

Медицинская экология

MEDICAL ECOLOGY

УДК 616.24:57.086.8

ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУР АЛЬВЕОЛОЦИТОВ I И II ТИПА ДЛЯ МЕДИКО-ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

М. Ю. ЮРКЕВИЧ¹⁾, П. В. АЛЬХОВИК¹⁾, А. А. ЦАРИК¹⁾, М. А. КОХНЮК¹⁾

¹⁾Международный государственный экологический институт
имени А. Д. Сахарова, Белорусский государственный университет,
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

Альвеолярный эпителий представляет собой динамическую ткань, состоящую из клеток I и II типа, покрывающую более 99 % внутренней поверхности легких и активно реагирующую на различные эндогенные и экзогенные стимулы. Представлена технология выделения альвеолоцитов I и II типа, заключающаяся в механической дезагрегации ткани с последующей обработкой эксплантов 0,25%-ным раствором трипсина в сочетании с фильтрованием клеточной суспензии через поры диаметром 100 мкм и 50 мкм. При двумерном статическом культивировании визуализировались жизнеспособные активно пролиферирующие округлые клетки и крупные альвеолярные эпителиоциты с кубоидной морфологией, производящие сурфактантные белки.

Ключевые слова: культуры клеток; альвеолоциты I и II типа; метод ферментативной дезагрегации; морфология; клеточный выход; жизнеспособность.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования Республике Беларусь на 2021 год, № ГР 20211338 от 17.05.2021.

Образец цитирования:

Юркевич МЮ, Альховик ПВ, Царик АА, Кохнюк МА. Получение культур альвеолоцитов I и II типа для медико-экологических исследований. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология*. 2021;2:67–73.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2021-2-67-73>

Авторы:

Мария Юрьевна Юркевич – кандидат биологических наук; доцент кафедры иммунологии.
Павел Владимирович Альховик – студент факультета экологической медицины.
Анастасия Александровна Царик – студентка факультета экологической медицины.
Марина Андреевна Кохнюк – студентка факультета экологической медицины.

For citation:

Yurkevich MYu, Alchovik PV, Tsarik AA, Kokhniuk MA. Cultures of alveolocytes I and II type for medical and ecological research. *Journal of the Belarusian State University. Ecology*. 2021;2:67–73. Russian.
<https://doi.org/10.46646/2521-683X/2021-2-67-73>

Authors:

Mariya Yu. Yurkevich, PhD (biology); associate professor at the immunology department.
marija4567@gmail.com
Pavel V. Alchovik, student at the faculty of environmental medicine.
qwe111x@yandex.by
Anastasia A. Tsarik, student at the faculty of environmental medicine.
czarik01@inbox.ru
Marina A. Kokhniuk, student at the faculty of environmental medicine.
mkokhnyuk01@mail.ru

CULTURES OF ALVELOCYTES I AND II TYPE FOR MEDICAL AND ECOLOGICAL RESEARCH

M. Yu. YURKEVICH^a, P. V. ALCHOVIK^a, A. A. TSARIK^a, M. A. KOKHNIUK^a

^a*International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,
23/1 Daūhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus
Corresponding author: M. Yu. Yurkevich (marija4567@gmail.com)*

The alveolar epithelium is a dynamic tissue, consisting of cells of types I and II, covering more than 99 % of the lung inner surface and actively responding to various endogenous and exogenous stimuli. The technology of alveolocyte isolation is presented, which consists in mechanical disaggregation of tissue with subsequent processing of the resulting explants with 0.25 % trypsin solution in combination with filtration of the cell suspension through pores with a diameter of 100 μm and 50 μm . In two-dimensional static culture viable actively dividing rounded cells and large alveolar epithelial cells with cuboid or polygonal morphology, producing surfactant proteins, were visualized.

Keywords: cell culture; alveolocytes I and II types; enzymatic disaggregation method; morphology; cell output; viability.

Acknowledgements. This work was supported by the grant of the Ministry of Education of the Republic of Belarus for 2021, grant no. GP 20211338 from 17.05.2021.

