие цилиарные клетки, аналогичные реснитчатым клеткам респираторного эпителия трахеи. Эти структуры мигрируют в сторону эпителия и встраиваются в пораженный эпителий. Заключение. Показано, что препарат кМСК, введенный непосредственно в трахею в ранние сроки после повреждения, способствует восстановлению нормального подслизистого слоя. Было отмечено снижение выраженности воспаления, ускорение темпов миграции цилиарных клеток к поверхности трахеи и формирование реснитчатого эпителия de novo.

Ключевые слова: трахея, HCl-индуцированная травма, мезенхимальные стволовые клетки; кондиционированная среда; эндотелий.

Для цитирования: Темнов А.А., Волкова А.Г., Мелерзанов А.В., Новоселов В.И. Эффект кондиционированной среды, полученной из культивированных мезенхимальных стволовых клеток, на регенерацию эндотелия при HCl-индуцированном повреждении трахеи у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2017; 61(2): 28–36.

DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.28-36

Для корреспонденции: Темнов Андрей Александрович, доктор мед. наук, вед. науч. сотр. Институт биофизики клетки РАН, e-mail: aa-temnov@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта: Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», РФФИ 15-04-04021 и 15-04-04009.

Поступила 05.12.2016

Temnov A.A.¹, Volkova A.G.¹, Melerzanov A.V.², Novoselov V.I.¹

Effect of conditioned medium from mesenchymal stem cells on regeneration of endothelium at HCl-induced damage trachea in rats

¹ Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya st. 3, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology 9 Institutsky Pereulok, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia, 141707

The purpose. Respiratory epithelium regeneration is studied in rats with tracheal damage induced by inhaling hydrochloric acid vapor. **Method.** Regeneration process after the chemical burn was activated by intratracheal administration of preparations obtained from the same-species mesenchymal stem cells (MSC). **Results.** Tracheal epithelium is shown to recover almost completely on day 3–7 after applying MSC compositions (MSCs). Closed structures containing ciliated cells similar to ciliated cells of the respiratory epithelium lining the trachea are formed in the submucosal epithelium during regeneration. These structures migrate towards epithelium and get incorporated into the damaged epithelium. This phenomenon is apparently indicative of the special mechanism of respiratory epithelium regeneration after HCl-induced injury. **Conclusion.** It is demonstrated in this study that cell-free MSCs instilled intratracheally promote the recovery of normal submucosal epithelium by either preventing or reducing necrosis and inflammation. Such topical MSCs administration significantly accelerates migration of ciliated cell towards the surface and de novo formation of the ciliary epithelium.

Keywords: trachea; HCl-induced damage; conditioned medium; mesenchymal stem cells; endothelium.

For citation: Temnov A.A., Volkova A.G., Melerzanov A.V., Novoselov V.I. Effect of conditioned medium from mesenchymal stem cells on regeneration of endothelium at HCl-induced damage trachea in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal).* 2017; 61(2): 28–36. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2017.02.28-36

For correspondence: Temnov Andrey, Doctor Med of Science aa-temnov@yandex.ru

Acknowledgement. The study is performed under the grant Presidium of the RAS «Molecular and Cellular Biology» and RFBR-supported grant: №15-04-04009 and 15-04-04021.

Received 05.12.2016

Введение

Острое повреждение легких может быть опосредовано как патологическими процессами, протекающими непосредственно в легочной ткани (пневмония или хроническая обструктивная болезнь легких), так и воздействием внелегочных факторов [1, 2]. Сепсис, массивная гемотрансфузия, аспирация желудочного содержимого может привести к фатальным осложнениям и прежде всего к острому респираторному дистресс-синдрому [3]. Аспирация содержимого желудка может произойти как во время операции при проведении анестезии, так и при приеме ряда фармакологических средств, наркотиков или алкоголя. При этом HCl является одним из главных патогенетических факторов, определяющих степень повреждения легочной ткани [4].

В действии соляной кислоты можно выделить две фазы. Вначале происходит непосредственно химическое повреждение эндотелия трахео-бронхиального дерева, гибель цилиарных и базальных клеток. На втором этапе наблюдается потеря сурфактанта, миграция нейтрофилов, гиперпродукция NO и провоспалительных цитокинов, активация перекисного окисления липидов [5—6]. Все эти процессы приводят к отеку, повреждению альвеол, и как следствие — к вентиляционно-перфузионному дисбалансу.

Несмотря на то, что клиническая и гистологическая картина повреждения трахеи при химическом ожоге хорошо изучены, остаются не до конца ясными процессы повреждения эндотелия верхних дыхательных путей, механизмы и сроки регенерации при HCl-индуцированной аспирационной травме. Особый интерес представляет изучение факторов, которые могут ускорить процесс заживления аспирационной травмы и восстановления функции реснитчатого эпителия трахеи после ожога.

Как было показано ранее, потенциальными агентами, ускоряющими процесс регенерации ткани, могут стать паракринные факторы, продуцируемые мезенхимальными стволовыми клетками [29]. К настоящему времени имеется достаточно наблюдений подтверждающих их регенераторный и противовоспалительный эффект [7]. Однако в доступной литературе мы не нашли достоверных данных, доказывающих возможность ингаляционного использования препаратов, полученных из стволовых клеток, для ускорения процессов регенерации эпителия трахеи после HCl-индуцированного ожога.

Цель — изучение возможности использования факторов, синтезируемых стволовыми клетками, на процесс регенерации эпителия трахеи после ингаляции HCl.

