

Санкт-Петербургский Государственный университет

Кафедра цитологии и гистологии

Приходько Станислава Сергеевна

Магистерская диссертация

**Получение и характеристика фиброцитов, содержащих  
онкогенную мутацию JAK2 V617F**

Направление 06.04.01

Биология

Магистерская программа Клеточная биология, цитология, гистология, иммунология

Работа выполнена в лаборатории

онкогематологии

ФМИЦ им. АЛМАЗОВА

Научный руководитель:

д.б.н., проф. Н.Б. Серебряная

Куратор:

к.б.н., н.с. ФМИЦ им. Алмазова, И.И. Гин

Санкт-Петербург

2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1. Роль мутации янускиназы JAK2 V617F в патогенезе первичного миелофиброза.....	5
2. Фиброциты – костномозговые предшественники стромальных коллаген продуцирующих клеток, найденные в периферической крови.....	8
2.1. Открытие фиброцитов при изучении процесса заживления раны.....	8
2.2. Фиброциты проявляют особенности как гемопоэтических, так и стромальных клеток.....	9
2.2.1. Морфология и поверхностные маркеры фиброцитов.....	9
2.2.2. Фиброциты дифференцируются в миофибробласты.....	13
2.2.3. Трудности идентификации фиброцитов.....	14
2.3. Источник фиброцитов.....	18
2.4. Функции фиброцитов в норме и при патологии.....	19
ГЛАВА 2. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	22
ГЛАВА 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	27
ВЫВОДЫ.....	35
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	36

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

$\alpha$ -SMA –smooth muscle  $\alpha$  –actin (гладкомышечный  $\alpha$ - актин)

CD – cluster of differentiation (кластер дифференцировки)

ECM (ВКМ) – extracellular matrix (внеклеточный матрикс)

ET (ЭТ)- essential thrombocythemia (эссенциальная тромбоцитемия)

FBS – fetal bovine serum (фетальная бычья сыворотка)

FCS - foetal calf serum (эмбриональная телячья сыворотка)

HSC (ГСК) – hematopoietic stem cells (гемопоэтические стволовые клетки)

MSC (МСК) – mesenchymal stem/ stromal cells мезенхимные стволовые/  
стромальные клетки

PBMC - peripheral blood mononuclear cell (мононуклеарные клетки  
периферической крови)

PDGF – platelet-derived growth factor (тромбоцитарный фактор роста)

Ph - филадельфийская хромосома

PMF (ПМФ)- первичный миелофиброз

PV (ИП)- polycythemia vera (истинная полицитемия)

TGF- $\alpha$ – transforming growth factor –  $\alpha$ (трансформирующий фактор роста- $\alpha$ )

TGF- $\beta$ – transforming growth factor –  $\beta$  (трансформирующий фактор роста-бета)

## ВВЕДЕНИЕ

Фиброциты – клетки веретеновидной формы производные CD14+ моноцитов, которые обладают особенностями как гемопоэтических (содержат маркеры CD 45, CD 34), так и стромальных клеток (адгезивные, синтезируют белки внеклеточного матрикса). Несмотря на их небольшую долю от циркулирующих лейкоцитов в норме, они играют важную роль во многих патологических состояниях, связанных с фиброзом, тканевым ремоделированием или хроническим воспалением, таких как легочный и нефрогенный системный фиброз, склеродермия, сердечно-сосудистые заболевания, а также первичный миелофиброз. Первичный миелофиброз относится к Ph негативным заболеваниям, основным критерием определения которого служит миелофиброз – явление, разрастания коллагеновых волокон в красном костном мозге с последующим вытеснением гемопоэтической ткани в другие органы и нарушением гемопоэза. Отсутствие соответствующей терапии миелофиброза связано с его неясной этиологией. Считается, что первичный миелофиброз развивается в результате злокачественной трансформации в гемопоэтических стволовых клетках, что приводит к нарушению клеточных сигнальных путей, регулирующих клеточный рост, активацию, дифференцировку, адгезию и апоптоз. Клональная миелопролиферация сопровождается изменением стромы костного мозга и патологической выработкой цитокинов и металлопротеиназ, которые могут участвовать в нарушении межклеточных взаимодействий нейтрофилов, моноцитов и мегакариоцитов, приводя к выходу CD34<sup>+</sup> миелоидных предшественников и эндотелиальных клеток в периферическую кровь. Первоначальная причина, ведущая к злокачественной трансформации неизвестна, однако, для значительной части пациентов с первичным миелофиброзом наиболее характерна точечная мутация в гене янускиназы JAK2 V617F, которая приводит к гиперактивации янускиназы и фосфорилированию белков - мишеней в отсутствие стимуляции рецепторов, к запуску JAK-STAT сигнального пути и избыточной пролиферации миелоидного ростка.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1. Роль мутации янускиназы JAK2 V617F в патогенезе первичного миелофиброза

**Фиброз** - разрастание и уплотнение соединительной ткани, постепенно приводящее к полной утрате органом своей функции. Фиброз часто рассматривают как форму нарушения процесса восстановления ткани, когда не происходит нормальной регенерации после тканевого повреждения из-за стимуляции клеток к гиперпродукции компонентов ВКМ (коллагенов, фибронектина, эластина, ламинина, протеогликанов и других). Также фиброз рассматривают как результат хронического воспаления, например, в ответ на постоянное повреждение ткани патогеном (бактериями, вирусами, грибами, многоклеточными паразитами) и на воздействие токсичных веществ (дым, химикаты, аллергены, или алкоголь) или как процесс, возникающий при аутоиммунных заболеваниях (Kisseleva, Brenner, 2008; Le Bousse-Kerdilès et al., 2008). В основе всех фиброзных реакций лежат клеточные и молекулярные механизмы. Обычно наблюдаются лейкоцитарная инфильтрация ткани, стойкое воспаление и пролиферация клеток соединительной ткани. Среди этих клеток миофибробласты – фиброцитоподобные  $\alpha$ -SMA положительные клетки, способны к сокращению и повышенной продукции матриксных белков, являясь таким образом ключевыми участниками ремоделирования ткани после раневого повреждения и в последующем фиброзе (Ngo et al., 2014; Wynn, 2008). **Миелофиброз** – явление, при котором разрастание коллагеновых волокон в красном костном мозге замещает клетки нормальной ткани и нарушает гемопоэз. Является осложнением при таких Ph негативных заболеваниях, как эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), истинная полицитемия (ИП) и первичный миелофиброз (ПМФ).

Применяющаяся в настоящее время терапия миелофиброза обычно не приводит к излечению и только направлена на улучшение качества жизни. Единственный радикальный метод лечения — трансплантация костного мозга (в частности ГСК) сопряжен с большим риском для пациента. (Абдулкадыров и соавт., 2013). Отсутствие соответствующей терапии первичного миелофиброза возникает прежде всего потому, что его этиология до сих пор не ясна. Считается, что первичный миелофиброз, развивается в результате злокачественной трансформации в ранних гемопоэтических предшественниках, ведущих к нарушению клеточных сигнальных путей, которые регулируют клеточный рост, активацию, дифференцировку, адгезию и апоптоз. Клональная миелопролиферация сопровождается

вторичным (длительным) воспалением, изменением стромы костного мозга и патологической выработкой цитокинов и металлопротеиназ, которые могут участвовать в нарушении межклеточных взаимодействий нейтрофилов, моноцитов и мегакариоцитов, приводя к выходу CD34<sup>+</sup> миелоидных предшественников и эндотелиальных клеток в периферическую кровь (Абдулкадыров и соавт., 2013).

Первоначальная мутация, ведущая к воспалению, неизвестна, хотя для значительной части пациентов с Ph-негативными заболеваниями (95% пациентов с PV, 55% с ET и 65% с PMF) наиболее характерна точечная мутация в гене янускиназы JAK2 V617F, которая происходит в результате замены G на T в 14 экзоне JAK2, что приводит к изменению нуклеотида в 1849 положении и изменению валина в 617 кодоне на фенилаланин. Мутация затрагивает некаталитический JH2-псевдокиназный домен белка и, как полагают, приводит к ухудшению его киназа-регуляторной деятельности. Полагают, что изменение, опосредованное JAK2 V617F приводит к гиперактивации янускиназы и фосфорилированию белков - мишеней в отсутствие стимуляции рецепторов. Данные изменения приводят к запуску JAK-STAT сигнального пути и избыточной пролиферации миелоидного ростка (Yamaoka, 2004) (Рис. 1. и 2.)

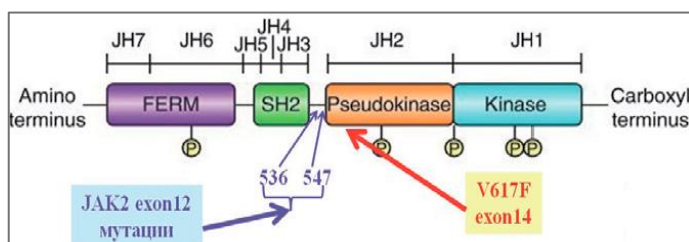


Рис.1. Первичная структура JAK2 и место точечных мутаций. (Абдулкадыров и соавт., 2013)

Янускиназа является преобразователем сигнала и активатором транскрипции (JAK-STAT) пути важного для широкого спектра клеточных процессов, включая пролиферацию, выживание или нормальное функционирование гемопоэтических, иммунных и других клеток (Tefferi, 2010).

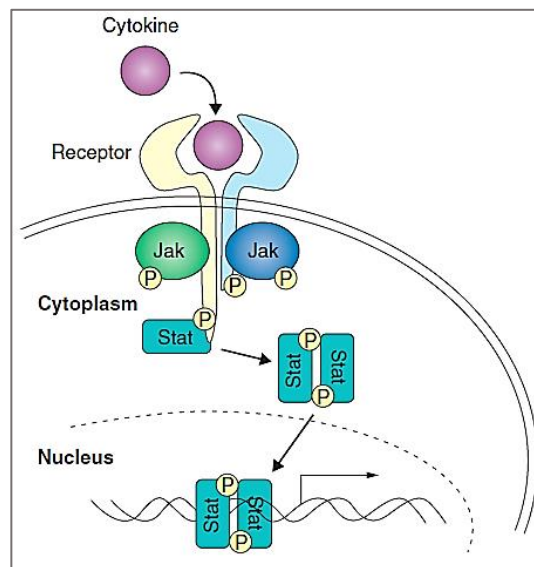


Рис. 2. Схема сигналинга цитокина. (Yamaoka, 2004)

Цитокины связываются с гомо- или гетеродимерным рецептором. Они в свою очередь фосфорилируют цитокиновый рецептор. STAT белки связываются с фосфорилированными цепями рецептора, что позволяет Jaks фосфорилировать STAT. Фосфорилированные STAT образуют димеры, транслоцируются в ядро, накапливаются там и регулируют экспрессию генов необходимых для пролиферации.

характерным для миелопролиферативных заболеваний – повышению числа лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, гиперплазии эритроидного и мегакариоцитарного ростка, увеличению размера селезенки и к ее фиброзу (особенно у мышей старшего возраста). Уровень экспрессии гена прямо коррелирует с выраженностью фенотипа заболевания. Этот эксперимент иллюстрирует четкую способность JAK2 вызывать миелопролиферативные заболевания. Однако, то, что изменения, вызванные JAK2 трансгенной экспрессией происходят не у всех опытных мышей, дает основания полагать более сложный механизм возникновения заболевания. (Xing et al., 2008).

Наряду с мутацией JAK2 киназы (рецептора эритропоэтина) у больных миелопролиферативными заболеваниями встречаются также мутации в рецепторе тромбопоэтина (MPL), LNK (лимфоцитарном адапторном белке SH2B3, ингибирующем активность JAK2), CBL (цитозольном белке также негативном регуляторе JAK2), TET2, ASXL1, (регуляторах транскрипции), IDH (изоцитратдегидрогеназе), IKZF1, EZH2 (транскрипционных факторах). Причем данные мутации не являются строго специфичными для первичного миелофиброза (Tefferi, 2010). Мутации в кальций связывающем белке кальретикулине, который кодируется геном CALR, выявляют у большей части JAK2- и MPL-негативных пациентов с первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией, более того эти мутации присутствуют только в злокачественных образованиях миелоидного ростка (Nangalia et al., 2013). Эти данные указывают на то, что место мутации в иерархическом порядке событий при развитии болезни еще предстоит установить.