Введение

Легкие являются одним из наиболее важных органов, подверженных прямому воздействию факторов окружающей среды. Они различаются как по своей природе, так и по механизмам действия и включают химические и биологические компоненты. При дыхании воздух с взвешенными нано- и микрокомпонентами проходит через альвеолярно-капиллярную структуру, которая представлена эндотелиальными клетками и альвеолярными эпителиоцитами, а также их отдельными базальными мембранами, слитыми для облегчения диффузии [1].

Альвеолярный эпителий состоит из трех типов клеток: альвеолярные эпителиальные клетки I и II типа, альвеолярное макрофаги. Клетки I типа образуют эпителиальную часть аэрогематического барьера и участвуют в газообмене. Клетки II типа синтезируют и секрецируют поверхностно-активные вещества, транспортируют ионы, участвуют в иммунных реакциях, а также в ответ на повреждение функционируют как клетки-предшественники [2; 3].

Повреждение альвеолярного эпителия лежит в основе ряда патологических состояний. Альвеолярные эпителиальные клетки являются мишенью для проникновения и репликации вирусов. Так, вирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию коронавирусной инфекции во всем мире, инфицирует альвеолярные эпителиальные клетки за счет связывания с их рецептором к ангиотензинпревращающему ферменту-2 [4]. Опосредованное инфекционными, химическими и/или иными факторами острое нарушение аэрогематического барьера сопровождается частичным или полным разрушением и десквамацией альвеолярных эпителиоцитов, миграцией иммунокомпетентных клеток, гиперпродукцией цитокинов и реактивных форм кислорода, что является причиной развития неуправляемых цитотоксических реакций, клинически проявляющихся острым респираторным дистресс-синдромом [5; 6]. Нарушение структуры альвеолярной эпителиальной ткани, обнажение базальной мембраны, образование фибриновых волокон и формирование так называемых «глиалиновых мембран» является причиной развития легочного фиброза [7]. Патологические изменения синтеза сурфактана характерны для ряда тяжелых форм заболеваний легких, в том числе муковисцидоза и идиопатического фиброза легких [8].

Культура альвеолярных эпителиальных клеток является уникальной системой, позволяющей *in vitro* изучить функциональное состояние клеток в норме, при воздействии факторов окружающей среды, а также смоделировать течение различных патологических состояний. Поскольку аэрогематический барьер, образованный альвеолярными эпителиоцитами, имеет решающее значение для доставки лекарственных средств в легкие, клеточные культуры могут использоваться для проведения стандартизованных исследований токсичности и транспорта различных соединений [9; 10]. Кроме того, получение жизнеспособных и функционально состоятельных культур альвеолярных эпителиоцитов является основой для разработки новых подходов в регенеративной медицине заболеваний легких [11].

Большинство существующих клеточных моделей, имитирующих аэрогематический барьер, представлены опухолевыми клетками или иммортализованными клеточными линиями, полученными из трахеального / бронхиального эпителия легких человека и животных. Использование данных культур ограничено вследствие высокой вероятности генетических трансформаций и отсутствия в них всего спектра функций, характерного для альвеолярных эпителиоцитов [10]. В связи с этим огромный интерес представляет разработка методов получения жизнеспособных и функционально активных альвеолоцитов из нативной легочной ткани.

Целью данного исследования являлась оптимизация технологии получения культур альвеолоцитов I и II типа путем ферментативной дезагрегации легочной ткани, а также характеристика клеток в условиях стандартного монослоистого культивирования.

Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование проводили с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и в научных целях (Страсбург, 1991 г.), и в соответствии с постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 21.05.2010 №36 «Ветеринарно-санитарные правила по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках».

Материалы и оборудование. Вода дистиллированная, подготовленная по требованиям ГОСТ 67092-72, 0,9%-ный раствор натрия хлорида (физиологический раствор, РУП «Белмедпрепараты», РБ), коллагеназа IV типа («Sigma», Германия), 0,25%-ный раствор трипсин-этилендиаминтетрауксусной кислоты («Gibco», США), эмбриональная телячья сыворотка («Capricorn Scientific», Германия), минимальная среда Игла с низким содержанием глюкозы, модифицированная по способу Дульбекко (DMEM, «Gibco», США), смесь антибиотиков – антимикотика (100 Ед/мл бензилпенициллин натрия, 100 Ед/мл стрептомицин сульфата, 100 Ед/мл неомицин сульфата («Lonza», США), L-глутамин («Lonza», США), набор «Annexin V-Fitc Apoptosis Detection Kit» («BD Pharmingen», США), анти-CCR2 моноклональные антитела, меченные DyLight500 («Invitrogen», США), 0,3%-ный раствор судана III в 70%-ном этаноле (РФ), культуральные чашки Петри, пробирки культуральные на 15 и 50 мл, фильтры с диаметром пор 50 мкм и 100 мкм, медицинские инструменты: пинцеты, зажимы, хирургические ножницы.