Методика

Животные

В экспериментах использовали крыс-самцов «Вистар» массой 200 г. Эксперименты проводились под наркозом в соответствии с требованиями к гуманному обращению с животными.

Химический ожог верхних дыхательных путей

Химический ожог верхних дыхательных путей вызывали выдерживанием животного в атмосфере насыщенных паров соляной кислоты. Животных наркотизировали внутривенным введением золотила (5 мг/кг) и рометара (10 мг/кг) и помещали в эксикатор (объем 10 литров, температура воздуха 20°C) с насыщенными парами HCl на 15 мин.

Получение стволовых клеток костного мозга

Для получения кондиционированной среды использовали аллогенные мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые получали из костного мозга бедренной кости крысы, находящейся под общим наркозом. Мононуклеарную фракцию клеток костного мозга выделяли центрифугированием в градиенте плотности с использованием стандартного раствора Lympholyte-H (фирма Cedarlane, Canada). Полученную суспензию мононуклеарных клеток высевали на чашки Петри и культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Антибиотики в процессе культивирования не применялись.

Для подтверждения того, что используемые клетки обладают свойствами МСК, была проведена их остеогенная, хондрогенная и адипогенная дифференцировка по стандартной методике [8].

Получение препаратов кМСК

После 3-го пассажа и получения клеточного монослоя проводили полную смену культуральной среды и через 3 сут. кондиционированную культуральную среду объединяли с лизатом МСК. Для получения лизата культуру клеток подвергали трем циклам замораживания-оттаивания. После объединения конди-

ционированной среды и лизата клеток полученный раствор подвергли фильтрации через мембрану с размером пор 0,22 мкм. Это обеспечивало стерилизацию и гарантировало отсутствие клеточных элементов в конечном препарате. Проведенный электрофорез показал, что в конечном препарате преимущественно содержатся белки с М.м. 50—60 кДа [29].

Оценка рН трахеи

Для оценки уровня рН слизи в отдельной группе животных, находящихся под наркозом, под контролем осветителя в трахею вводили зонд (0,5 мм) с индикаторной полоской. Измерения рН проводили каждые 10 мин в течение 30 мин.

Ингаляция препаратов МСК

Через 30 мин после ингаляции HCl, когда рН слизи достигает физиологического значения, животное, находящееся в состоянии наркоза, фиксировали в станке и с помощью расширителя ротовой полости обеспечивали доступ в трахею. Препараты кМСК вводили в трахею в момент вдоха с помощью зонда с микроосветителем. Объем вводимого раствора — 200 мкл, концентрация белков 10 мг/мл.

Контрольные животные получали ингаляцию исходным раствором культуральной среды с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Антибиотики в ингаляционные препараты не добавляли.

Гистология и иммуногистохимия

Для гистологического исследования последствий химического ожога выделяли среднюю часть трахеи, полученные образцы фиксировали в фиксаторе «Minsky's Fixative» (National Diagnostics, USA) в течение 24 ч. Парафиновые срезы толщиной 2 мкм получали на микротоме Thermo scientific micron HM 325, Германия. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Для иммуногистохимических исследований в качестве первичных антител использовались моноклональные антитела против α -тубулина (Cell Signaling Technology, USA), Krt5 (Covance, USA), CCSP (Chemicon, USA); включение антител в клетки оценивалось после инкубации срезов с вторичными антителами к мышиным IgG конъюгированными с щелочной фосфатазой (Abcam, USA).

Результаты и обсуждение

Уровень рН в трахее после ингаляции HCl. Анализ рН слизи трахеи показал, что сразу после ожога насыщенными парами соляной кислоты (в пределах 5 мин) рН принимает очень низкие значения (2—2,5), что и является основным поражающим фактором при ожогах такого типа. В течение 30 мин происходит возвращение рН к нормальному значению (рН 7.3).

