

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИБРОЦИТОВ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© *Е. В. Скоробогатая,<sup>1</sup> Н. В. Калмыкова, М. И. Блинова, Г. П. Пинаев*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; <sup>1</sup> электронный адрес: rev22@mail333.com*

Фиброциты — клетки, циркулирующие в периферической крови. Они синтезируют большое число разнообразных факторов, принимая участие в запуске регенерационных процессов и в заживлении ран; также описано их участие в процессе образования гипертрофических шрамов и келоидных рубцов. В настоящей работе исследовали специфические свойства фиброцитов в культуре. Полученные данные свидетельствуют о том, что эти клетки имеют гемопоэтическое происхождение и являются недифференцированными, в связи с чем при культивировании фиброцитов необходимо соблюдать ряд условий: использовать питательную среду, необходимую для стволовых клеток, а также соблюдать очень высокую плотность посева, нехарактерную для дифференцированных клеток. Показано, что через 10 сут культивирования фиброциты дифференцируются в фибробласты. Из общего пула клеток лейкоцитарной фракции, выделенной из крови, лишь фиброциты способны с синтезу ДНК, однако пролиферативный потенциал этих клеток *in vitro* очень низкий.

Ключевые слова: периферическая кровь, фиброциты, заживление ран.

В результате повреждения кожного покрова начинается ряд взаимосвязанных процессов: воспаление, образование грануляционной ткани, ангиогенез, сокращение раны и ее реэпителизация. На завершающем этапе восстановления кожного покрова основную роль выполняют фибробласты, которые появляются в ране и синтезируют элементы внеклеточного матрикса. Вначале предполагали, что фибробласты мигрируют из ткани, окружающей рану. Однако оставалось неясным, каким образом фибробласты мигрируют в раны большой площади, в которых миграционная активность клеток ограничена.

Первые упоминания о существовании других матрикс-продуцирующих клеток — предшественников фибробластов, которые циркулируют в крови, появились еще в 1863 г. (Paget, 1863). В 1994 г. Букала с коллегами (Vucala et al., 1994) имплантировали подкожно в рану небольшие губчатые камеры и наблюдали появление в них нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов в течение 24 ч. Авторы также обнаружили присутствие среди них большого числа веретенообразных клеток, напоминающих фибробласты. Поскольку в столь короткие сроки они не могли мигрировать из прилежащей соединительной ткани, авторы предположили, что данные клетки, названные ими фиброцитами, появляются в ране из кровяного русла, в которое они поступают из костного мозга. В дальнейшем было показано, что приблизительно 15—20 % фибробластов в ране имеют гемопоэтическое происхождение (Fathke et al., 2004).

Фиброциты, приходящие в рану вместе с воспалительными клетками, синтезируют факторы ангиогенеза и тем самым способствуют формированию сосудов, что было показано на модели образования сосудов в матрикеле (Hartlapp et al., 2001). Экспрессия фиброцитами матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9) приводит к ремо-

делированию матрикса, что облегчает процесс ангиогенеза. Кроме того, фиброциты секретируют в питательную среду большое количество ангиогенных факторов, в число которых входят: сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), тромбоцитарный фактор роста А (PDGF-A), макрофаг-колониестимулирующий фактор (M-CSF), фактор роста гепатоцитов (HGF), гранулоцит-макрофаг-колониестимулирующий фактор (GM-CSF), основной фактор роста фибробласта (bFGF) и фактор роста соединительной ткани (CNTGF). Воспалительные цитокины — интерлейкин 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и интерлейкин-8 (IL-8) — были также обнаружены в кондиционированной среде, в которой культивировали фиброциты (Hartlapp et al., 2001).

Так как фиброциты экспрессируют CD34 — интегральный мембранный гликопротеин с мол. массой 110 кДа, который, как первоначально полагали, экспрессируется исключительно на гемопоэтических стволовых клетках, включая различные миелоидные и лимфатические клетки (Brown et al., 1991; Vucala et al., 1994), был сделан вывод об их гемопоэтическом происхождении. Показано, что эмбриональные фибробласты и предшественники эндотелиальных клеток также экспрессируют CD34 (Fina et al., 1990; Brown et al., 1991). Способность фиброцитов синтезировать CD34 уменьшается с течением времени как *in vivo*, так и *in vitro* (Aiba et al., 1994; Vucala et al., 1994; Aiba, Tagami, 1997; Hirohata et al., 2001; Barth et al., 2002a, 2002b). Вероятно, на длительность экспрессии фиброцитами CD34 влияет микроокружение. Так, фиброциты, полученные из раны с ярко выраженным воспалительным процессом, поддерживают экспрессию CD34 в течение долгого времени (Vucala et al., 1994).