Ламинарный бокс II класса защиты (ОДО «Белаквилон», РБ), СО₂-инкубатор CO2CELL 50 (MMM Group, Германия), центрифуга лабораторная Liston C 2210 (РФ), инвертированный флуоресцентный микроскоп BS-2036F («BestScope», КНР), проточный цитометр CytoFLEX («Beckman Coulter», США), дозаторы автоматические («Thermo Scientific», РФ).

Выделение альвеолоцитов I и II типа. Основные этапы выделения альвеолярных эпителиальных клеток отражены на рис. 1.

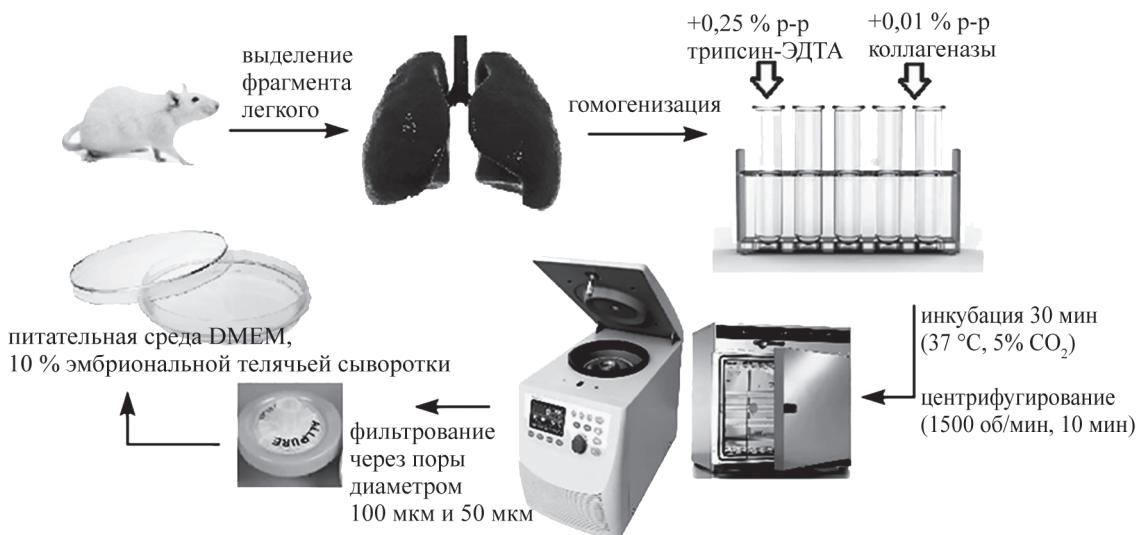


Рис. 1. Основные этапы выделения альвеолоцитов I и II типа методом механической и ферментативной дезагрегации ткани легкого

Fig. 1. The key steps of an optimized method for the isolation of alveolocytes I and II types by mechanical and enzymatic disaggregation of lung tissue

Лабораторных беспородных половозрелых крыс, масса тела которых 270–320 г. (n = 7), вводили в наркоз путем интракардиального введения раствора тиопентала натрия (45 мг/кг веса). Проводили продольную лапаротомию и осуществляли забор обескровленного легкого. Легочную ткань механически измельчали до эксплантов размером 2–3 мкм в фермент-содержащем растворе и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C в условиях постоянного перемешивания. Для ферментативной дезагрегации ткани использовали два подхода: 0,01%-ный раствор коллагеназы IV типа или 0,25% раствор трипсин-этилендиаминтетрауксусной кислоты. Ферментативную активность инактивировали путем центрифугирования полученных суспензий в физиологическом растворе с 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой в течение 10 мин при 15000 об/мин. К осадкам добавляли физиологический раствор с 5 % эмбриональной телячьей сывороткой, суспензии последовательно пропускали через фильтры, диаметр пор которых 100 мкм и 50 мкм, и дважды центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин.