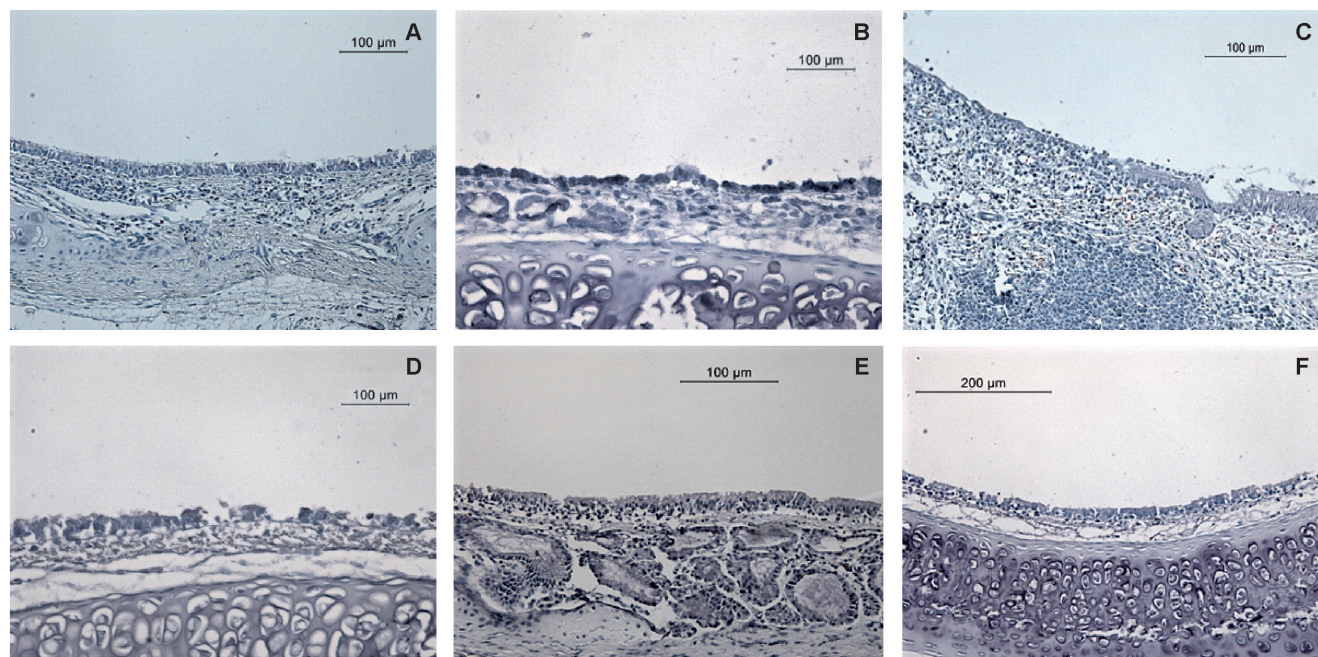


Рис. 1. Регенерация респираторного эпителия крысы после ингаляционной травмы парами соляной кислоты: А — нормальный респираторный эпителий трахеи; В — эпителий крысы через сутки после химического ожога; сохраняются в основном бокаловидные клетки; С — наличие фагоцитов в подслизистом слое после химического ожога (3 день после ожога); D — регенерация эпителия после химического ожога (7 суток после ожога); E — регенерация эпителия после химического ожога и аппликации кМСК (3 суток после ожога); F — регенерация эпителия после химического ожога и аппликации кМСК (7 суток после ожога).

*Влияние ингаляции HCl
на эпителиальный слой трахеи*

В норме слизистая оболочка трахеи выстлана многоядерным призматическим реснитчатым эпителием, в котором различают реснитчатые, бокаловидные и базальные клетки (рис. 1, А). Химический ожог в контрольной группе приводит к значительным разрушениям, причем гибель клеток эпителия трахеи после химического ожога в основном идет по пути некроза и через 24 ч после ожога приблизительно 50—70% поверхности эпителия остается поврежденным. При этом в основном гибнут реснитчатые клетки, что, по-видимому, связано с большой поверхностью ресничек, локализованных в слизи эпителия трахеи (рис. 1, В). Степень повреждения остается приблизительно такой же на 3-и сут. после ожога, кроме того, у некоторых животных наблюдается скопление в трахее макрофагов, что свидетельствует о развитии воспалительного процесса (рис. 1, С). Видимая регенерация эпителия трахеи наблюдается на 7-е и 14-е сут. после ожога (рис. 1, D).

Влияние ингаляции препарата, полученного из культивированных МСК, на состояние эпителия трахеи после HCl-индуцированной травмы

Принципиально другая гистологическая картина наблюдается после аппликации (через 30 мин после химического ожога) на обожженную трахею кондиционированной среды, полученной при культивировании МСК. Морфологический анализ структуры в опытной группе через 3 сут. после ожога показал, что эпителий трахеи в значительной степени сохранен, в эпителии

присутствуют реснитчатые клетки, отсутствующие при ожоге у контрольных животных, что свидетельствует об интенсивных регенеративных процессах после аппликации препарата кМСК (рис. 1, Е); через 7 сут. после ожога наблюдается полное восстановление эпителия (рис. 1, F). Таким образом, аппликация в поврежденную трахею препарата кМСК существенно ускоряет процессы регенерации эпителия трахеи после химической ингаляционной травмы.

Изучение проникновения экзогенных белков при HCl-индуцированном повреждении трахеи

Для определения глубины проникновения белков в поврежденную ткань трахеи были проведены опыты с ингаляцией раствора альбумина, меченого FITC, что имитирует проникновение высокомолекулярных белковых компонентов в стенку поврежденной трахеи. Анализ проводили через 30 мин после аппликации альбумина-FITC. Было показано, что в случае поврежденной трахеи альбумин локализовался только в самом эпителии, не доходя до подслизистого слоя (рис. 2, А). В случае HCl-индуцированной травмы трахеи меченый белок обнаруживался также в подслизистом слое, проникая через базальную мембрану (рис. 2, В).

*Влияние ингаляции HCl
на базальные клетки трахеи*

Основную роль в физиологической регенерации эпителия трахеи играют базальные клетки (рис. 3, А), которые способны пролиферировать и дифференцироваться в реснитчатые и секреторные клетки эпи-