Тем не менее именно изменения в гене JAK2, видимо, способствуют зависимому от времени развитию миелофиброза, так как мутация JAK2 (V617F) была обнаружена у всех пациентов со вторичным пост - PV миелофиброзом в выборке из 16 человек, что согласуется с данными, полученными Xing et al., 2008 на мышах. Более того ген JAK2 (V617F) влияет как на выход CD34<sup>+</sup> клеток, так и на активацию гранулоцитов. Большое число клеток в периферической крови обнаруживаются не только при PMF, но также и на поздних стадиях PV и ET. Это было продемонстрировано на пациентах с PV, где лица, несущие JAK2 (V617F), имели больше циркулирующих CD34<sup>+</sup> клеток в сравнении с индивидуумами без мутации. Эти наблюдения показывают, что JAK2 (V617F) может конститутивно активировать гранулоциты и, таким образом, мобилизовать CD34<sup>+</sup> клетки (Passamonti et al., 2006).

Таким образом, генетические перестройки играют важную роль в патогенезе миелопролиферативных заболеваний, однако, детали процесса остаются выясненными не до конца.

Современные работы свидетельствуют о том, что фиброз более сложный процесс, чем полагают, поскольку он включает активацию и координацию многих клеточных типов, которые вносят прямой и непрямой вклад в фиброгенез. Для более детального описания механизмов, лежащих в основе фиброгенеза, требуются дальнейшие исследования различных типов клеток - участников процесса и их взаимодействий. В связи с этим, в настоящее время значительно возрос интерес к относительно недавно открытой популяции циркулирующих в периферической крови костномозговых предшественников стромальных коллаген продуцирующих клеток, к так называемым фиброцитам.

## **2. Фиброциты – костномозговые предшественники стромальных коллаген продуцирующих клеток в периферической крови**

### **2.1. Открытие фиброцитов при изучении процесса заживления раны**

Мезенхимные стволовые/ стромальные клетки (клетки звездчатой неправильной или веретенной формы) являющиеся предшественниками многих клеток соединительной ткани и поддерживающие ее структуру, долго рассматривались в качестве местного источника тканевых фибробластов и миофибробластов (Schmitt-Graiff et al., 1994; Ngo et al., 2014). Однако, наряду с теорией происхождения активированных фибробластов из локальных резидентных клеток, существовала мысль о происхождении таких фибробластов из гемопоэтических предшественников, циркулирующих в крови. В действительности, идея о том, что матрикс продуцирующие клетки можно получить из периферической крови, впервые была предложена Конгеймом и в дальнейшем обсуждалась в работах Паджета, Мечникова, Фишера и Максимова, т. е. зародилась уже 150 лет назад (Bucala et al., 2007). И только в 1994 Bucala и коллеги при исследовании тканевого репаративного ответа в процессе заживления раны обнаружили популяцию циркулирующих клеток крови, обладающую фибробластическими характеристиками (Col<sup>+</sup>, Vim<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup>) (Bucala et al., 1994).

Для исследования тканевого репаративного ответа в процессе заживления раны ими использовалась подкожно имплантированная раневая камера, заполненная губкой и представляющая собой силиконовую 1,5 см трубку из поливинилового спирта.



Подкожная имплантация этих камер мышам приводила в течение 24 часов к быстрому притоку в нее лейкоцитов периферической крови (нейтрофилов, моноцитов и субпопуляций лимфоцитов). В данном исследовании было показано, что большая доля клеток, собранных через 2 дня из жидкости в имплантированной раневой камере, были адгезивные, веретеновидные и напоминали культуру первичных фибробластов. Эти клетки быстро внедрялись в подкожно-имплантированную раневую камеру и окрашивались как на коллаген 1 и виментин (маркеры фибробластов), так и на CD34 (основной маркер гемопоэтических клеток). Отсутствие окрашивания на неспецифические эстеразы говорило о том, что эти клетки не относятся к моноцитарно - макрофагальной линии. Маркеры эндотелия, эпителия и мышечных клеток также отсутствовали. Напротив, присутствовали маркерные молекулы лейкоцитов. (Bucala et al., 1994) (таблица 1.).

Эти клетки были названы фиброцитами (fibrocytes). Первая часть *Фибро-* отражает их способность к продукции матриксных белков (характеристика фибробластов), вторая - *цит* взят по аналогии с циркулирующими клетками крови (моноцитами, эритроцитами и лейкоцитами) (Bucala et al., 2007). Однако, это обозначение не является удачным, поскольку этим термином в гистологии принято обозначать зрелый не способный к делению фибробласт. Возможно, в дальнейшем, терминология будет пересмотрена или уточнена.

## **2.2. Фиброциты проявляют особенности как гемопоэтических, так и стромальных клеток**

### **2.2.1. Морфология и фенотипическая карта фиброцитов**

Фиброциты составляют 0,1% - 0,5% лейкоцитарных клеток периферической крови и обладают свойствами, которые отличают их от других мононуклеарных клеток (Bucala et al., 1994; Abe et al., 2001; Chasney, Bucala., 2000; Pilling, Gomer, 2012).

С помощью инвертированного микроскопа через 5 дней культивирования РВМС в бессывороточных условиях будет выявляться смешанная культура, в которой адгезионные фиброциты будут демонстрировать вытянутую морфологию (50-200 мкм длинные веретеновидные клетки с овальным ядром) по сравнению с маленькими круглыми лимфоцитами (8-10 мкм), моноцитами (10-15 мкм, двудольное ядро), дендритными клетками (10-15 мкм клетки, с многочисленными разветвленными отростками) и более крупными неправильной формы макрофагами (15-20 мкм, с большим ядром и выраженной цитоплазмой) (Pilling et al., 2009; Pilling, Gomer, 2012) (рис. 3. и 4.).

Таблица 1. Фенотип клеточной поверхности фиброцитов периферической крови человека.  
Bucala et al., 1994

<b>Antigen</b>		<b>Cell Subpopulations</b>
<u>Positive Expression</u>		
Vimentin	Intermediate filament	Fibroblasts
Fibronectin	Pericellular Matrix	Mesenchymal cells, lymphoid cells
Collagen I	Extracellular matrix	Fibroblasts
Collagen III	Extracellular matrix	Fibroblasts
CD11b	Adhesion molecule	Monocytes, granulocytes, NK cells
CD13	Aminopeptidase N	Myeloid and dendritic cells
CD18	Integrin $\beta 2$	Lymphoid and myeloid cells
CD34	Precursor antigen	Hematopoietic progenitors, embryonic fibroblasts
CD45	Leukocytes Common Antigen	Leukocytes
CD71	Transferrin receptor	Macrophages, activated cells
<u>Negative Expression</u>		
Esterase	Lysosomal enzyme	Monocytes and granulocytes
TCR ( $\alpha\beta$ , $\gamma\delta$ )	Antigen receptor	T-Cells
Cytokeratin	Matrix protein	Epithelial cells
von Willebrand	Coagulation factor	Endothelial cells and platelets
Desmin	Intermediate filament	Muscle cells
$\alpha$ -Actin	Cytoskeletal protein	Smooth muscle cells
Laminin	Matrix protein	Blood vessels, muscle cells, nerve, etc.
CD3	TCR-associated antigen	T-Cells
CD4	Class II recognition	Helper/inducer T-cells
CD8	Class I recognition	Cytotoxic/suppressor T-cells
CD10	Endopeptidase (CALLA)	B-cell subpopulations
CD11a	LFA-1 antigen	Lymphoid and myeloid cells
CD14	LBP receptor	Monocytes/macrophages
CD16	Fc $\gamma$ RIII (Ig receptor)	Monocytes, granulocytes, NK cells
CD19	B-cell antigen	B-cells
CD25	IL-2 receptor	Activated macrophages/T-/B-cells
CD33	Pan-myeloid antigen	Myeloid and monocytic cells
CD38	T10 antigen	Precursor cells, activated T-/B-cells
CD44	Lymphocytes homing receptor	Leukocytes and erythrocytes
CD54	ICAM-1	Monocytes and lymphocytes
CD56	NCAM	NK and T-cell subpopulations

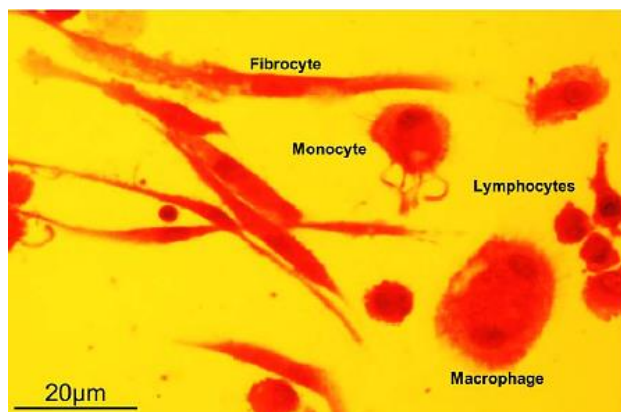


Рис. 3 Дифференцировка фиброцитов крови в бессывороточных условиях по Iqbal et al., 2014.

Окрашивание гематоксилин-эозином фиброцитов после 8 дней культивирования. Наряду с фиброцитами видны другие клетки крови, включая моноциты, лимфоциты и макрофаги

Главной особенностью фиброцитов служит наличие маркеров, характерных как для гемопоэтических клеток (в частности CD34 - маркера гемопоэтических клеток предшественников, CD45- общего лейкоцитарного антигена, CD13<sup>+</sup> - пан лейкоцитарного антигена, LSP-1 белка, специфичного для лимфоцитов, молекулы гистосовместимости второго класса- МНС II), так и маркеров клеток стромы (в основном белков внеклеточного матрикса -коллагенов I и III, фибронектина, виментина и по некоторым работам  $\alpha$ - SMA – маркера миофибробластов) (Vucala et al., 1994; Quan et al., 2004; Pilling et al., 2003). Кроме перечисленных молекул фиброциты синтезируют хемокиновые рецепторы CCR2, CCR7 и CXCR4, которые регулируют их вход в очаги повреждения. Предполагается также их участие в презентации антигена *in vitro* и *in vivo* за счет присутствия поверхностных МНС II и костимуляторных молекул CD80 и CD86 (Chasney et al., 1997). От других типов клеток фиброциты отличает отсутствие окраски на эпителиальные (цитокератин) или эндотелиальные маркеры (CD31 и фактор фон Виллебранда), эстеразы (маркеры моноцитов и макрофагов), а также CD25, CD10, CD38 – маркеры дендритных клеток и CD19 – маркер В- лимфоцитов (Chasney, Vucala, 2000) (таблица 2).

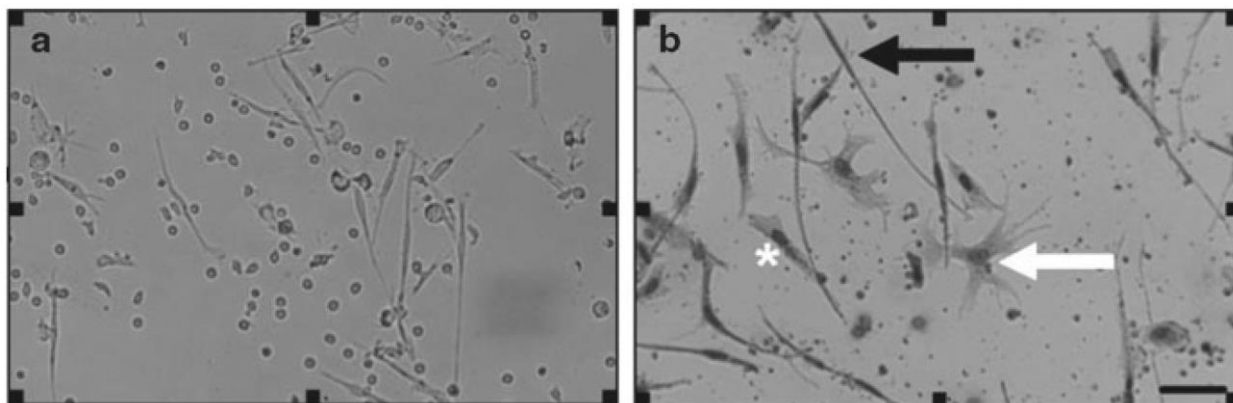


Рис. 4. Появление фиброцитов человека в бессывороточных условиях по Pilling, Gomer 2012

(А) Жизнеспособные человеческие РВМС, культивированные в бессывороточных условиях в течение 5 дней.

(В) РВМС высушенные на воздухе и окрашенные эозином и метиленовым синим. Черная стрелка указывает на фиброцит, белая стрелка указывает на дендритную клетку, а звездочка находится слева от макрофагов. Шкала 50 мкм.