Превращение фиброцитов в фибробласты происходит в процессе заживления раны, в результате чего клетки начинают синтезировать такие белки внеклеточного мат-

рикса, как коллагены I и III и виментин, необходимые для миграции собственно фибробластов и кератиноцитов кожи пациента (Chesney et al., 1998). Последующая дифференцировка этих клеток в миофибробласты позволяет им принимать участие в закрытии раны путем механической контракции (Abe et al., 2001). Полагают, что в результате деятельности этих клеток происходит образование гипертрофических шрамов и келоидных рубцов, так как в нормальной коже фиброцитов не обнаружено.

Интерес к изучению дифференцировки и поведения фиброцитов обусловлен развитием технологий заместительной клеточной терапии, в частности созданием клеточных продуктов для заживления ран различной этиологии.

Настоящая работа является продолжением исследований в этой области и посвящена анализу специфических свойств фиброцитов в культуре. Была поставлена задача выделить фиброциты из периферической крови человека и охарактеризовать эти клетки с помощью набора различных антител.

### Материал и методика

Фиброциты выделяли из периферической крови доноров по методу Букала (Bucala, 1994). Цельную периферическую кровь (10 мл) разводили фосфатно-солевым буферным раствором (PBS, 1 : 1) после чего центрифугировали в градиенте плотности с Ficoll-Paque (Sigma, США), следуя инструкции изготовителя. Лейкоцитарную фракцию клеток дважды промывали PBS, осадок клеток ресуспендировали в питательной среде SCM (stem cell medium, Sigma, США).

Для выявления специфической окраски фиброцитов в качестве положительного контроля использовали фибробласты кожи человека на 5-м пассаже, эндотелиоциты из пупочного канатика на 2-м пассаже и миофибробласты из мышц крысы на 5-м пассаже.

В качестве субстратов использовали коллаген I и IV типов и фибронектин. Коллаген I типа был получен из сухожилий крысиных хвостов (Chandrakasan et al., 1967), коллаген IV типа — из плаценты человека (Kleinman, 1994), фибронектин — из плазмы крови человека (Ruoslantti et al., 1982).

Иммунофлуоресцентный анализ. Идентификацию фиброцитов в общей популяции лейкоцитов проводили методом прямой и непрямой иммунофлуоресценции по их окраске с помощью различных антител. В случае прямой флуоресценции использовали антитела на CD34, меченные FITC (BD Pharmingen, США). Для непрямой флуоресценции в качестве первых антител использовали моноклональные мышиные антитела на CD31 (DAKO, США), PCNA (Novocastra, Великобритания), Coll (Sigma, США),  $\alpha$ -SMA (Sigma, США), в качестве вторых антител — кроличьи антитела, меченные FITC (rabbit anti-mouse IgG FITC Conjugate; Sigma, США). Покровные стекла покрывали фибронектином в концентрации 10 мкг/мл, инкубировали 30 мин при 37 °C, после чего дважды отмывали PBS и культивировали на них клетки. Неприкрепившиеся клетки удаляли, прикрепившиеся фиксировали смесью ацетона с метанолом (1 : 1) в течение 5 мин на льду. При окраске антителами на CD31 клетки фиксировали смесью 4%-ного формальдегида (Sigma, США) в течение 5 мин, метанолом 5 мин на льду и ацетоном 5 мин на льду, после чего препараты высушивали при комнатной температуре. После удаления фикса-

тора клетки инкубировали с первыми антителами в течение 60 мин при комнатной температуре. Для экспериментов использовали моноклональные мышиные антитела CD34 (в разведении 1 : 100), CD31 (1 : 30), Coll (1 : 2000) и  $\alpha$ -SMA (1 : 400). После отмывки клеток от первых антител для проявления окраски на стекла наносили вторые антитела в разведении 1 : 300 и инкубировали 30 мин в темноте.