Культивирование альвеолярных эпителиальных клеток. Клеточную суспензию высевали в адгезивные чашки Петри в культуральную среду DMEM, содержащую 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ L-глутамина, смесь антибиотиков – антимикотика. Клетки культивировали при 37 °C в условиях 5 % CO₂. Первая замена культуральной среды осуществлялась на 2 день культивирования, впоследствии среда заменялась каждый 3-й день. Все манипуляции с клетками выполняли со строгим соблюдением правил стерильности в ламинарном боксе II класса защиты. Мониторинг клеточных культур и визуализацию роста *in vitro* осуществляли с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Оценка пролиферативного потенциала клеток. Выделенные альвеолоциты культивировали в течение 4 дней в стандартных условиях в концентрациях 8x10⁵ и 16x10⁵ клеток/лунку 24-луночного планшета. По истечении времени культивирования подсчитывалась концентрация клеток и рассчитывались показатели времени (ВУП) и частоты (ЧУП) удвоения популяций по следующим формулам:

$$\text{ЧУП} = \log_{10}(n/N) \times 3,33,$$

$$\text{ВУП} = \text{время роста культуры (дни)}/\text{ЧУП},$$

где n – число клеток после культивирования, N – число клеток для посева.

Метод проточной цитометрии. Жизнеспособность клеток оценивали по уровню связывания клетками пропидий йодида и антител к аннексину V, меченных фикоэритрином (Fitc). Для характеристики пролиферативной активности клетки инкубировали 30 мин при комнатной температуре с антителами к CCR2, меченными DyLight500 (разведение 1:50). В качестве контроля использовали пробы, которые инкубировали только с изотипическими антителами. Регистрацию результатов проводили с помощью проточного цитофлуориметра.

Статистические методы. Статистическая обработка результатов осуществлялась в пакете прикладных программ STATISTICA 8.0. Полученные результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартиля (25 % – 75 % процентили).

Результаты исследования и их обсуждение

Для выделения альвеолоцитов I и II типа используются разнообразные подходы к дезагрегации ткани легкого: механические, химические и ферментативные, а также их сочетание. Методы отличаются по клеточному выходу, сохранности ультратонкой структуры, жизнеспособности клеток и предусматривают использование различных ферментов (трипсин, коллагеназа, эластаза, проназа, ДНКаза либо сочетание протеаз), фильтров с определенным диаметром пор, а также включение дополнительной стадии центрифугирования на градиенте плотности. Кроме того, изолированные альвеолярные эпителиоциты получают методами магнитной сепарации или проточной цитометрии с флуоресцентным сортировщиком клеток [3; 10; 12; 13].

Эпителиальные клетки достаточно хрупкие и легко повреждаются, поэтому проводится их быстрая изоляция (вся процедура не должна превышать 4 ч) при бережном обращении с тканями. Выделение клеток из легких лабораторных животных осуществлялось путем механической и ферментативной дезагрегации ткани различными протеолитическими ферментами с коллагенолитической активностью: 0,25%-ный раствор трипсина и 0,01%-ный раствор коллагеназы IV типа. Согласно данным ряда исследований, снижение температуры до 15 °C и времени инкубации с ферментами до 15 мин влияет на выход клеток из ткани легкого, снижая данный показатель на 50 %, при этом повышение инкубационного периода оказывает негативное влияние на клеточную жизнеспособность [12]. Таким образом, оптимальными условиями для выделения достаточного количества жизнеспособных альвеолоцитов явились время инкубации с ферментами 30 мин и осуществление всех этапов при 37 °C. После выделения клеток с использованием относительно простого метода ферментативной обработки легочной ткани важным этапом является избавление от примеси клеток. Установлено, что добавление этапа фильтрования клеточных суспензий через поры диаметром 100 и 50 мкм обеспечивает эффективное удаление клеточного дебриса и крупных конгломератов ткани. Количество жизнеспособных (негативных по аннексину V и пропидий йодиду) клеток во всех полученных культурах колебалось от 91,0 до 98,5 % и составляло по медиане 94,6 (92,1–97,9) % (рис. 2 *a, б*).