Таблица 2. Поверхностные маркеры фиброцитов. Составлено из Quan et al., 2004 и Pilling et al., 2003 с изменениями

Маркер	Другое название	Присутствие на фиброцитах	Маркер	Другое название	Присутствие на фиброцитах
Collagen I		++	CD1a		-
Collagen III		++	CD3		-
Type I procollagen		++	CD10		-
Prolyl 4-hydroxylase		++	CD14	LBP receptor	-
Vimentin		++	CD19		-
Fibronectin		+/-	CD25	IL-2 receptor	-
$\alpha$ -smooth muscle actin		+/-	CD27		-
CD11a	LFA-1	++	CD28		-
CD11b	MAC-1	++	CD38		-
CD11c		++	CD49c	$\alpha$ 3-integrin	-
CD13	Aminopeptidase N	++	CD49d	$\alpha$ 4-integrin	-
CD18	$\beta$ 2-integrin	++	CD49f	$\alpha$ 6-integrin	-
CD29	$\beta$ 1-integrin	++	CD69		-
CD34		++	CD70	CD27-L	-
CD40		+	CD83		-
CD45R0	LCA(Leykocyte common antigen)	++	CD90		-
CD49a	$\alpha$ 1-integrin	+	CD103	$\alpha$ E-integrin	-
CD49b	$\alpha$ 2-integrin	++	CD109		-
CD49c	$\alpha$ 5-integrin	++	CD154	CD40-L	-
CD54	ICAM-1	+	$\alpha$ 4 $\beta$ 7		-
CD58	LFA-3	+	CLA		-
CD61	$\beta$ 3-integrin	++	CCR2		-
CD71		+	CCR6		-
CD80	B7.1	+	CXCR2		-
CD86	B7.2	++	CXCR5		-
CD105	Endoglin	++	CXCR6		-
CD148		++			
MHC class II DR, DQ, DR		++			
CD162	PSGL-1(P-selectin glycoprotein ligand)	++			
CCR1		+			
CCR3		+			
CCR4		+			
CCR5	CD195	+			
CCR7	CDw197	+			
CCR9		+			
CXCR1		++			
CXCR3		++			
CXCR4	CD184	+			

++сильное окрашивание антигена +слабое окрашивание антигена - нет окрашивания на антиген +/-противоречивые данные

Результаты приведенных работ позволяют говорить о том, что основными маркерами фиброцитов, с которыми работает большинство исследователей, являются CD34, CD45, коллагены и в определенных условиях  $\alpha$ -SMA, который характерен уже для более

дифференцированной стадии клетки, при которой идет потеря других маркеров, например, CD34, CD45, CD13 (Mori et al., 2005).

### 2.2.2. Фиброциты дифференцируются в миофибробласты

Миофибробласты, как считается, играют ключевую роль в тканевом ремоделировании после раневого повреждения и в последующем фиброзе, но вопрос об их происхождении во время этого процесса еще окончательно не решен. В связи с этим значительно возрос в настоящее время интерес к популяции фиброцитов в качестве предполагаемого источника миофибробластов (Yang et al., 2014) (рис. 5.).

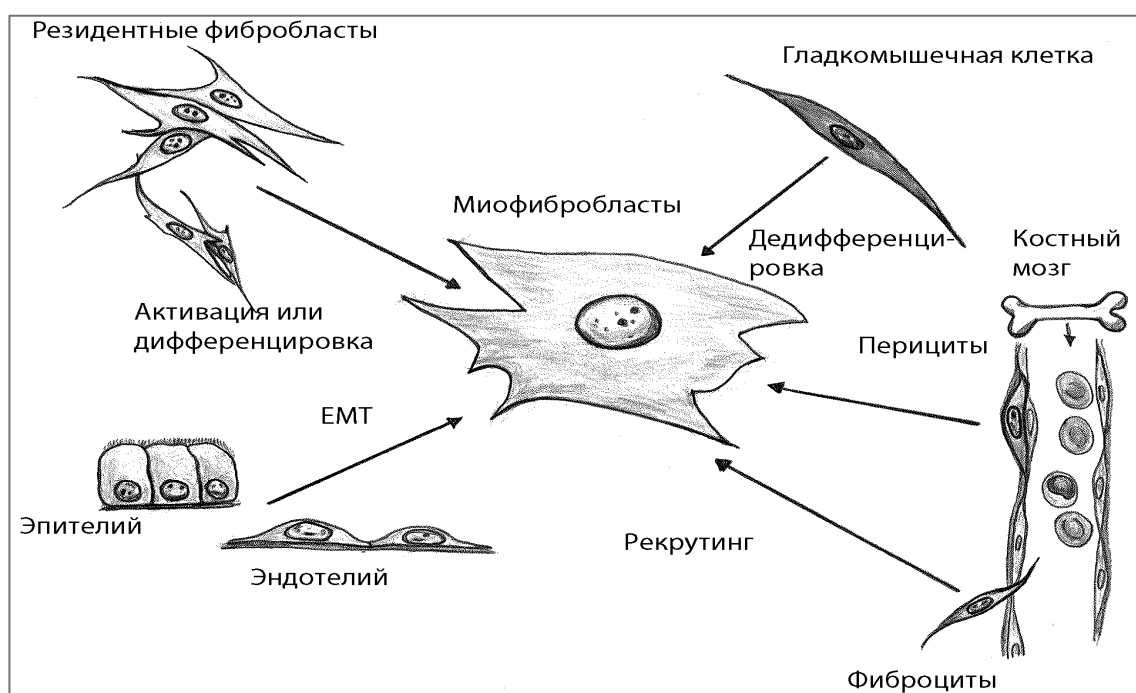


Рис.5 . Источники миофибробластов

Миофибробласты могут образовываться многими путями, например, за счет активации или дифференцировки резидентных фибробластов ткани, дедифференцировки гладкомышечных клеток, эпителиально-эндотелиального перехода части эпителиальных или эндотелиальных клеток, дифференцировки перицитов сосудистой стенки и рекрутирования циркулирующих клеток, вышедших из костного мозга- так называемых фиброцитов. EMT- epithelial-endothelial-mesenchymal transition (эпителиально-эндотелиально-мезенхимный переход), ГМК- гладкомышечная клетка

Есть несколько работ, подтверждающих возможность такого участия фиброцитов в пополнении популяции миофибробластов. В первой было показано, что фиброциты можно индуцировать TGF- $\beta$  на экспрессию  $\alpha$ -SMA и образование клеток, которые были способны сильно сокращать коллагеновый гель *in vitro* (Abe et. al. 2001). В другой работе приведены

данные показывающие, что *in vivo* фиброциты в бронхиальной ткани астматических легких синтезируют  $\alpha$ -SMA и таким образом принимают участие в фиброзе легких (Schmidt et al., 2003).

Чтобы исследовать, способствуют ли фиброциты появлению миофибробластов, в одной из работ изучали фенотип фиброцитов и миофибробластов в поврежденной коже BALB/c мышей. Во время заживления ран наблюдалось значительное увеличение числа клеток, содержащих  $\alpha$ -SMA в гранулярной ткани. Через 4-7 дней после ранения более половины этих клеток были CD13<sup>+</sup> и CD45<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, т.е. проявляли фенотип фиброцитов. Аналогичные эксперименты были проведены на самках мышей, которым после летального облучения всего тела трансплантировали костный мозг самцов. При гибридизации *in situ* авторы идентифицировали Y-хромосому в большинстве ядер фиброцитов, выделенных из раневой ткани этих животных. Это исследование дает прямые доказательства того, что циркулирующие фиброциты происходят из костного мозга и вносят вклад в популяцию миофибробластов в раневой коже. Другим важным аспектом этого исследования является открытие того, что синтез CD34 и CD45 снижается, в процессе дифференцировки фиброцитов в миофибробласты. Эти результаты могут объяснить, почему многие миофибробласты в раневой ткани не содержат CD13 и CD45, поскольку они могут быть фиброцитами, уже завершившими дифференцировку. Следовательно, на этой дифференцировочной стадии происхождение таких миофибробластов трудно определить (Moriet al., 2005).

### **2.2.3. Трудности идентификации фиброцитов**

Фиброциты первоначально идентифицированные как популяция CD34<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup> и / или коллаген 1<sup>+</sup> клеток крови были локализованы в различных тканях как при нормальных, так и в патологических состояниях. Фиброцитоподобные клетки CD34<sup>+</sup> были найдены в рубцовых тканях и в имплантированных раневых камерах. В дальнейшем CD34<sup>+</sup> клетки были описаны в кожных ранах, келоидах, фиброзных тканях, нормальной ткани, а также в ткани эпителиальной и мезенхимальной опухоли. Однако, в связи с тем, что CD34 был единственным маркером, используемым для этих исследований, необходима осторожность при интерпретации полученных результатов (Metz, 2003).

Как уже упоминалось фиброциты определяют в основном по наличию антигенов CD34, CD45, коллагенов 1 и 3 и  $\alpha$ -SMA. Однако, эти антигены характерны и для других типов

клеток и поэтому могут возникнуть трудности в однозначном определении фенотипа фиброцитов.

### ***CD34***

Известно, что эмбриональные фибробласты (имеющие отростчатую морфологию), которые в дальнейшем будут располагаться почти во всех органах, эндотелий сосудов, стромальные и миелоидные клетки костного мозга, дендритные клетки дермы, перициты и даже тучные клетки (Drew et al., 2002) также содержат CD34.

Популяцию таких клеток сначала называли просто «стромальными клетками», «веретенообразными клетками» или «дендритными клетками». Последующие исследования в отношении этого типа клеток дополнительно добавили множество различных терминов, таких как «адвентициальная фибробластическая клетка», «дендритная интерстициальная клетка» или «CD34 - положительная стромальная клетка» (Barth et al., 2007).

Отличие от эндотелия в основном базируется на морфологии и экспрессии CD31 и факторов VIII и Виллебранда (vWF). Резидентные, удлиненные, диспергированные внутри ткани CD34 + фиброциты слабо окрашиваются на CD31 и vWF негативны, тогда как эндотелиальные клетки образуют кольцеобразные структуры (сосуды) и сильно позитивны как по CD31, так и по vWF (Barth et al., 2007; Metz, 2003). Кроме того, эндотелий окрашивается на цитокератин, в отличие от фиброцитов (Pilling et al., 2009)

Вторым важным моментом, который необходимо учесть при определении числа клеток с определенным фенотипом, является возможность потери маркеров CD34 в процессе клеточной дифференцировки. Так, например, существует обратная корреляция между наличием CD34 и синтезом  $\alpha$ -SMA в веретеновидных клетках, появляющихся в поврежденной раной коже (Mori et al., 2005) или коллагена I типа в веретеновидных клетках, найденных в гипертрофических рубцах и келоидах (Aiba, Tagami, 1997). В этом случае будет уместным использовать другие более стабильные лейкоцитарные маркеры в качестве основных (Pilling et al., 2009).

### ***$\alpha$ -SMA***

На данный момент исследователи не пришли к единому мнению, относительно того, не является ли одновременное двойное окрашивание фиброцитов по CD34 и  $\alpha$ -SMA артефактом (Barth et al., 2007) и какова степень вклада фиброцит-миофибробластической дифференцировки в фиброз. Несмотря на то, что  $\alpha$ -SMA был выявлен в фиброцитах после

действия TGF- $\beta$ 1 (Abe et. al. 2001), исследования с использованием трансплантации костного мозга показывают минимальный вклад фиброцитов в продукцию  $\alpha$ -SMA в некоторых моделях, подразумевая, что этот путь дифференцировки не обязательно является доминирующей особенностью фиброцитов в процессе ремоделирования ткани (Herzog, Bucala, 2010).

В 2014 году при исследовании легочного фиброза, была определена этиология избытка стромальных клеток в модели TGF- $\alpha$  - трансгенных мышей. В процессе развития фиброзирования происходило повышенное накопление фиброцитов в фиброзных поражениях, однако, большинство этих клеток не синтезировали  $\alpha$ -SMA и, следовательно, не дифференцировались в миофибробласты. Более того, эксперименты по сокультивированию резидентных фибробластов (CD45<sup>-</sup>/ коллаген1<sup>+</sup>) с фиброцитами (CD45<sup>+</sup>/ коллаген1<sup>+</sup>) продемонстрировали способность фиброцитов стимулировать пролиферацию резидентных фибробластов, что дает основания предполагать регуляторную роль фиброцитов в фиброзе легких (Madala et al., 2014).

### ***Коллаген***

Коллагенположительные фиброциты с низким уровнем гематопоэтических маркеров CD34 и CD45 бывает достаточно трудно отличить от резидентных фибробластов на срезах тканей, тем более, что некоторые антигены, приписываемые фиброцитам выявляются и на фибробластах (CD13, CD68). Однако есть несколько фибробластных маркеров (CD90, FAP, TE-7, клеточный фибронектин или гиалуронан, тенасцин, а также CD248 / endosialin, ER-TR7 и gp38 / podoplanin во время развития и воспаления), которые не обнаруживаются на фиброцитах (Pilling et al., 2009) (рис.6.). Есть также сообщения об уменьшенной способности к пролиферации фиброцитов в культуре по сравнению с фибробластами (Yang et al., 2002).