Для оценки пролиферации клеток в культуре аналог тимидина — 5-бромдезоксисуридин (BrdU; Roche, США) в концентрации 10 мг/мл — добавляли в среду с клетками на 1 ч при 37 °C. Неприкрепившиеся клетки удаляли, прикрепившиеся фиксировали 4%-ным формальдегидом в течение 10 мин. Для разрушения мембран клетки обрабатывали 0.5%-ным Тритоном X-100 в течение 5 мин и тщательно отмывали PBS. Наносили раствор 2 н. HCl на 50 мин и нейтрализовали Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>. После отмывки клетки инкубировали с первыми антителами anti-BrdU (Becton Dickinson, США) в разведении 1 : 3 в течение ночи при 4 °C. Наносили вторые антитела в разведении 1 : 200 (rabbit anti-mouse IgG FITC Conjugate; Sigma, США) и инкубировали 90 мин в темноте.

Идентификацию и подсчет окрашенных клеток проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Karl Zeiss Axioscop.

### Результаты

Опираясь на данные из литературы, фиброциты после выделения из периферической крови культивировали в среде DMEM с добавлением 20 % эмбриональной сыворотки коров. В результате ряда экспериментов выяснили, что в данной питательной среде большинство клеток не прикрепляется к субстрату и в результате удаляется при смене среды. Поэтому в дальнейшем клетки культивировали в среде SCM, принимая во внимание, что фиброциты являются недифференцированными стволовыми клетками. Через 48 ч после выделения неприкрепившиеся клетки удаляли. Популяция прикрепившихся клеток состояла из веретенообразных клеток и небольших клеточных агрегатов.

В результате работы выяснили, что при культивировании клеток лейкоцитарной фракции на их жизнеспособность большое влияние оказывает плотность посева. Необходимо было определить оптимальную концентрацию клеток лейкоцитарной фракции для культивирования фиброцитов. Использовали концентрации клеток при посеве от  $3 \cdot 10^5$  до  $6 \cdot 10^6$  кл./см<sup>2</sup> (рис. 1, а, б).

В результате было установлено, что оптимальная плотность посева, при которой в дальнейшем происходит активное образование агрегатов и веретенообразных клеток, составляет  $5 \cdot 10^6$  кл./см<sup>2</sup>.

Помимо концентрации клеток существенное влияние на жизнеспособность и рост фиброцитов оказывает использование фибронектина в качестве субстрата для культивирования. При одинаковой плотности посева клеток ( $5 \cdot 10^6$  кл./см<sup>2</sup>) на необработанный пластик, коллаген I или IV типа и фибронектин через 24 ч максимальное количество клеток прикреплялось к субстрату, покрытому фибронектином ( $3 \cdot 10^6$  кл./см<sup>2</sup>).

Для выявления фиброцитов в гетерогенной популяции клеток лейкоцитарной фракции использовали маркер CD34. Иммунофлуоресцентный анализ был проведен через 5 сут культивирования.

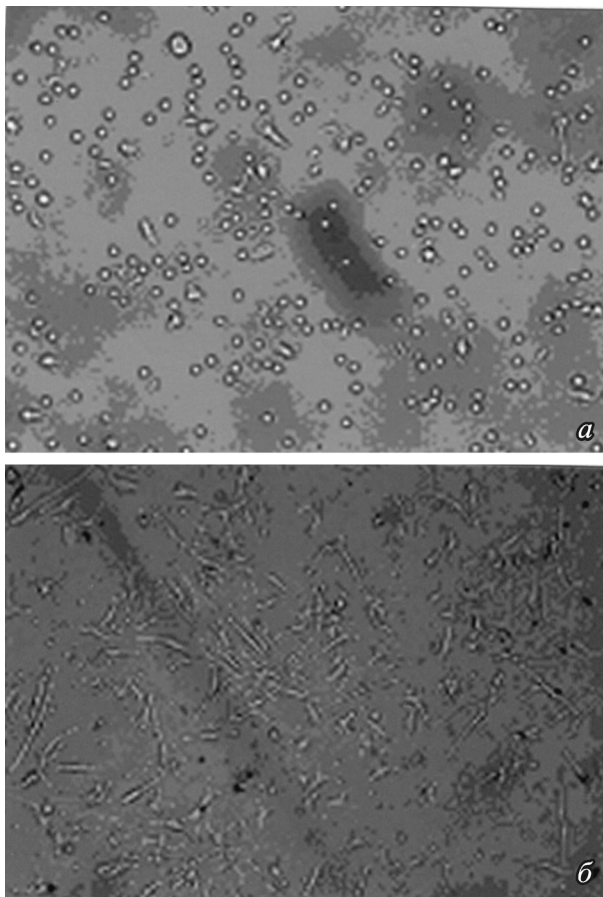


Рис. 1. Клетки лейкоцитарной фракции крови *in vitro* через 5 сут культивирования при плотности посева  $3 \cdot 10^5$  (а) или  $6 \cdot 10^6$  (б) кл./см<sup>2</sup>.