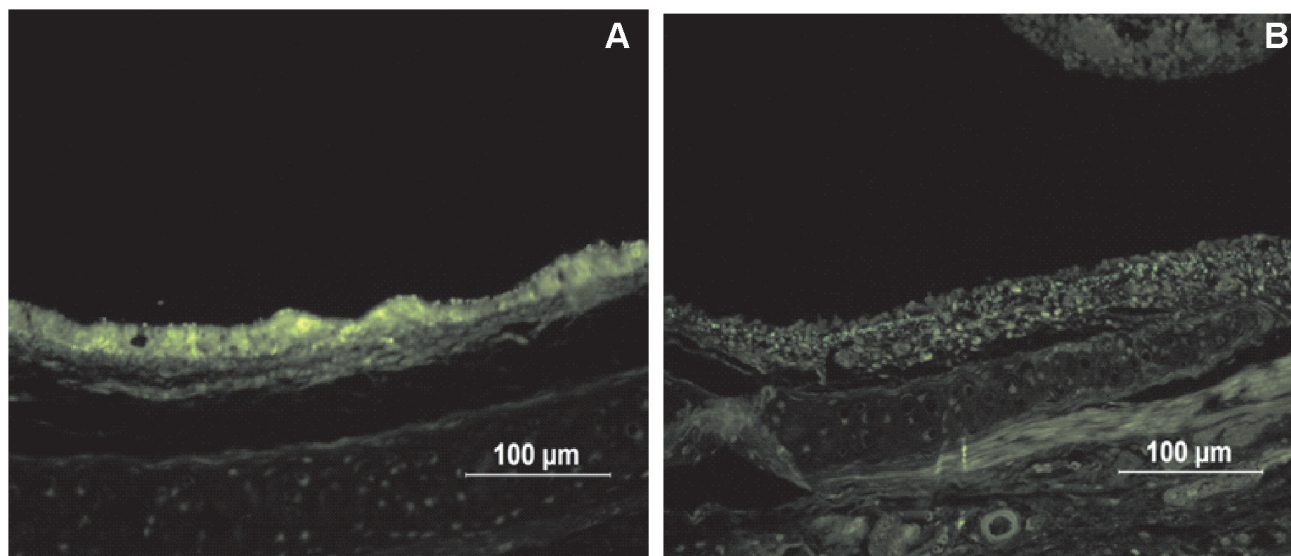


Рис. 2. Распределение FITC-меченого альбумина в респираторном эпителии при его аппликации в трахею:

А — аппликация в нормальный эпителий, В — аппликация в обожженный эпителий. Анализ проводили через 30 минут после аппликации FITC-меченого альбумина.

теля трахеи. Ингаляция препарата, полученного при культивировании МСК, обеспечивает частичную сохранность базальных клеток на поверхности трахеи (рис. 3, В). Сохранившиеся базальные клетки могут, во-видимому, принимать участие в последующей регенерации, дифференцируясь в цилиарные клетки.

Влияние препарата кМСК на подслизистый слой трахеи после HCl-индуцированной травмы

Во время микроскопического исследования тканей трахеи при аппликации препарата кМСК было обнаружено, что в подслизистом слое трахеи образуются замкнутые структуры эпителиальной природы, которые в нормальной ткани не наблюдались. Появляются они в 1-е сут. после ожога при аппликации кМСК, затем их количество увеличивается и достигает максимума на 3-и и 4-е сут. (рис. 4, А). В последующем число структур уменьшается и к 7-м и 8-м сут. обнаружить их в подслизистом слое практически невозможно. Отличительной особенностью структур, выявленных в подслизистом слое является то, что они выстланы клетками с ресничками, которые аналогичны реснитчатым клеткам эпителия (рис. 5). Структуры выстланы клетками по составу схожими с воздухоносным эпителием трахеи. Следует отметить, что такие реснитчатые клетки наблюдались как в больших, так и в маленьких по размеру замкнутых структурах в подслизистом слое.

Для выяснения вопроса, что является предшественником данных структур, были проведены исследования на выявление в подслизистом слое базальных клеток и клеток Клара, которые могут дифференцироваться в другие клетки эпителия. Нам не удалось обнаружить базальные клетки, однако клетки Клара

были довольно широко представлены в подслизистом слое (рис. 6). В то же время в уже сформировавшихся везикулярных структурах клеток Клара не было обнаружено. Мы предполагаем, что клетки Клара являются предшественниками клеток, из которых образуются данные структуры. Как уже отмечалось, максимальное количество замкнутых структур в подслизистом слое эпителия наблюдается на 3-и и 4-е сут. после ожога и аппликации кМСК к концу 7-х сут. они исчезают. В это же время эти структуры обнаруживаются вблизи базальной мембраны с последующим их встраиванием в респираторный эпителий, где формируют новый участок эпителия (рис. 4, С, D). Этот процесс заканчивается к 7-м сут. регенерации эпителия после химического ожога с последующей аппликацией препарата кМСК.

Процесс регенерации эпителия дыхательных путей при остром повреждении зависит от ряда факторов, в том числе от интенсивности воздействия повреждающего фактора, вида патогенного агента и от зоны повреждения (трахея, бронхи, альвеолы). Данные различия вызваны, прежде всего, особенностями анатомического строения разных отделов дыхательных путей. В трахее псевдомногослойный эпителий состоит из реснитчатых клеток (маркерами которых выступают *b-Tubulin* и *Foxj1*), клубных (*club*) клеток или клеток Клара (экспрессируют *Scgb1a1* и *Muc5B*), бокаловидных клеток (маркерами являются *Scg1a1*, *Muc5B*, *Muc5A/C*, *Spdef*) и базальных клеток, экспрессирующих *transformation-related protein 63 (p63)*, цитокератин 5 и/или 14 [9—14]. Между эпителиальным слоем и хрящевой тканью расположены железы, секретирующие слизь в просвет трахеи. Было показано, что эти железы содержат дуктальные клетки,