Как известно при фиброзе происходит избыточное отложение белков внеклеточного матрикса, в основном коллагенов и поэтому представляется важным четкое установление всех продуцирующих его клеток. В нескольких работах был показан более низкий уровень продукции коллагена фиброцитами в сравнении с резидентными фибробластами (Pilling et al., 2009; Madala et al., 2014), что возможно, связано с непрямой ролью фиброцитов в развитие фиброза.



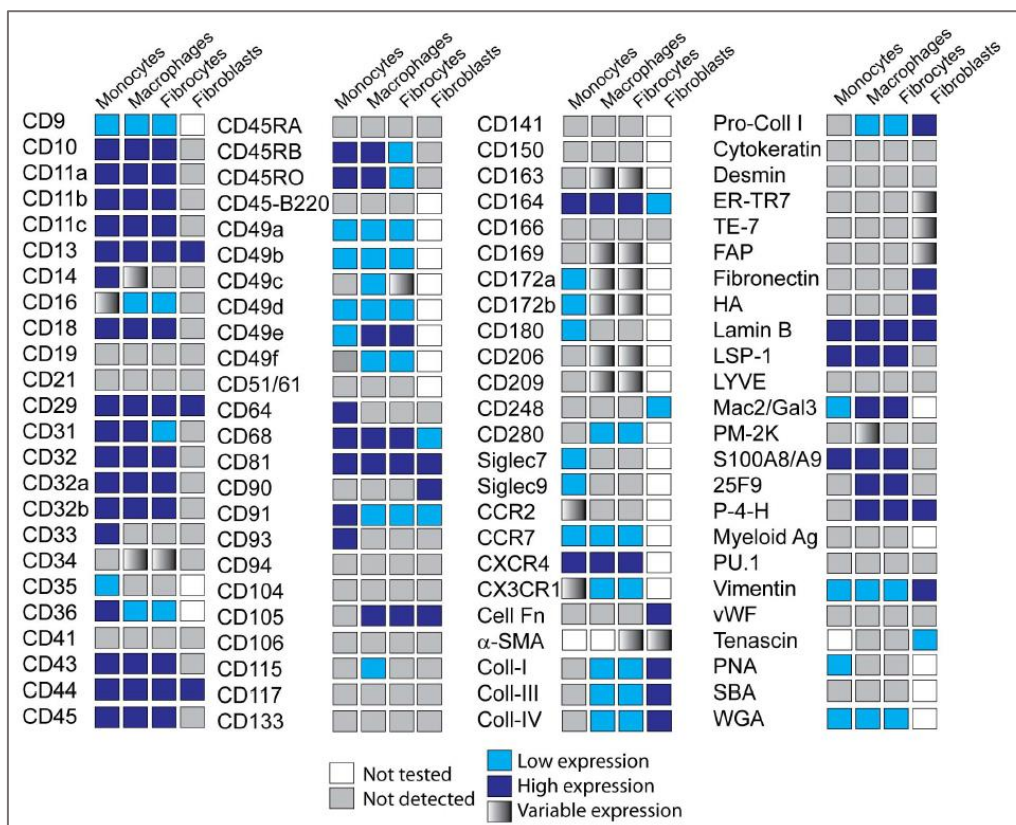


Рис.6 . Сравнительные данные по наличию маркеров на моноцитах, макрофагах, фиброцитах и фибробластах. По Pilling et al., 2009.

В некоторых исследованиях было выявлено окрашивание коллагена на макрофагах, культивируемых либо в бессывороточной среде, либо в сыворотке и M-CSF и предположили, что, либо макрофаги способны продуцировать низкие уровни коллагена, либо должны поглощать коллаген из других источников в культуре. Эти данные свидетельствуют о том, что окрашивание коллагена для выделения CD40+CXCR4+ или CD34+CD45+ макрофагов из CD45+ CXCR4+ коллаген+ или CD34+ CD45+ коллаген+ фиброцитов может быть недостаточным для выделения макрофагов из фиброцитов. Однако, фиброциты после 3 недель культивирования, по сравнению с макрофагами, потеряли антигены CD14 и PM-2K, но сохранили CD49c (α3 integrin) (Pilling et al., 2009).

Подтверждение того, что гемопоэтические клетки хоть и обладают некоторой способностью активировать гены коллагена1, большая его часть в этих клетках является результатом поглощения коллагена, продуцируемого соседними клетками было недавно получено в работе с использованием двойной трансгенной системы Vav-cre / coll1a1<sup>fl/fl</sup> для специфического удаления гена коллагена 1 (coll1a1) в конкретной популяции гемопоэтических клеток. При этом мыши с делецией гена коллагена 1 типа и контрольные

с нормальным генотипом, после повреждения блеомицином (индуктором легочного фиброза), имели сходное количество CD45<sup>+</sup> коллаген1<sup>+</sup> клеток и развивали устойчивый фиброзный ответ (Kleaveland et al., 2014)

Таким образом, в настоящее время нет единого специфического маркера для фиброцитов. Комбинация окрашивания внутриклеточного коллагена и различных гемопоэтических молекул считалась достаточным критерием для выделения фиброцитов из других клеточных популяций. Однако некоторые комбинации маркеров, используемые для идентификации фиброцитов, неадекватно различают разные популяции клеток и могут приводить к завышению или недооценке числа фиброцитов за счет перекрывания антигенов. CD45 и LSP-1 экспрессируются всеми гемопоэтическими клетками, включая лимфоциты, моноциты, макрофаги и фиброциты. CXCR4 экспрессируется Т-клетками, макрофагами, воспалительными фибробластами, а также фиброцитами.

При получении фиброцитов из первичной культуры мононуклеаров периферической крови в качестве наиболее характерных изменений, связанных с ранней дифференцировкой фиброцитов, были указаны изменение формы ядра от бобовидной к небольшому овальному ядру и обширные цитоскелетные перестройки. Это говорит о том, что в настоящее время самыми ранними обнаруживаемыми изменениями в дифференцировке моноцитов в фиброциты являются морфологические изменения, а не конкретные изменения в синтезе рецепторов (Pilling et al., 2009).

### **2.3.Источник фиброцитов**

В 1994 году появилось сообщение о спонтанной трансформации *in vitro* моноцитов (HLA-DR<sup>+</sup>), выделенных из крови пациента, у которого развился легочный фиброз и почечная недостаточность, после иммуносупрессии циклоспорином в связи с прошедшей трансплантацией сердца, в нео-фибробласты. Эти моноциты, культивируемые в RPM1 1640 с добавлением 20% фетальной телячьей сыворотки, спустя 45 дней образовывали клеточные контакты и наблюдалось присутствие коллагеновых фибрилл, выявленных с помощью электронного микроскопа.

Наблюдение за образованием культуры клеток выявило, что после приблизительно 10 дней основную популяцию в культуре составляют моноциты. Через 15 дней культивирования начинают появляться крупные гранулярные, адгезионные макрофаги, а

через 30 дней отмечается присутствие неофибробластных клеток, положительных на антиген 4 пролил гидроксилазы. Уже в этой работе было обнаружено присутствие 4 пролил гидроксилазы, характерной для фибробластов, в HLA-DR<sup>+</sup> макрофагах, которые дают начало этим неофибробластам, что свидетельствовало, по мнению авторов, о прогрессирующей трансформации моноцитов / макрофагов в фибробласты (Labat et al., 1994).

Последующие работы показали, что фиброциты могут быть получены при культивировании *ex vivo* в среде с сывороткой из фракции CD14<sup>+</sup> мононуклеарных клеток (Abe et. al., 2001; Yang et al., 2002), при этом для протекания дифференцировки этих клеток обязателен либо контакт с Т-клетками (Abe et. al., 2001) либо наличие кондиционированной среды от CD14<sup>+</sup> (Yang et al., 2002). Кроме того, очистка фракции мононуклеарных клеток периферической крови с помощью антител против-HLA II класса (удаление всех антигенпрезентирующих клеток) или против CD14 (убирает моноциты) действительно предотвращало появление фибробластоподобных клеток, указывая на то, что такие клетки были получены из моноцитов (Pilling et al., 2003).

Интересно одно сообщение о полученных из CD14<sup>+</sup> моноцитов периферической крови человека клеток с фибробластоподобной морфологией, которые могут дифференцироваться в несколько линий, характерных для мезенхимальных клеток (претерпевать остео-, мио-, хондро- и адиподифференцировку). Авторы назвали эту клеточную популяцию моноцитарными мезенхимальными предшественниками (MOMP). MOMP получали *in vitro* из мононуклеарных клеток периферической крови человека, культивированных на фибронектине, в присутствии фетальной телячьей сыворотки в качестве источника факторов роста (Kuwana et al., 2003). Эти клетки по молекулярным маркерам и происхождению сильно напоминают, полученные ранее фиброциты.

Таким образом фиброциты - это популяция, происходящая из CD14<sup>+</sup> моноцитов периферической крови, которые дифференцируются *in vitro* и *in vivo* в фибробластоподобные клетки.

## **2.4. Функции фиброцитов в норме и при патологии**

Фиброциты представляют собой клетки, полученные из моноцитов, которые обладают свойствами как макрофагов, так и фибробластов (рис.7.). Хотя эти клетки составляют только небольшую часть циркулирующих лейкоцитов у здоровых людей, их количество

повышается в некоторых патологических состояниях, которые характеризуются хроническим воспалением, вызванным макрофагами или активацией фибробластов (Mehrad et al., 2007). Фиброциты вносят вклад в фиброз легких, нефрогенный системный фиброз, сердечно-сосудистые заболевания, аутоиммунные нарушения, первичный миелофиброз (Verstovsek et al., 2016) и даже участвуют в нормальном старении (Reilkoff et al., 2011) (рис.6.). Более того, фиброциты могут усиливать фиброз у мышей, индуцированный блеомицином, через секрецию периостина и другие растворимые факторы, способствующие дифференцировке миофибробластов (Ashley et al., 2016).

Фиброциты играют роль в пролиферативной фазе заживления раны, и, учитывая их раннее появление в месте раны и их способность представлять антиген, они, вероятно, играют роль в первом, воспалительной фазы заживления ран (Quan et al., 2004).

Фиброциты продуцируют ангиогенные факторы и могут существенно влиять на формирование новых кровеносных сосудов. Выработка фиброцитами матричной металлопротеиназы-9 (MMP-9), которая опосредует инвазию эндотелиальных клеток, может дополнительно способствовать процессу ангиогенеза. Дополнительные проангиогенные факторы, присутствующие в избыточных количествах в средах, кондиционированных фиброцитами, включают в себя фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста тромбоцитов А (PDGF-A), макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF), фактор роста гепатоцитов (HGF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), основной фактор роста фибробластов (b-FGF) и фактор роста соединительной ткани (CNTGF). Другие обнаруженные цитокины включают интерлейкин-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) и интерлейкина-8 (IL-8). Открытие значимой экспрессии HLA-DR и ко-стимулирующей молекулы фиброцитами привело к систематическому изучению их антиген-презентирующих свойств *in vitro* и *in vivo* (Chesney et al., 1997).