Клеточный выход при использовании трипсина соответствовал 6,8 (5,4–7,5) x 10⁶ альвеолярных эпителиоцитов/грамм ткани легкого и статистически значимо превышал аналогичный показатель при коллагеназо-опосредованном выделении клеток (3,9 (2,8–5,0) x 10⁶ клеток/г), p=0,02, U-критерий Манна–Уитни. Таким образом, несмотря на то что альвеолярные эпителиоциты составляют относительно небольшой процент всех клеток легких (около 20 %), обработка ткани легких трипсином эффективно высвобождает эпителиальные клетки из подлежащей базальной мембранны, оставляя большую часть интерстициальных и сосудистых компартментов нетронутыми.

Клетки культивировали в стандартных условиях в питательной среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 % смеси антибиотиков-антимикотика, 1 % аминокислоты L-глутамина. Большая часть изолированных клеток прикреплялась к адгезивному лабораторному пластику в течение

48 ч, при этом визуализировались одиночные клетки или клеточные конгломераты, находящиеся в суспензии. Первичные клеточные культуры обладали морфологической гетерогенностью. В незначительном количестве в культурах клеток обнаруживались фибробластоподобные медленно пролиферирующие клетки с более или менее неравномерной по плотности цитоплазмой и крупным ядром. При этом, в ходе дезагрегации легочной ткани сериновой протеазой (трипсином) количество клеток с фибробластоподобной морфологией не превышало 1% от общего количества клеток в культуре (рис. 2 *в*), тогда как при использовании коллагеназы IV типа доля данных клеток в культурах возрастила и составляла 5–10 % (рис 2 *г*). В некоторых полученных культурах визуализировались 1–2 колонии полигональных, плотно прилегающих друг к другу клеток, морфологически похожих на эндотелиоциты. Данные клетки быстро откреплялись от лабораторного пластика и погибали в первые дни культивирования, так как для поддержания их пролиферативной активности *in vitro* необходимо присутствие в культуральной среде ряда факторов, в частности, сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF).

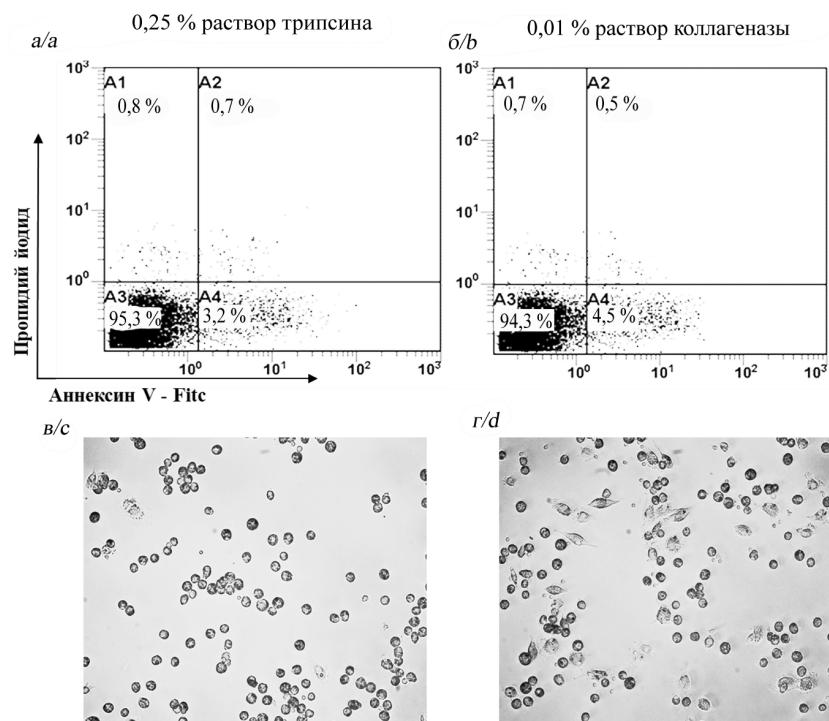


Рис. 2. Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии, отражающие жизнеспособность клеток (*а*, *б*), и морфология (*в*, *г*, ув. 20 х) культур альвеолоцитов, полученных в результате обработки ткани легкого растворами трипсина (*а*, *в*) и коллагеназы (*б*, *г*)