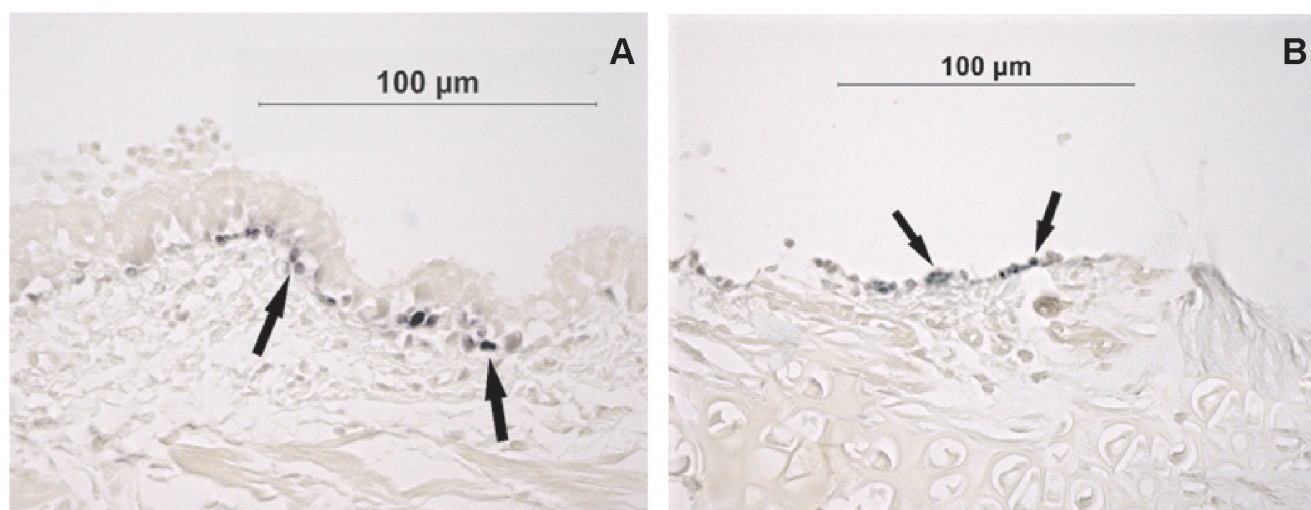


Рис. 3. Локализация базальных клеток: А — интактная трахея; В — трахея через 1 час после ингаляции HCl и аппликации кМСК. Выявление базальных клеток с помощью антител к Krt5. Видна сохранность базальных клеток после ожога.

экспрессирующие цитокератин (Кrt 5 и Кrt 14). Эти клетки обладают способностью восстанавливать все типы клеток и участвуют в регенерации при сильных (фатальных) повреждениях эпителия, вызванных, на-

пример, ишемией или в результате трансплантации трахеи [15—16].

Показано, что при воздействии химических агентов (таких, как SO_2 , HCl , нафталин), происходит

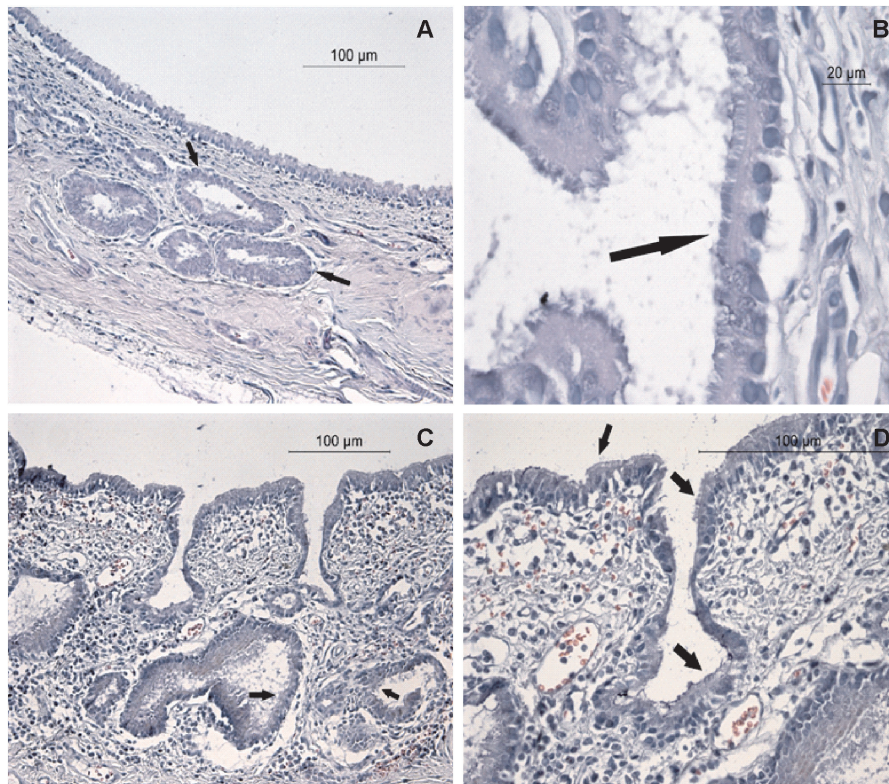


Рис. 4. Появление замкнутых структур в подслизистом слое эпителия трахеи:

А — 3 суток после ингаляции HCl и аппликации препарата КМСК. В — реснитчатый эпителий. Стрелкой показаны реснички на поверхности клетки. С, D — встраивание везикул в эпителиальный слой. Стрелкой показаны реснички на поверхности клетки.