Повреждение приводит к организованной серии событий, зависимой от клеток участников, белков внеклеточного матрикса и секретируемых сигнальных факторов во внеклеточном пространстве. Эти изменения могут быть достигнуты путем быстрого рекрутирования клеток в микроокружение, трансдифференцировки, пролиферации, гибели клеток и регуляции экспрессии гена / секреции белка. Способность рекрутировать циркулирующие фиброциты к местам повреждения позволяет быстро изменять внеклеточную среду, влияя на поведение структурных клеток во время восстановления и фиброза. Считается, что паракринная функция фиброцитов играет центральную роль в регулировании всех этих динамических событий посредством перекрестных взаимодействий со многими типами клеток (Kleaveland et al., 2014, б)

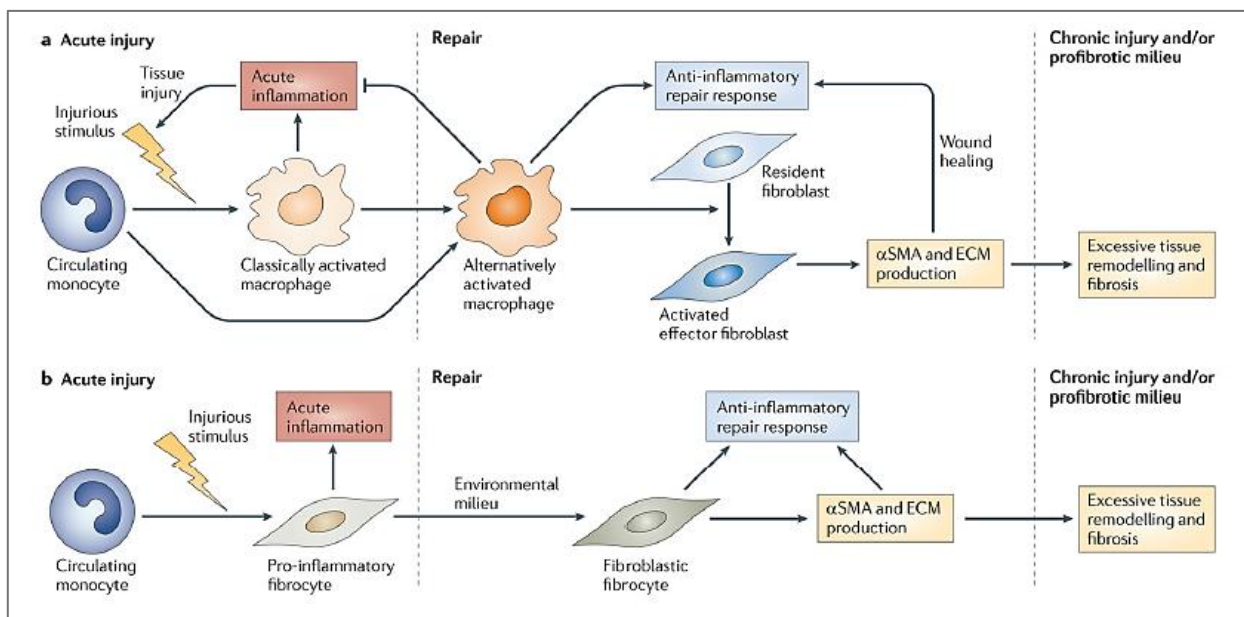


Рис.7. Тканевое повреждение, восстановление и ремоделирование. По Reilkoff et al., 2011

А) Современные модели предполагают, что в ответ на повреждающие стимулы, классически активированные макрофаги проникают в пораженные органы и опосредуют программу острого воспаления. Когда травма прекращается и начинается восстановление, фенотип макрофага смещается в сторону альтернативной активации, чтобы ослабить воспаление и способствовать восстановлению. Эти макрофаги стимулируют резидентные фибробласты к активации, состояния, характеризующегося экспрессией  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ SMA) и повышенной продукцией внеклеточного матрикса (ECM). В условиях тяжелого, постоянного повреждения или профибротической среды этот ответ смещается в сторону избыточного тканевого ремоделирования и фиброза. В) Альтернативная модель восстановления, при которой фиброциты поступают в поврежденные органы, где они участвуют в воспалительных процессах, подобно макрофагам

## **ГЛАВА 2. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Цель работы:** получить фиброциты с мутацией JAK2 V617F, ассоциированной с развитием миелофиброза, и охарактеризовать профибротические свойства этих клеток.

**Задача 1:** оптимизировать условия дифференцировки моноцитов в фиброциты на основе клеточной линии моноцитов ТНР-1.

**Задача 2:** выявить маркеры фиброцитов (в частности коллаген).

**Задача 3:** получить фиброциты из моноцитов ТНР-1 трех типов, используя условия, оптимизированные на первом этапе работы, и сравнить профибротические свойства этих клеток.

А) Сравнить морфологию ТНР

Б) Проанализировать количество матриксных металлопротеиназ.

В) Оценить влияние ТНР на синтетическую активность МСК (на синтез коллагена)

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Культуры клеток.** В работе использовали лентивирусные модификации клеток линии ТНР-1 (острая моноцитарная лейкемия человека): линию с мутацией *Jak2* V617F (mut) и линию с оверэкспрессией гена дикого типа *Jak2* (wt), полученные сотрудниками Лаборатории онкогематологии Силютиной А. А. и Жуком С.В. (Силютина и соавт., 2017). Также в работе использовали мезенхимные стромальные клетки костного мозга (МСК КМ), выделенные сотрудником Лаборатории онкогематологии Абрамовой О.А. из аспирата костного мозга здорового донора. Мононуклеары периферической крови человека были получены из свежей крови здорового донора сотрудником Лаборатории онкогематологии Петуховым А.В.

**Культивирование клеток.** Клетки линии ТНР-1 культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), 50 мкг/мл гентамицина, 2 мМ глутамина и антибиотик (пенициллин и стрептомицин) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, при 37 °С. Для активации и дифференцировки в макрофаги клетки ТНР-1 культивировали в полной среде RPMI 1640, содержащей 50 нг/мл РМА (форбол-12-миристат-13-ацетат) (Sigma-Aldrich). При отработке протокола получения фиброцитов клетки ТНР-1 культивировали в среде *opti*-MEM, содержащей 0.2% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0% или 2.5% FCS и 5 нг/мл РМА. МСК КМ на 2-6 пассажах культивировали в среде *alpha*-MEM, содержащей 10% FCS, 50 мкг/мл гентамицина, 2 мМ глутамина и антибиотик (пенициллин и стрептомицин) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, при 37 °С. Мононуклеары крови культивировали в среде *opti*-MEM, содержащей 0.2% бычьего сывороточного альбумина (BSA), для получения фиброцитов, или в среде *opti*-MEM, содержащей 10 % FCS, для получения макрофагов.

**Сокультивирование МСК КМ и ТНР-1.** МСК КМ рассеивали на стекла в количестве  $2 \times 10^4$  клеток/лунка в 2х24-луночных планшета в полной среде *alpha*-MEM. Спустя 2 сут в одном планшете среду меняли на среду *opti*-MEM, содержащую 0.2% BSA, 0.5% FCS и 5 нг/мл TGFbeta-1. Еще через 2 сут в лунки с МСК КМ рассеивали ТНР-1 в количестве  $10^5$  клеток/лунка. В другом планшете спустя 2 сут после посева МСК КМ среду меняли на аналогичную полную среду *alpha*-MEM, а еще через 2 сут в лунки с культурой МСК КМ добавляли вставки, содержащие полупроницаемые мембраны, в которых предварительно культивировали ТНР-1, активированные 50 нг/мл РМА в течение 4 сут. Сокультивирование проводили в течение 1 недели, меняя среду через день. После чего собирали кондиционированную среду для анализа коллагена методом иммуноблоттинга, а клетки на

стеклах фиксировали 4% параформальдегидом, блокировали 1% BSA в PBS 30 мин и проводили иммунофлуоресцентную окраску. Смешанную культуру окрашивали смесью антител – первичными поликлональными антителами против коллагена I типа (AB745, Chemicon, разведение 1:50), и моноклональными антителами против CD 31 (разведение 1:50) для выявления моноцитов THP-1, затем стекла отмывали и окрашивали вторичными антителами против кроличьего иммуноглобулина, конъюгированного с фикоэритрином (разведение 1:300), и антителами против мышинового иммуноглобулина, конъюгированного с красителем Alexa 488. После отмывки препараты окрашивали красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США, разведение 1:500) для выявления ядер. Клетки МСК КМ, которые культивировали со вставками, содержащими THP-1, окрашивали только антителами против коллагена I типа (AB745, Chemicon, разведение 1:50) и красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США, разведение 1:500). Стекла отмывали и заключали в среду для заключения (Vectashield H-1000). Окрашивание визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Германия).

**Морфометрия.** Клетки THP-1 трех типов культивировали в течение 5 суток в присутствии РМА, затем их фиксировали 4% параформальдегидом, пермеабелизировали 0.1% тритоном X-100 и окрашивали флуоресцентно-меченым фаллоидином (Sigma-Aldrich) и DAPI (Sigma-Aldrich). Окрашивание визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Observer (Carl Zeiss, Германия). Полученные снимки обрабатывали в программе ImageJ. Контуры клеток обводили вручную, после чего программа измеряла их площадь и периметр. Также программой была вычислена вытянутость клеток (или коэффициент поляризации,  $M/m$ ), численно равный соотношению длинной ( $M$ ) и короткой ( $m$ ) осей эллипса, рассчитываемых автоматически программой ImageJ при оконтуривании клеток (Kuz'minykh, Petrov, 2004).

**Проточный цитофлуориметрический анализ (FACS).** Клетки THP-1, активированные форболовым эфиром, снимали с пластика с помощью раствора трипсин-версена, ингибировали действие фермента и метаболическую активность клеток раствором PBS, содержащим 10% FCS и 1% NaN<sub>3</sub>. Промывали клетки раствором PBS и фиксировали в течение 10 минут раствором PBS, содержащим 4% параформальдегид и 0.05% сапонин. Клетки отмывали от параформальдегида раствором PBS, после чего инкубировали в блокирующем буфере, содержащем PBS, 1% BSA и 0.05% сапонин, в течение 30 мин. Затем клетки инкубировали в течение 1 ч с первичными моноклональными антителами против коллагена I типа (Calbiochem CP17; разведение 1:50), растворенными в блокирующем буфере. Клетки отмывали от первичных антител и инкубировали в течение 1 ч с



флуоресцентными вторичными антителами против мышинового иммуноглобулина (PE-Alexa Flour 647) в блокирующем буфере. После отмывки от вторичных антител клетки помещали в раствор PBS и анализировали на проточном цитометре Guava EasyCyte (Merck Millipore, Германия). Для настройки прибора использовали те же активированные PMA клетки ТНР-1, которые обрабатывали точно также, только без использования антител. Таким же образом были проанализированы суспензионные моноциты ТНР-1 со своим неокрашенным контролем. В качестве положительного контроля окрашивания коллагена I типа использовали клетки МСК КМ, которые окрашивали аналогичным способом, и для которых был использован соответствующий неокрашенный контроль.

**Электрофорез белков и Вестерн-блоттинг.** Электрофорез проводили по стандартному протоколу (Laemmli, 1970) в денатурирующих, восстанавливающих условиях с использованием 7.5% полиакриламидного геля. В пробы сред, кондиционированных МСК КМ, или активированными PMA клетками ТНР-1, или совместной культурой МСК КМ и ТНР-1, добавляли 4-кратный 100 мМ Tris-буфер (рН 6.8), содержащий 40 % глицерина, 4 % SDS, 0.02 % бромфенолового синего и 0.4 М дитиотреитола (проба : буфер – 3 : 1) и кипятили в течении 5 минут при 100 °С. В лунки геля вносили по 25 мкл приготовленных кондиционированных сред. Электрофорез проводили при переменном напряжении и постоянной силе тока 10-20 мА/гель в электрофоретической системе Mini-PROTEAN Tetra Cell фирмы BioRad.

После проведения электрофореза осуществляли перенос белков с гелей на нитроцеллюлозные мембраны в системе для «мокрого переноса» Mini Trans-Blot Cell фирмы BioRad. Перенос проводили при постоянном напряжении 100 V и переменном токе в течение 2 ч. После чего мембраны промывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,05% Tween 20 (Т-PBS) и инкубировали в блокирующем буфере, содержащем Т-PBS и 5 %-ное обезжиренное молоко, в течение 1 ч. Затем мембраны инкубировали в течение ночи при +4° С или 2 часа при комнатной температуре в блокирующем буфере, содержащем первичные поликлональные антитела против коллагена I типа (Chemicon, АВ745, разведение 1:500), которые использовали для анализа коллагена в смешанной культуре ТНР-1 и МСК КМ (рис. 3.7.), или моноклональные антитела против коллагена I типа (Calbiochem СР17, разведение 1:500), которые использовали для анализа коллагена в монокультуре ТНР-1 или МСК КМ (рис. 3.4). Мембраны промывали буфером ТРBS и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичными антителами против мышинового иммуноглобулина, конъюгированного с пероксидазой хрена (HRP) (Thermo Scientific, #31431, разведение 1:20000) или со вторичными антителами против кроличьего

иммуноглобулина, конъюгированного с HRP (Sigma, A0545, разведение 1:20000) в блокирующем буфере. После отмытки от вторичных антител TPBS и PBS детектирование связавшихся антител проводили методом хемилюминесценции с помощью субстрата фирмы Thermo Scientific (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, #34095) на приборе Fusion-FX фирмы Vilber Lourmat. Полученные цифровые изображения анализировали с помощью программного обеспечения, поставляемого вместе с прибором, а именно, проводили денситометрию окрашенных белковых полос.

**Желатиновая зимография.** Моноциты THP-1 рассеивали в количестве  $10^5$  клеток на  $1 \text{ см}^2$  в среде RPMI + 10% FBS, содержащей 50 нг/мл PMA. В присутствии PMA моноциты переставали делиться и дифференцировались в макрофаги. Клетки культивировали в течение 5 сут, затем переводили на среду RPMI + 1% FBS на 1 сут. После чего кондиционированную среду собирали и анализировали в ней содержание MMP2 и MMP9 методом зимографии. В качестве субстрата использовали желатин. Пробы смешивали с SDS-содержащим буфером без нагревания, после чего проводили электрофорез с помощью системы для проведения белкового электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell Systems компании Bio-Rad Laboratories (США). Гель (10 % акриламида) содержал 1 мг/мл желатина. Пробы наносили в количестве 15 мкл на дорожку – для анализа MMP2, и 1 мкл на дорожку – для анализа MMP9. После проведения электрофореза гель промывали 2.5%-ным раствором Тритона X-100 2 раза по 30 мин, после чего гель инкубировали в буферном растворе, содержащем 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Спустя 24 ч гель окрашивали Кумасси синим G-250; при этом зоны, содержащие MMP, проявлялись в виде неокрашенных полос. Гели сканировали, а полученные изображения подвергали денситометрии на приборе Fusion-FX (Vilber Lourmat, Германия) с помощью программного обеспечения, поставляемого вместе с прибором.