Fig. 2. Representative flow cytometry diagrams of cell viability (*a*, *b*) and morphology (*c*, *d*, 20 x) of alveolocyte cultures obtained as a result of lung tissue digestion with solutions of trypsin (*a*, *c*) and collagenase (*b*, *d*)

Морфологические особенности клеточных культур, полученных из ткани легкого с использованием трипсина, отражены на рис. 3. Преобладающее число клеток характеризовались окружной морфологией с сохраняющейся полярностью и четко очерченным центрально расположенным ядром. Размер клеток, определяемый как максимально возможное расстояние между двумя точками видимой на фотографии клеточной проекции, варьировал в пределах 10–15 мкм. Данные морфологические особенности характерны для альвеолярных эпителиальных клеток I типа, которые покрывают около 95 % поверхности альвеол и выполняют барьерную функцию [2; 3; 10; 13]. В культурах также визуализировались клетки крупных размеров (15–20 мкм), кубовидной формой с небольшим центрально расположенным ядром. Данный тип клеток содержит множество цитоплазматических вакуолей и пластинчатых телец (органелл, в которых накапливается и хранится сурфактант [14]), позитивно окрашиваемых органическим азокрасителем – суданом III, что позволяет отнести их к секреторным альвеолярным эпителиоцитам II типа. Данные клетки занимают 3–5 % альвеолярной поверхности, активно накапливают и продуцируют сурфактантный комплекс, представляющий собой фосфолипид, в состав которого входят насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты со свободной валентностью. Сурфактант стабилизирует мелкие дыхательные пути, обладает антидегидратационной и газообменной функциями, осуществляют антиоксидантную защиту альвеолярной стенки, а также препятствует проникновению к эпителию экзогенных гидрофильных молекул, улучшает клиренс и модулирует активность клеток иммунной системы [2; 3; 10; 12].

Частота удвоения популяций альвеолярных эпителиальных клеток составляла 1,8 (1,7÷2,1) раз. Время удвоения популяций соответствовало 2,4 (2,0÷2,9) дням, что отражает пролиферативную активность клеток при стандартном монослойном культивировании. При этом концентрация клеток, используемая при посеве, не оказывала влияния на интенсивность клеточной пролиферации.

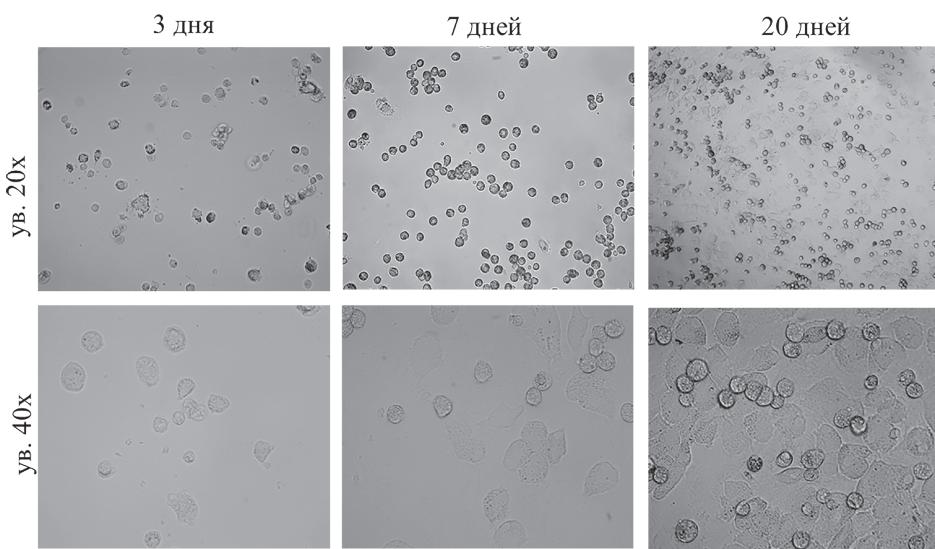


Рис. 3. Морфология первичных культур альвеолоцитов, выделенных путем дезагрегации ткани легкого 0,25 % раствором трипсина

Fig. 3. Morphology of alveolocyte cultures isolated by disaggregation of lung tissue with 0.25 % trypsin solution

Альвеолярный эпителий подвергается воздействию большого количества вдыхаемого воздуха, содержащего загрязнители и патогены, что приводит в ряде случаев к деструкции ткани и нарушению процессов газообмена. При этом функцию легких можно восстановить при активации процессов реэпителиализации. Повреждение эпителиальных клеток легочной ткани сопровождается продукцией белка хемотаксиса макрофагов (MCP-1), который, взаимодействуя с димерным мембранным интегрином CCR2, запускает процессы reparации, индуцирует пролиферацию клеток, гаптотаксис и восстановление монослоя [15; 16].