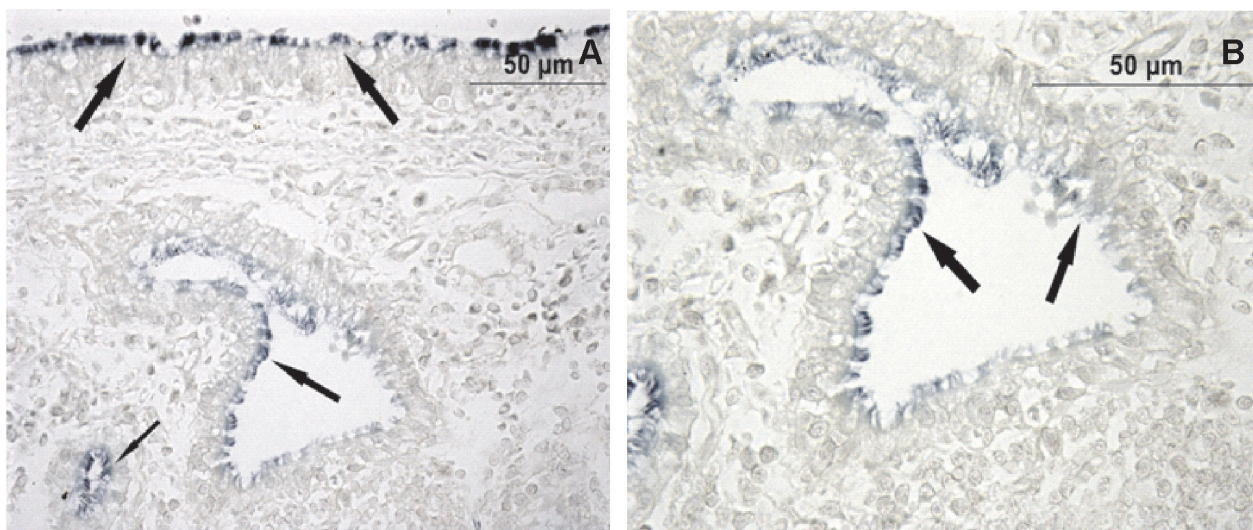


Рис. 5. Выявление реснитчатых клеток в новообразованных замкнутых структурах в подслизистой эпителия трахеи. Выявление реснитчатых клеток с помощью антител к α -тубулину:

А — увеличение $\times 20$; В — увеличение $\times 40$. Стрелкой показаны реснички на поверхности клетки.

повреждение реснитчатого эпителия, но при этом частично сохраняются клубные клетки Клара, базальные клетки, участвующие в процессе регенерации, в результате которой восстанавливаются реснитчатые и бокаловидные клетки (без участия дуктальных стволовых клеток) [11, 17—20].

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что препараты, полученные из культивированных стволовых клеток, проникают через базальную мембрану в подслизистый слой и активируют пролиферацию и дифференцировку дуктальных клеток, в конечном итоге приводя к ускоренной регенерации эпителия, что не типично для такой незначительной степени повреждения, которую вызывает ингаляция HCl в контрольном эксперименте, т.е. без обработки травмы препаратом кМСК.

Роль мезенхимальных стволовых клеток в процессе регенерации эпителия трахеи было показано во многих работах. Так, используя в качестве метки Y-хромосому или GFP, было продемонстрировано, что МСК костного мозга участвуют в восстановлении эпителия проксимальных и дистальных отделов дыхательных путей [22]. Однако степень интернализации МСК в ткань легкого была крайне низкая. По разным данным, она составляет от 1 до 14% [21—22]. Интратрахеальное введение МСК на модели ЛПС-индуцированного повреждения легких у мышей показало, что трансплантированные клетки снижают уровень TNF и MIP-2 и повышают концентрацию ИЛ-10 в лаважной жидкости. Это приводило к статистически значимому повышению выживаемости животных (80% против 42%) и снижению уровня

отека легких. Несмотря на то, что менее 5% МСК задерживается в ткани легкого, их интратрахеальное введение обладает значимым терапевтическим эффектом [22]. Аналогичные данные были получены при внутривенном введении МСК животным с блеомидин-индуцированной легочной недостаточностью [23—24]. Выраженный терапевтический эффект, полученный, несмотря на низкое содержание МСК в ткани легкого (<1%), говорит о преимущественном паракринном механизме действия МСК.

Паракринный механизм воздействия МСК на процесс острого повреждения легкого под действием ЛПС также подтверждается экспериментами с использованием системы Transwell, в которых отсутствовал прямой контакт между альвеолярными макрофагами и МСК. Было показано, что ЛПС индуцирует продукцию МСК факторов, регулирующих синтез провоспалительных цитокинов альвеолярными макрофагами [22].

Следует отметить важную роль ИЛ6, который стимулирует, а ингибиторы STAT3 тормозят регенерацию реснитчатых клеток. Передача сигнала ИЛ6/STAT3 способствует активации генов и увеличивает экспрессию FoxJ1 протеина, являющегося маркером реснитчатых клеток. В то же время ингибирование сигнального пути через STAT3 приводит к увеличению секреторных и базальных клеток. При травме у IL-6 null мышей образуется меньше реснитчатых клеток и больше секреторных клеток [25]. Эффект ускорения регенерации эпителия трахеи у животных после HCl-индуцированной травмы под действием препарата кМСК можно объяснить, по-види-