**Статистический анализ.** Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel 2010 (MS Corporation, США). Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок средних. Статистическую достоверность различий между пробами оценивали с помощью t критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при вероятности нулевой гипотезы  $P < 0.05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Задача 1:** Оптимизация условий дифференцировки моноцитов в фиброциты на основе клеточной линии моноцитов ТНР-1.

Перед нами стояла задача подобрать условия культивирования клеток моноцитарной линии ТНР-1 для получения фиброцитов. Сложность ее обусловлена тем, что по данным литературы фиброциты в различных исследованиях получали всегда только из первичной культуры (Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1997; Pilling et al., 2003; Pilling et al., 2009). В первых работах фиброциты культивировали с использованием 10-20 % сыворотки (Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1997; Labat et al., 1994) в более современных скорее используются бессывороточные условия (Pilling, Gomer, 2012; Iqbal et al., 2014; Verstovsek et al., 2016). Веретеновидные адгезивные клетки образовывались, только начиная с 10-20 дня культивирования в присутствии сыворотки или уже на 3-7 день в бессывороточной среде (Pilling, Gomer, 2012). Предполагается, что такая дифференцировка фиброцитов из моноцитов периферической крови ингибируется сывороточным амилоидом Р (SAP) (Pilling et al., 2003).

Для сравнения возможности образования фиброцитов в первичной и перевиваемой культурах были взяты моноциты крови здорового донора и линейные клетки моноцитарной лейкемии ТНР-1. Обе линии культивировали как в 0%, так и 10% FCS в течение 10 сут., когда в культуре уже должны образоваться фиброциты. В среде без сыворотки при длительном культивировании мононуклеары крови дифференцируются в клетки веретеновидной формы, очевидно, представляющие собой фиброциты, при этом часть популяции представлена, видимо, макрофагами, которые имеют круглую форму или содержат несколько отростков (рис. 3.1.). В полной среде с сывороткой образуются преимущественно макрофаги, но также встречаются и веретеновидные клетки, похожие на фиброциты. Таким образом, мононуклеары крови образуют смешанную популяцию фиброцитов и макрофагов *in vitro*: отсутствие сыворотки обогащает популяцию фиброцитами, а ее наличие – макрофагами. При этом моноциты ТНР-1 остаются преимущественно в суспензионном состоянии независимо от наличия или отсутствия сыворотки

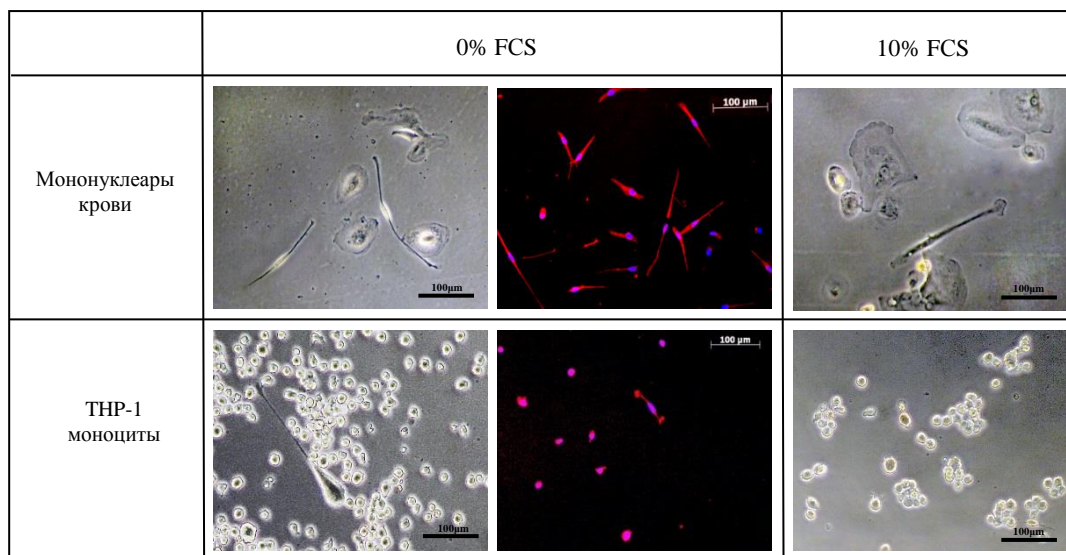


Рис. 3.1. Культивирование мононуклеаров крови и моноцитов линии ТНР-1 в присутствии и отсутствие сыворотки в течение 10 сут.

Фазовый контраст (1 и 3 ряд), иммунофлюоресцентное окрашивание с окраской β-актина (красный) и ядер (синий) (2 ряд)

Исходя из того, ТНР-1 в основном оставались в суспензионном состоянии независимо от наличия или отсутствия сыворотки мы стали подбирать условия, способствующие получению адгезионных веретеновидных клеток. Изучение влияния среды, содержащей сыворотку при добавлении форболового эфира показало, В присутствии 10 или 2,5% сыворотки и форболового эфира (РМА в концентрации 50 или 5 нг/мл) моноциты ТНР-1 дифференцируется в разные типы клеток, морфологически схожие как с макрофагами, так и с фиброцитами (рис. 3.2). Следовательно, культура ТНР-1 моноцитов образуют смешанную популяцию фиброцитов и макрофагов *in vitro* аналогично мононуклеарам периферической крови.

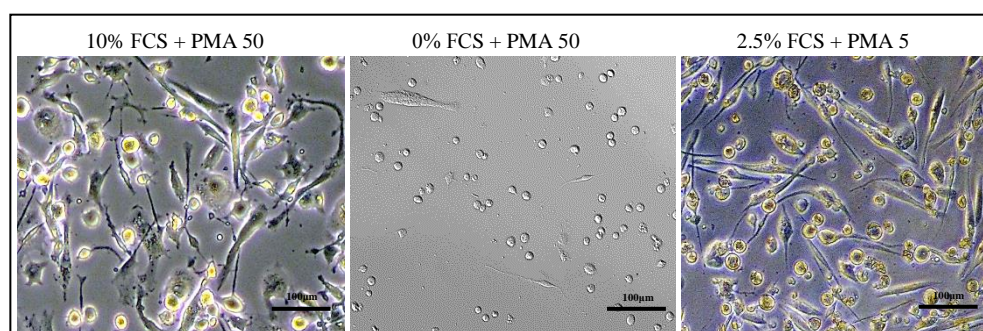


Рис. 3.2.. Оптимизация условий получения фиброцитов из моноцитов линии ТНР-1 посредством варьирования концентрации сыворотки (0; 2,5 и 10%) и форболового эфира - РМА (5 и 50 нг/мл).

Было замечено, что адгезия ТНР-1 в присутствии КМ МСК приближается к 100% и не зависит от наличия сыворотки (рис.3.3). Однако, лишь некоторые прикрепленные клетки принимают веретенообразную форму, схожую с морфологией фиброцитов, остальные клетки остаются не распластанными, круглыми, нет клеток, похожих на макрофаги. Следовательно, совместное культивирование с МСК может служить еще одним способом получения адгезионных ТНР-1.

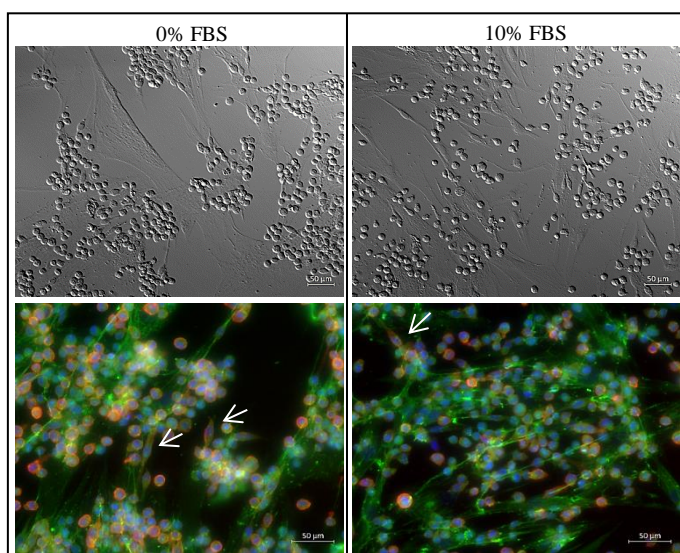


Рис. 3.3. Сокультивирование моноцитов ТНР-1 с МСК костного мозга в 0% и 10% сыворотке.

Фазовый контраст и иммунофлуоресцентное окрашивание смешанной культуры МСК и моноцитов ТНР-1 антителами против коллагена I типа (зеленый) и CD31 – маркера гемопоэтических клеток (красный). Стрелками показаны вытянутые клетки ТНР-1, морфологически схожие с фиброцитами

Таким образом, обязательными условиями для получения фиброцитов из моноцитов ТНР-1, исходя из адгезии и морфологии клеток, являются наличие сыворотки и РМА, а также совместное культивирование ТНР-1 с КМ МСК. Полученная в присутствии 10% сыворотки и РМА, клеточная линия моноцитов ТНР-1, дает смешанную культуру клеток и, следовательно, используя данный протокол, получить только фиброциты сложно. Возможным решением будет снижение количества сыворотки или форболового эфира (до 2.5 и 5 нг/мл соответственно), которое может обогатить смешанную культуру фиброцитами.

## **Задача 2: Выявление маркера фиброцитов – коллагена I типа.**

Результаты проточной цитофлюорометрии показали, что некоторая часть (6%) суспензионных моноцитов уже содержит коллаген I, тогда как добавление РМА стимулирует клетки ТНР-1 на выработку коллагена I типа (47%) (рис. 3.4.). Культура МСК, взятая в качестве положительного контроля, демонстрирует почти полное окрашивание

клеток на коллаген 1 (98%), в сравнении с адгезионными клетками ТНР-1. Отсутствие окрашивания вестерн блота говорит о том, что ТНР-1 не синтезируют коллаген в культуральную среду и, следовательно, основной коллаген в ТНР-1 внутриклеточный. Во многих работах коллаген рассматривают в качестве одного из базовых маркеров фиброцитов (Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1997; Pilling et al., 2003; Pilling et al., 2009). Напротив, есть убедительные данные о том, что коллаген, выделяемый соседними клетками может поглощаться фиброцитами из среды и давать ложноположительный результат (Kleaveland et al., 2014). Исходя из этого утверждения, получить коллаген<sup>+</sup> клетки из клеточной монокультуры, не обладающей фибробластическими свойствами, т. е. не синтезирующей матрикс, не представляется возможным. Наши данные подтверждают сообщения о наличии в основном внутриклеточного коллагена в фиброцитах, однако, остается неясным источник этого коллагена. Скорее всего резкое повышение процента коллагенположительных клеток осуществляется за счет стимуляции его синтеза самими клетками, поскольку в противном случае изначально в культуре должны присутствовать очень активные клетки – продуценты коллагена.

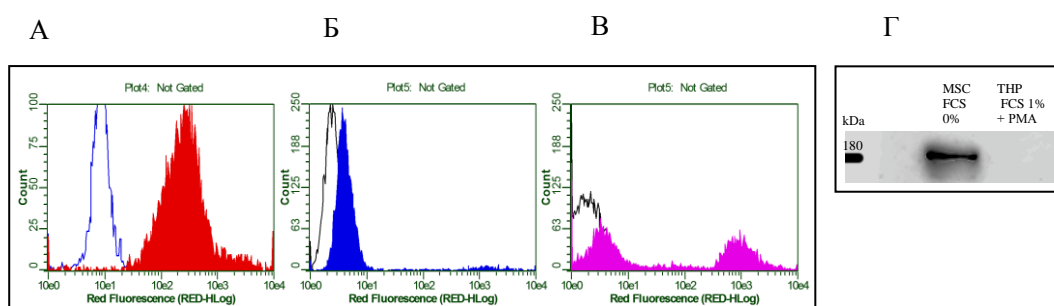


Рис. 3. 4. Выявление маркера фиброцитов – коллагена I типа с помощью проточной цитофлуорометрии (А, Б, В) и вестерн – блоттинга (Г).