На рис. 4 представлены репрезентативные гистограммы проточной цитометрии, отражающие уровень экспрессии CCR2 в альвеолярных эпителиоцитах. Показано, что более 80 % клеток (88,9 (81,4÷95,6 %), изолированных из легочной ткани путем механической и ферментативной дезагрегации, экспрессируют CCR2, что отражает их функциональную активность и способность к пролиферативной reparации. Согласно данным M. C. Lundien и соавт. (2002), эпителиальные клетки альвеол активно пролиферируют в ответ на MCP-1 и обладают гаптотаксической миграцией, тогда как антитела к MCP-1 блокируют пролиферативную активность клеток [15]. P. Christensen и соавт. (2004) установлена экспрессия мРНК CCR2 в альвеолярных эпителиальных клетках. При этом первичные альвеолярные эпителиоциты, выделенные из легких мышей, лишенных CCR2, не отвечали на MCP-1 и характеризовались сниженными пролиферативным и reparативным потенциалами [16].

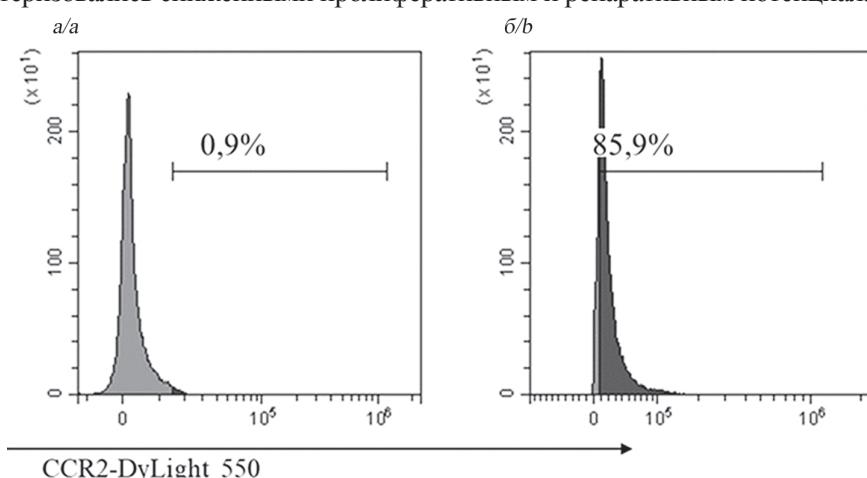


Рис. 4. Репрезентативные гистограммы проточной цитометрии, отражающие уровень экспрессии CCR2 в альвеолярных эпителиальных клетках: *a* – изотипический (негативный) контроль, *b* – экспрессия CCR2

Fig. 4. Representative flow cytometry histograms of CCR2 expression in alveolar epithelial cells: *a* – isotypic (negative) control, *b* – CCR2 expression

Заключение

Метод, включающий механическую дезагрегацию ткани легкого с последующей обработкой полученных эксплантов 0,25%-ным раствором трипсина в сочетании с фильтрованием клеточной суспензии через поры диаметром 100 мкм и 50 мкм, позволяет выделить достаточное количество жизнеспособных альвеолоцитов I и II типа ($6,8(5,4\div7,5)\times10^6$ клеток/грамм). В стандартных условиях в культурах визуализируются активно делящиеся округлые альвеолярные эпителиоциты и клетки с кубоидной морфологией, характеризующиеся высокой секреторной активностью. Культуры альвеолоцитов являются уникальной модельной системой для изучения патогенетических процессов на молекулярно-клеточном уровне. Они используются с целью оценки эффективности лекарственных средств и разработки новых терапевтических подходов, а также могут применяться в регенеративной медицине. Перспективным направлением дальнейшего исследования клеточных культур является поиск специфических маркеров для альвеолоцитов I и II типа и определение их роли в физиологических процессах. Кроме того, оптимизированный метод получения культур альвеолярных эпителиальных клеток является фундаментальной основой для разработки трехмерных культур клеток легкого, имитирующих микроокружение и архитектонику нативной ткани.