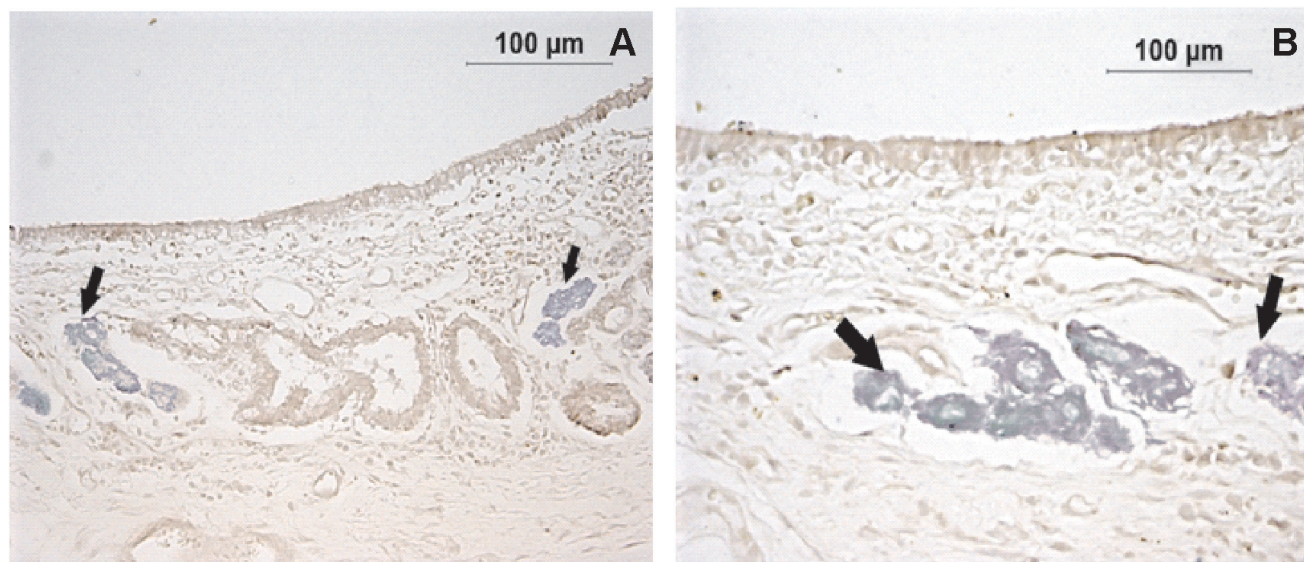


Рис. 6. Выявление клеток Клара в новообразованных замкнутых структурах в подслизистой эпителии трахеи. Выявление клубных клеток с помощью антител к CCSP: А — увеличение x20; В — увеличение x40. Стрелкой показаны клубные клетки.

тому, кроме упомянутого выше эффекта ускорения пролиферации и дифференцировки дуктальных стволовых клеток, также протективным действием цитокинов и ростовых факторов содержащихся в препарате кМСК на поверхностные базальные клетки эпителия трахеи. На наш взгляд, в частности, один из ключевых механизмов защитного эффекта МСК может быть связан с активностью VEGF [26], обладающего антиапоптатическим и противовоспалительным действием. С другой стороны, важное значение может иметь также присутствие ИЛ-6. Данный цитокин при ингаляционном пути введения оказывает противовоспалительный эффект, снижая уровень цитокинов при воспалении легких, вызванном интратрахеальным введением LPS [27].

В проведенных ранее работах, нами было показано, что в процессе культивирования МСК выделяют большое количество паракринных факторов в среду культивирования. Предварительные данные масс-спектрометрии показали наличие в полученной нами кондиционированной среде более 600 биологически активных факторов. При иммуноферментном анализе ряда факторов (VEGF, ИЛ-6, ИЛ-8) было показано, что их концентрация в течение 3 сут. существенно повышается в среде культивирования по сравнению с исходной средой, содержащей 10% ЭТС (VEGF — 1780 пг/мл (2,3 пг/мл); ИЛ-6 — 400 пг/мл (2,7 пг/мл) [28, 29].

Можно предположить, что данное повышение паракринных факторов в кондиционированной среде ускоряет процессы регенерации трахеи как при химической травме, так и при термическом ожоге, что было показано в предыдущих работах [29]. В отличие от контроля (ингаляция исходной среды культивирования с 10% ЭТС), у опытной группы (ингаляция препарата кМСК) в просвете трахеи после термической травмы также наблюдалось преимущественное появление реснитчатых клеток в структурах, возникающих в подслизистом слое [29]. Причиной этого может быть эффект ИЛ-6, действие которого описано в работе Т. Табокоро и соавт. [25].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что паракринные механизмы играют важную роль в процессе регенерации эпителиального слоя трахеи при острой травме. Бесклеточная кондиционированная среда, полученная при культивировании мезенхимальных стволовых клеток, открывает перспективу получения новых препаратов для эффективного лечения острых повреждений респираторного тракта. Доказанная эффективность ингаляционного использования препарата позволяет упростить процедуру его применения, повысить эффективность проникновения действующих факторов в ткани и избежать осложне-

ний, характерных для инвазивных способов введения, например при трансплантации МСК.