А) Контрольные неокрашенные МСК - синий пик и коллагенположительные МСК - красный пик) (98%) Б) Неокрашенные ТНР-1 в суспензии - черный пик, коллаген<sup>+</sup> ТНР-1 в суспензии - синий пик (6%) В) Адгезионные неокрашенные ТНР-1 - черный), адгезионные ТНР-1 после PMA - малиновые пики (47 %). Г) Вестерн- блот, окраска кондиционированных сред МСК в 0% FCS и ТНР-1 после PMA в 1% FCS на коллаген I типа.

**Задача 3:** Получение фиброцитов из моноцитов ТНР-1 трех типов, используя условия, оптимизированные на первом этапе работы, и сравнение профибротических свойств этих клеток.

1) Анализ морфологии ТНР

Морфология моноцитов ТНР-1, активированных РМА, отличается у клеток с мутацией JAK2 V617F (mut) и оверэкспрессией нормального гена киназы JAK2 (wt) по сравнению с немодифицированными клетками (ctrl): клетки более однородные по форме, имеют меньше отростков, больше напоминают фиброциты (рис. 3. 5.).

Результаты морфометрии клеток продемонстрировали достоверное усиление вытянутости и уменьшение распластанности в активированных РМА моноцитах ТНР-1 с мутацией JAK2 V617F (mut) по сравнению с немодифицированными клетками дикого типа (ctrl) (рис. 3. 6.). Это может означать, что доля фиброцитов больше в популяции модифицированных клеток по сравнению с немодифицированными. При длительном культивировании фиброцитов, полученных из культур РВМС от ожоговых пациентов и нормальных индивидуумов обращают на себя внимание выраженные различия в морфологии клеток: количество веретенообразных фиброцитов у пациентов с ожогами выше, тогда как клетки здоровых доноров возвращаются к распластанной морфологии (Yang et al., 2002). Вероятно, приобретение такой вытянутой морфологии клетками может быть связано с изменением их свойств, например, с повышенем инвазивности или повышением продукции матриксных или иных белков (поскольку основной продуцент фибрилл коллагена, фибробласт, обладает веретеновидной формой).

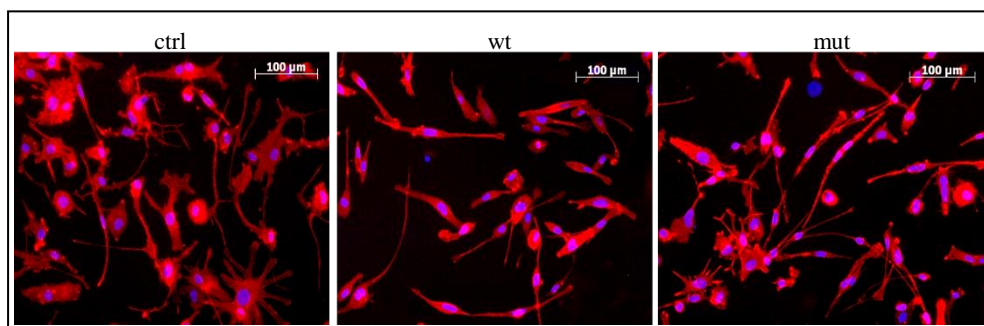


Рис. 3. 5. Сравнение морфологии ТНР-1 в модифицированных и немодифицированных лентивирусом клетках после активации РМА.

Имунофлуоресцентное окрашивание фибриллярного  $\beta$ -актина – красный, ядер – синий. ctrl – немодифицированные клетки, wt – клетки с оверэкспрессией нормального гена JAK2, mut – клетки, модифицированные лентивирусом с мутацией JAK2 V617F

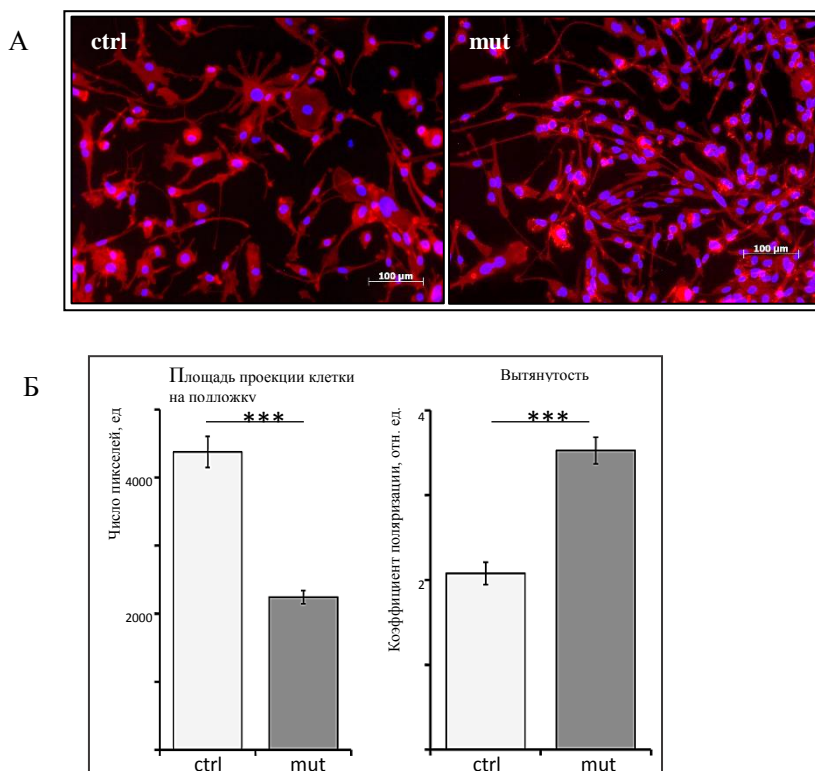


Рис. 3. 6. Результаты морфометрического анализа модифицированных и контрольных клеток THP-1, активированных PMA.

А) Иммунофлуоресцентное окрашивание фибриллярного  $\beta$ -актина – красный, ядер – синий моноцитов THP-1. Б) Морфометрия клеток по параметрам площади проекции клетки на подложку и вытянутости. ctrl – немодифицированные клетки, mut – клетки, модифицированные лентивирусом с мутацией JAK2 V617F

## 2) Анализ количества матриксных металлопротеиназ

Чтобы проанализировать содержание MMP2 и MMP9 был использован метод желатиновой зимографии. Результаты представлены на рис. 3. 7. В кондиционированной среде модифицированных клеток THP-1 (wt, mut) после культивирования в 1% FCS с PMA происходит увеличение количества MMP2, тогда как в немодифицированных (ctrl) клетках, такого эффекта не наблюдается. Известно, что MMP участвуют во многих аспектах клеточной миграции и ремоделирования тканей (Aimes, Quigley, 1994). Более того изменения в системе MMP/TIMP могут приводить к нарушению оборота матриксных белков и их избыточному отложению (Wang et al., 2011). Фиброциты, как считается, приходят из костного мозга и вторгаются в сайт повреждения для осуществления своих дальнейших функций (Schmidt et al., 2003). Следовательно, возможным объяснением увеличения MMP2 в модифицированных лентивирусной конструкцией клетках может служить приобретение моноцитами способности к инвазии на ранних стадиях дифференцировки в фиброциты, за счет активирующего действия PMA.



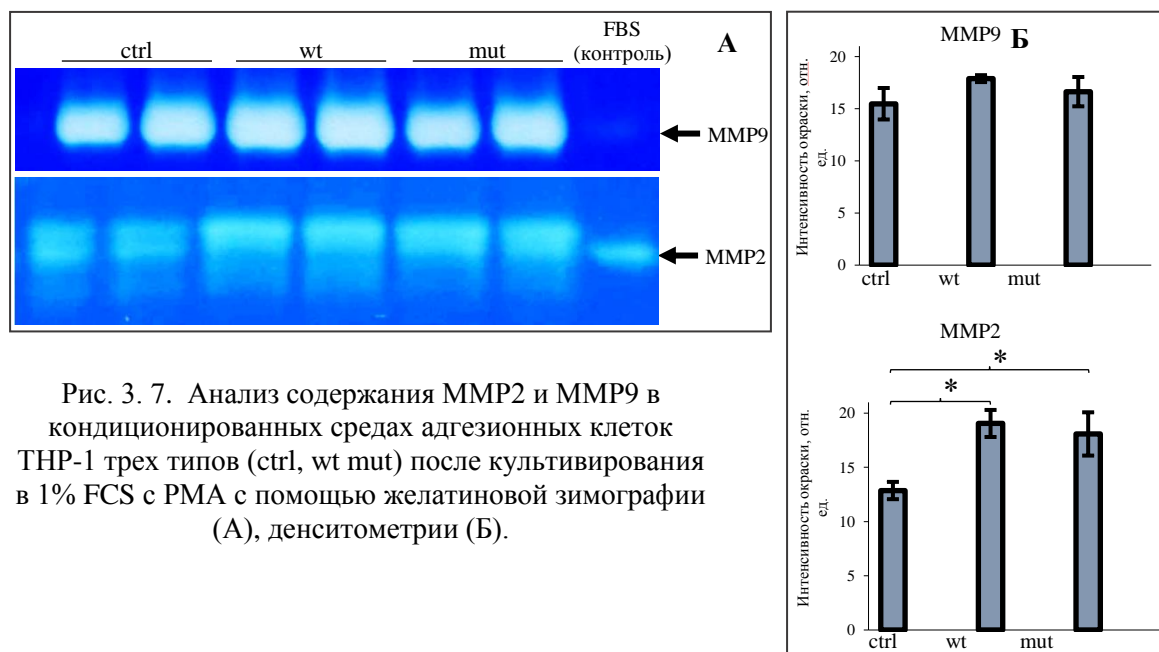


Рис. 3. 7. Анализ содержания MMP2 и MMP9 в кондиционированных средах адгезионных клеток THP-1 трех типов (ctrl, wt mut) после культивирования в 1% FCS с PMA с помощью желатиновой зимографии (А), денситометрии (Б).

### 3) Оценка влияния THP на синтетическую активность МСК - синтез коллагена

Чтобы оценить влияние THP моноцитов на стромальные КМ МСК было проведено прямое сокультивирование МСК и моноцитов в среде с низким содержанием сыворотки (0,5%) и добавлением TGFβ-1 наряду с сокультивированием МСК и моноцитов, разделенных полупроницаемой мембраной, где моноциты, активированные PMA в 10% FCS, помещали в трансвеллы (рис. 3. 8.). Наблюдалось усиление синтеза коллагена в клетках МСК костного мозга в присутствии моноцитов с мутацией JAK2 V617F. Фиброциты могут стимулировать фибробласты к повышенной выработке компонентов внеклеточного матрикса и способствовать фиброзу косвенным путем (Wang et al., 2007). При этом дифференцировка моноцитов в фиброциты зависит от условий и состава среды (Medina et al., 2010). В нашем опыте было показано, что фиброциты, полученные из моноцитов THP-1 также могут активировать стромальные клетки, в частности МСК КМ на синтез коллагена I типа, т. е. проявлять свойства аналогичные свойствам фиброцитов из периферической крови.

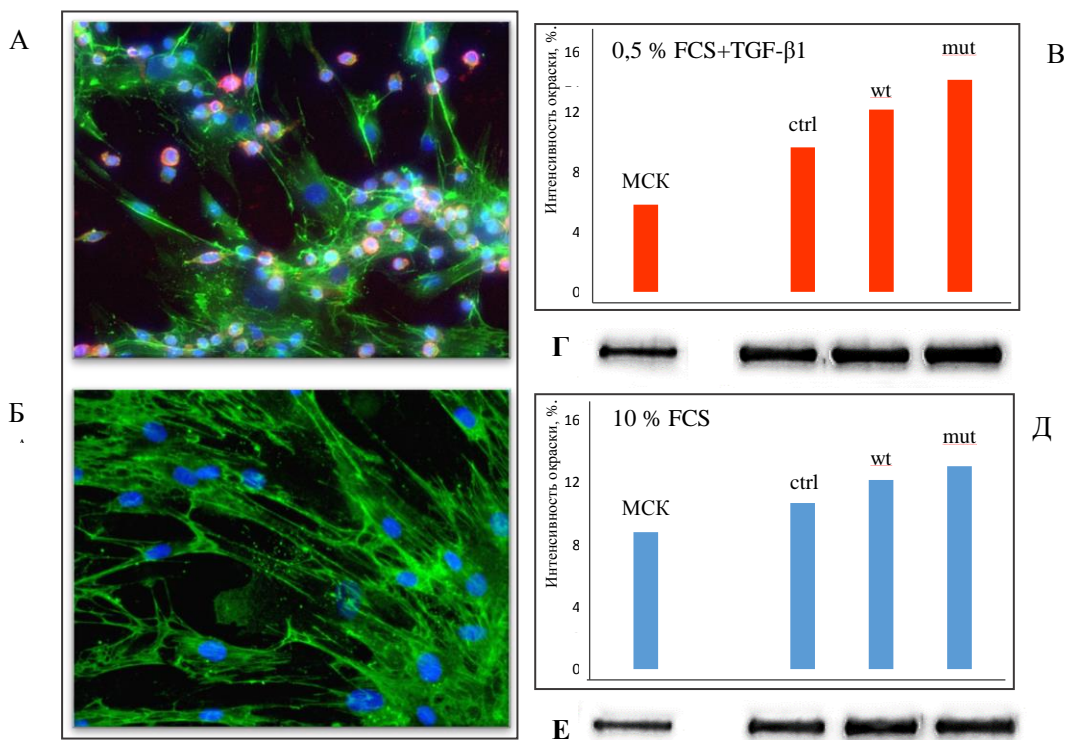


Рис. 3. 8. Оценка влияния TLR-1 моноцитов трех типов на синтез коллагена клетками КМ МСК посредством иммунофлуоресцентного окрашивания (А, Б), денситометрии (В, Д) и вестерн блоттинга (Г, Е).