Библиографические ссылки / References

1. Olivieri D, Scoditti E. Impact of environmental factors on lung defences. *European Respiratory Review*. 2005;14:51–56. DOI: 10.1183/09059180.05.00009502.
2. Mercer RR, Russell ML, Roggeli VL, Crapo JD. Cell number and distribution in human and rat airways. *Journal Respir Cell Molecular Biology*. 1994;10:613–624. DOI: 10.1165/ajrcmb.10.6.8003339.
3. Gonzalez RF, Dobbs L. G. Isolation and culture of alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs. *Methods Molecular Biology*. 2013;945:145–159. DOI: 10.1007/978-1-62703-125-7_10.
4. Carcaterra M, Caruso C. Alveolar epithelial cell type II as main target of SARS-CoV-2 virus and COVID-19 development via NF-Kb pathway deregulation: A physio-pathological theory. *Medical Hypotheses*. 2021;146:110412. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.110412.
5. Miura TA. Respiratory epithelial cells as master communicators during viral infection. *Current Clinical Microbiology Reports*. 2019; 6:10–17. DOI: 10.1007/s40588-019-0111-8
6. Zhang H, Cui Y, Zhou Z, Ding Y, Nie H. Alveolar Type 2 Epithelial Cells as Potential Therapeutics for Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome. *Current Pharmaceutical Design*. 2019;25(46):4877–4882. DOI: 10.2174/1381612825666191204092456.
7. Parimon T, Yao C, Stripp BR, Noble PW, Chen P. Alveolar Epithelial Type II Cells as Drivers of Lung Fibrosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(7):2269. DOI: 10.3390/ijms21072269.
8. Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE. Diseases of pulmonary surfactant homeostasis. *Annual Review of Pathology*. 2015;10:371–393. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012513-104644.
9. Hiemstra PS, Grootaers G, van der Does AM, Krul CAM, Kooter IM. Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: lessons learned and future directions. *Toxicology in vitro*. 2018;47:137–146. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.11.005.
10. Daum N, Kuehn A, Hein S, Schaefer UF, Huwer H, Lehr CM. Isolation, cultivation, and application of human alveolar epithelial cells. *Methods Molecular Biology*. 2012;806:31–42. DOI: 10.1007/978-1-61779-367-7_3.
11. Basil MC, Katzen J, Engler AE, Guo M, Herriges MJ, Kathiriya JJ, Windmueller R, Ysasi AB, et al. The cellular and physiological basis for lung repair and regeneration: past, present, and future. *Cell Stem Cell*. 2020;26(4):482–502. DOI: 10.1016/j.stem.2020.03.009.
12. Lee DF, Salguero FJ, Grainger D. Isolation and characterisation of alveolar type II pneumocytes from adult bovine lung. *Scientific Reports*. 2018;8:e.11927. DOI: 10.1038/s41598-018-30234-x.
13. Wang S., Hubmayr R. D. Type I alveolar epithelial phenotype in primary culture. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2011;44(5):692–699. DOI: 10.1165/rcmb.2009-0359.
14. Schneider JP, Pedersen L, Mühlfeld C, Ochs M. Staining histological lung sections with Sudan Black B or Sudan III for automated identification of alveolar epithelial type II cells. *Acta Histochem*. 2015;117(8):675–80. DOI: 10.1016/j.acthis.2015.10.005.
15. Lundien MC, Mohammed KA, Nasreen N, Tepper RS, et al. Induction of MCP-1 expression in airway epithelial cells: role of CCR2 receptor in airway epithelial injury. *Journal of Clinical Immunology*. 2002;22(3):144–52. DOI: 10.1023/a:1015420029430. PMID: 12078856.
16. Christensen PJ, Du M, Moore B, Morris S, et al. Expression and functional implications of CCR2 expression on murine alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2004;286(1):68–72. DOI: 10.1152/ajplung.00079.2003.

Статья поступила в редакцию 22.04.2021.
Received by editorial board 22.04.2021.