References

1. Chu S.J., Chang D.M., Wang D., Lin H.I., Lin S.H., Hsu K. Protective effect of U74500A on phorbol myristate acetate-induced acute lung injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 31(8) (2004), pp523-9.
2. Matthay M.A., Thompson B.T., Read E.J. et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for severe acute lung injury. *Chest.* 138(4) (2010), pp965-72. doi: 10.1378/chest.10-0518.
3. Yilmaz M.Z., Guzel A., Torun A.C. et al. The therapeutic effects of anti-oxidant and anti-inflammatory quercetin on aspiration-induced lung injury in rats. *J Mol Histol.* 45(2) (2014), pp.195-203. doi: 10.1007/s10735-013-9542-3.
4. Jian M.Y., Koizumi T., Tsushima K., Fujimoto K., Kubo K. Effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) on acid-induced lung injury in rats. *Inflammation.* 28(6) (2004), pp. 327-36.
5. Jian M.Y., Koizumi T., Tsushima K., Kubo K. JTE-607, a cytokine release blocker, attenuates acid aspiration-induced lung injury in rats. *Eur J Pharmacol.* 19; 488(1-3) (2004), pp. 231-8.
6. Jian M.Y., Koizumi T., Kubo K. Effects of nitric oxide synthase inhibitor on acid aspiration-induced lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther.* 18(1) (2005), pp.33-9.
7. Khubutiya M.S., Vagabov A.V., Temnov A.A., Sklifas A.N. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury. *Cytotherapy.* 16(5) (2014), pp. 579-85. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.07.017.
8. Yagi H., Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N. et al. Reactive bone marrow stromal cells attenuate systemic inflammation via sTNFR1. *Mol Ther.* 18(10) (2010), pp. 1857-64. doi: 10.1038/mt.2010.155.
9. Evans M.J., Van Winkle L.S., Fanucchi M.V., Plopper C.G. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Exp Lung Res.* 27(5) (2001), pp. 401-15.
10. Zhu Y., Ehre C., Abdullah L.H. et al. Munc13-2/-/- baseline secretion defect reveals source of oligomeric mucins in mouse airways. *J Physiol.* 1;586(Pt 7) (2008), pp.1977-92. doi: 10.1113/jphysiol.2007.149310.
11. Rock J.R., Onaitis M.W., Rawlins E.L. et al.: Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 4;106(31) (2009), pp.12771-5. doi: 10.1073/pnas.0906850106.
12. Blatt E.N., Yan X.H., Wuerffel M.K., Hamilos D.L., Brody S.L. Forkhead transcription factor HFH-4 expression is temporally related to ciliogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21(2) (1999), pp.168-76.
13. You Y., Huang T., Richer E.J. et al. Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286(4) (2004), pp. 650-657.
14. Volckaert T., De Langhe S. Lung epithelial stem cells and their niches: Fgf10 takes center stage. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 8;7 (2014):8. doi: 10.1186/1755-1536-7-8.
15. Hegab A.E., Ha V.L., Gilbert J.L. et al. Novel stem/progenitor cell population from murine tracheal sub-

mucosal gland ducts with multipotent regenerative potential. *Stem Cells*. 29(8)(2011), pp. 1283-93. doi: 10.1002/stem.680.

16. Hegab A.E., Nickerson D.W., Ha V.L., Darmawan D.O., Gomperts B.N. Repair and regeneration of tracheal surface epithelium and submucosal glands in a mouse model of hypoxic-ischemic injury. *Respirology*. 17(7)(2012), pp. 1101-13. doi: 10.1111/j.1440-1843.2012.02204.x.

17. Reynolds S.D., Giangreco A., Power J.H., Stripp B.R. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol*. 156(1)(2000), pp.269-78.

18. Reynolds S.D., Hong K.U., Giangreco A. et al. Conditional clara cell ablation reveals a self-renewing progenitor function of pulmonary neuroendocrine cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 278(6)(2000), pp. 1256-63.

19. Giangreco A., Reynolds S.D., Stripp B.R. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. *Am J Pathol*. 161(1)(2002), pp. 173-82.

20. Hsu H.S., Liu C.C., Lin J.H., Hsu T.W., Su K., Hung S.C.: Repair of naphthalene-induced acute tracheal injury by basal cells depends on β -catenin. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 148(1)(2014), pp. 322-32. doi: 10.1016/j.jtcvs.2013.10.039.

21. Theise ND, Henegariu O, Grove J et al.: Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. *Exp Hematol*. 30(11)(2002), pp. 1333-8.

22. Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates en-

dotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol*. 179(3)(2007), pp.:1855-63.

23. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(14)(2003), pp. 8407-11.

24. Rojas M, Xu J, Woods CR et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 33(2)(2005), pp.145-52.

25. Tadokoro T, Wang Y, Barak LS, Bai Y, Randell SH, Hogan BL. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111(35)(2014), pp.3641-9. doi: 10.1073/pnas.1409781111

26. Kagiwada H, Yashiki T, Ohshima A, Tadokoro M, Nagaya N, Ohgushi H. : Human mesenchymal stem cells as a stable source of VEGF-producing cells. *J.Tissue Eng Regen Med*. 2(4)(2008), pp. 184-9. doi: 10.1002/term.79.

27. Bhargava R, Janssen W, Altmann C et al. Intratracheal IL-6 protects against lung inflammation in direct, but not indirect, causes of acute lung injury in mice. *PLoS One*. 8;8(5)(2013), e61405. doi: 10.1371/journal.pone.0061405.

28. M.S.Khubutiya, K.A.Rogov, Y.A.Zhgutov et al. Effect of cultivation conditions bone marrow stem cells to effectively treat acute liver failure in the experiment. *Clinical and experimental morphology*. 2016, 3(19), p.46-54 (in Russian)

29. Temnov AA, Vagabov AV, Sklifas AN et al. The role of mesenchymal stromal cells in the repair of acute organ injury. In Book «The Biology and Therapeutic Application of Mesenchymal Cells» by edited Kerry Atkinson. Published Online: 26 NOV 2016, DOI: 10.1002/9781118907474.ch35

Сведения об авторах:

Волкова Анастасия Геннадьевна, аспирант, Институт биофизики клетки РАН

Мелерзанов Александр Викторович, канд. мед. наук, научный руководитель лаб. клеточных и молекулярных технологий, декан ФБМФ МФТИ

Новоселов Владимир Иванович, доктор биол. наук, вед. науч. сотр., Институт биофизики клетки РАН