Иммунофлуоресцентное окрашивание коллагена I типа - зеленый, CD31/моноцитов – красный, ядер - синий (А), вестерн блот, окраска на коллаген I типа (Г) и денситометрия (В) клеток при прямом сокультивировании МСК и моноцитов в среде с низким содержанием сыворотки и добавлением TGF $\beta$ -1. Иммунофлуоресцентное окрашивание коллагена I типа - зеленый, ядер – синий (Б), вестерн блот (Д) и денситометрия (Е) клеток при сокультивировании МСК и моноцитов, разделенных полупроницаемой мембраной (моноциты, активированные РМА в 10% FCS, помещаются в трансвеллы).

## ВЫВОДЫ

- Общепринятый протокол получения фиброцитов из первичной культуры периферических мононуклеаров крови в бессывороточной среде не подходит для получения фиброцитов из клеточной линии моноцитов ТНР-1: клетки остаются в суспензионном состоянии и не дифференцируются. Добавление форболового эфира в среду культивирования приводит к дифференцировке моноцитов, при этом образуется смешанная популяция клеток, морфологически схожих как с макрофагами, так и с фиброцитами. Уменьшение содержания сыворотки и форболового эфира в среде культивирования увеличивает долю веретенновидных клеток, схожих с фиброцитами.
- Прямое сокультивирование моноцитов линии ТНР-1 и КМ МСК позволяет получить адгезионные моноциты без применения форболового эфира в бессывороточных условиях. При этом клетки прикрепляются вдоль коллагеновых фибрилл или на поверхность КМ МСК.
- Моноциты ТНР-1, активированные форболовым эфиром, синтезируют маркер фиброцитов – коллаген I типа. Доля клеток, положительных по коллагену I типа, составляет 47%.
- Активированные форболовым эфиром моноциты ТНР-1, несущие мутацию JAK2 V617F, достоверно более вытянутые, чем немодифицированные клетки дикого типа, что указывает на сдвиг в сторону образования фиброцитов.
- Клетки ТНР-1 с экспрессией JAK2 синтезируют повышенное количество MMP2 по сравнению с немодифицированными клетками.
- Моноциты ТНР-1 с мутацией JAK2 V617F стимулируют синтез коллагена в клетках КМ МСК, что свидетельствует о возможной роли моноцитов в патогенезе миелофиброза.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдулкадыров К. М., Шуваев В. А., Мартынкевич И. С. (2013) Критерии диагностики и современные методы лечения первичного миелофиброза// Вестник гематологии., том IX., № 3., стр. 45,46-48,48-49
- Abe R., Donnelly S. C., Peng T., Bucala R., Metz C. N. (2001) Peripheral Blood Fibrocytes: Differentiation Pathway and Migration to Wound Sites// Journal Immunology., 166:7556-7562
- Aiba S., Tagami H. (1997) Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids// Journal of Cutaneous Pathology., 24:65–69.
- Ashley S.L., Wilke C.A., Kim K.K., Moore B.B. (2016) Periostin regulates fibrocyte function to promote myofibroblast differentiation and lung fibrosis// Society for Mucosal Immunology., p. 1-11
- Barth P. J., Westhoff C. C. (2007) CD34+ Fibrocytes: Morphology, Histogenesis and Function// Current Stem Cell Research & Therapy., 2:221-227
- Bucala R., Spiegel L. A., Chesney J., Hogan M., Cerami A. (1994) Circulating Fibrocytes Define a New Leukocyte Subpopulation That Mediates Tissue Repair// Molecular Medicine., 1:71-81
- Bucala R. (2007) Fibrocytes: new insights into tissue repair and systemic fibroses // Fibrocytes: Discovery of a Circulating Connective Tissue Cell Progenitor/ World Scientific Publishing Co. Pte., p. 268, 2-3
- Chesney J., Bucala R. (2000) Peripheral Blood Fibrocytes: Mesenchymal Precursor Cells and the Pathogenesis of Fibrosis// The National Academy of Sciences., 2:501–505
- Chesney J., Bacher M., Bender A., R. Bucala (1997) The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ// Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94:6307–6312
- Drew E., Merkens H., Chelliah S., Doyonnas R., McNagny K. M. (2002) CD34 is a specific marker of mature murine mast cells// Experimental Hematology 30., 1211–1218
- Herzog E. L., Bucala R. (2010) Fibrocytes In Health And Disease// Exp Hematol., 38(7):548–556.

Iqbal S. A., Hayton M. J., Watson J. S., Szczypa P., Bayat A. (2014) First Identification of Resident and Circulating Fibrocytes in Dupuytren's Disease Shown to Be Inhibited by Serum Amyloid P and Xiapex//PLOS ONE., Vol. 9., 6:1-11

Kisseleva T., Brenner D. (2008) Fibrogenesis of Parenchymal Organs// Proceedings of the American Thoracic Society., Vol. 5., p. 338–342

Kleaveland K. R., Velikoff M., Yang J., Agarwal M., Rippe R. A., Moore B. B., Kim K. K. (2014 a) Fibrocytes Are Not an Essential Source of Type I Collagen During Lung Fibrosis// Journal Immunology., 193(10):5229–5239

Kleaveland K. R., Moore B. B., Kim K. K. (2014 b) Paracrine Functions of Fibrocytes to Promote Lung Fibrosis// Expert Rev Respir Med., 8(2): 163–172.

Kuwana M., Okazaki Y., Kodama H., Izumi K., Yasuoka H., Ogawa Y., Kawakami Y., Ikeda Y. (2003) Human circulating CD14<sup>+</sup> monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation// Journal of Leukocyte Biology., Vol. 74., p. 833-845

Labat M. L., Bringuier A. F., Arys-Philippart C., Arys A., Wellens F. (1994) Monocytic origin of fibrosis. In vitro transformation of HLA-DR monocytes into neo-fibroblasts: inhibitory effect of all-trans retinoic acid on this process// Biomed & Pharmacother., 48:103-111

Le Bousse-Kerdilès, M.C., Martyré M.C., Samson M. (2008) Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review// Eur. Cytokine Netw., Vol. 19., № 2., p. 69-80

Madala S. K., Edukulla R., Schmidt S., Davidson C., Ikegami M., Hardie W. D. (2014) Bone Marrow-Derived Stromal Cells Are Invasive and Hyperproliferative and Alter Transforming Growth Factor- $\alpha$  Induced Pulmonary Fibrosis// Am. J. Respir. Cell Mol Biol., Vol. 50., № 4., p. 777–786

Metz C. N. (2003) Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound Healing// Cellular and Molecular Life Sciences., 60:1342–1350

Mori L., Bellini A., Stacey M. A., Schmidt M., Mattoli S. (2005) Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow// Experimental Cell Research., 304:81–90

- Mehrad B., Burdick M. D., Zisman D. A., Keane M. P., Belperio J. A., Strieter R. M. (2007) Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease// *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 353:104–108
- Nangalia J., Massie C.E., Baxter E.J., Nice F.L., Gundem G., D.C. Wedge D.C., Avezov E., Li J., Kollmann K., Kent D.G., Aziz A., Godfrey A.L., Hinton J., Martincorena I., Van Loo P., Jones A.V., Guglielmelli P., Tarpey P., Harding H.P., Fitzpatrick J.D., Goudie C.T., Ortmann C.A., Loughran S.J., Raine K., Jones D.R., Butler A.P., Teague J.W., O'Meara S., McLaren S., Bianchi M., Silber Y., Dimitropoulou D., Bloxham D., Mudie L., Maddison M., Robinson B., Keohane C., Maclean C., Hill K., Orchard K., Tauro S., Du M.Q., Greaves M., Bowen D., Huntly B.J.P., Harrison C.N., Cross N.C.P., Ron D., Vannucchi A.M., Papaemmanuil E., Campbell P.J., Green A.R. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. // *N. Engl. J. Med.*, 369:2391–2405.
- Ngo M. A., Muller A., Li Y., Neumann S., Tian G., Dixon I. M. C., Arora R. C., Freed D. H. (2014) Human mesenchymal stem cells express a myofibroblastic phenotype in vitro: comparison to human cardiac myofibroblasts // *Mol. Cell. Biochem.*, 392:187–204
- Passamonti F., Rumi E., Pietra D., Della Porta M. G., Boveri E., Pascutto C., Vanelli L., Arcaini L., Burcheri S., Malcovati L., Lazzarino M., Cazzola M. (2006) Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34<sup>+</sup> cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders// *Blood.*, Vol. 107., № 9., p. 3676-3682
- Pilling D., Buckley C. D., Salmon M., Gomer R. H. (2003) Inhibition of Fibrocyte Differentiation by Serum Amyloid P1// *The Journal of Immunology.*, 171: 5537–5546.
- Pilling D., Fan T., Huang D., Kaul B., Gomer R. H. (2009) Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts// *PLoS One.*, 4(10):1-18
- Pilling D., Gomer R. H. (2012) Differentiation of Circulating Monocytes into Fibroblast-Like Cells// *Methods Mol. Biol.*, 904: 191–206.
- Quan T. E., Cowper S., Wu S., Bockenstedt L. K., Bucala R. (2004) Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood// *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.*, 36:598–606
- Reilkoff R. A., Bucala R., Herzog E. L. (2011) Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation// *Nat. Rev. Immunol.*, 11(6): 427–435.

- Schmidt M., Sun G., Stacey M. A., Mori L., Mattoli S. (2003) Identification of Circulating Fibrocytes as Precursors of Bronchial Myofibroblasts in Asthma// *Journal Immunology.*, 171:380-389
- Schmitt-Graiff A., Desmoulière A., Gabbiani G. (1994) Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity // *Virchows Archiv.*, 425:3-24
- Tefferi A. (2010): Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1// *Leukemia.*, 24:1128-1138
- Verstovsek S., Manshouri T., Pilling D., Bueso-Ramos C. E., Newberry K. J., Prijic S., Knez L., Bozinovic K., Harris D. M., Spaeth E. L., Post S. M., Multani A. S., Rampal R. K., Ahn J., Levine R. L., Creighton C. J., Kantarjian H. M., Estrov Z. (2016) Role of neoplastic monocyte-derived fibrocytes in primary myelofibrosis// *J. Exp. Med.*, Vol. 213., № 9., p. 1723–1740
- Wynn T. A. (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis// *J. Pathol.*, 2008., 214: 199–210
- Xing S., Wanting T. H., Zhao W., Ma J., Wang S., Xu X., Li Q., Fu X., Xu M., Zhao Z. J. (2008) Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice// *The blood Journal.*, 111: 5109-5117
- Yamaoka K., Saharinen P., Pesu M., Vance ET Holt III, Silvennoinen O., O’Shea J. J. (2004) The Janus kinases (Jaks)// *Genome Biology.*, Vol. 5., № 12, p. 253
- Yang L., Scott P. G., Giuffre J., Shankowsky H. A., Ghahary A., Tredget E. E. (2002) Peripheral Blood Fibrocytes from Burn Patients: Identification and Quantification of Fibrocytes in Adherent Cells Cultured from Peripheral Blood Mononuclear Cells// *Laboratory Investigation.*, Vol. 82., № 9., p. 1183-1192
- Yang J., Wheeler S. E., Velikoff M., Kleaveland K. R., LaFemina M. J., Frank J. A., Chapman H. A., Christensen P. J., Kim K. K. (2013) Activated Alveolar Epithelial Cells Initiate Fibrosis through Secretion of Mesenchymal Proteins// *The American Journal of Pathology.*, 183:1559-1570
- Yang X. H., Chen B., Liu T., Chen X. H. (2014) Reversal of myofibroblast differentiation: A review// *European Journal of Pharmacology.*, 734:83–90