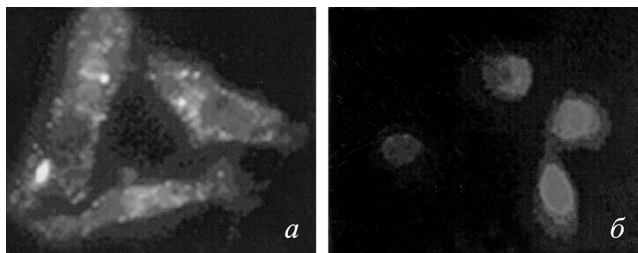


Рис. 2. Клетки периферической крови человека, флуоресцентно меченные антителами к мембранному гликопротеину CD34. а — популяция веретенообразных клеток, б — популяция клеток округлой морфологии. Об. 100×.

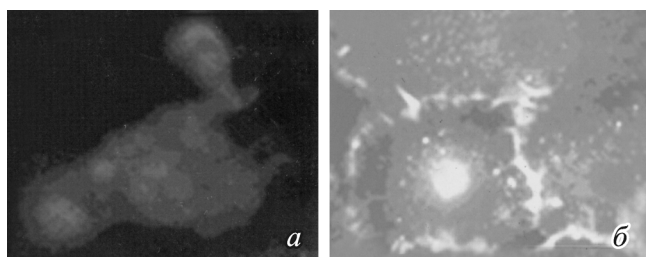


Рис. 3. Клетки периферической крови человека, флуоресцентно меченные антителами к маркеру межклеточных контактов зрелых эндотелиальных клеток CD31. а — клетки крови, б — зрелые эндотелициты. Об. 100×.

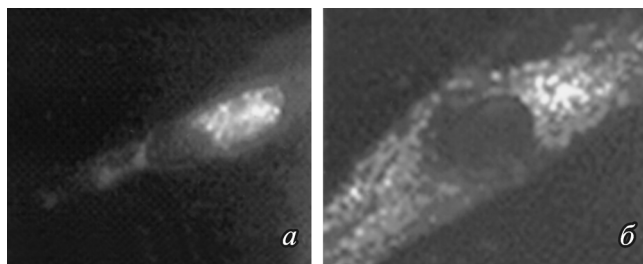


Рис. 4. Клетки периферической крови человека, флуоресцентно меченные антителами к коллагену I типа. а — клетка крови веретенообразной морфологии, б — фибробласт. Об. 100×.

На рис. 2 видно, что клетки, имеющие веретенообразную форму, окрашиваются маркером CD34. Отсюда можно сделать вывод о том, что эти клетки имеют гемопоэтическое происхождение и являются недифференцированными.

Поскольку в гетерогенной популяции клеток присутствуют также предшественники эндотелиальных клеток (Asahara et al., 1997; Gehling et al., 2000; Peichev et al., 2000; Quirici et al., 2001) с аналогичной веретенообразной морфологией и являющиеся CD34-положительными, использовали маркер CD31, который позволяет выявить именно эндотелиальные клетки (рис. 3).

Оказалось, что антитела к CD31 на межклеточные контакты эндотелиоцитов не окрашивают веретенообразные клетки (рис. 3, а). В качестве контроля в этих экспериментах использовали эндотелиальные клетки, выделенные из пупочного канатика (рис. 3, б). Это позволило предположить, что клетки, выделенные из лейкоцитарной фракции крови, при определенных условиях дифференцируются в фиброциты.

Синтез коллагена I типа относят к первым признакам дифференцировки фиброцитов (Chesney et al., 1998), а появление гладкомышечного  $\alpha$ -актина считают признаком дифференцировки в миофибробласты (Abe et al., 2001). На рис. 4, а видно, что через 10 сут культивирования фиброциты действительно дифференцируются в фибробласты (рис. 4, б). А маркер на гладкомышечный  $\alpha$ -актинин в течение этого же срока не выявлялся (рис. 5, а).

Таким образом, можно заключить, что полученные нами веретенообразные клетки сразу после выделения их из цельной периферической крови являются недифференцированными, а через 10 сут в культуре превращаются в фибробласты.

В процессе культивирования мы столкнулись с проблемой низкого уровня пролиферации циркулирующих

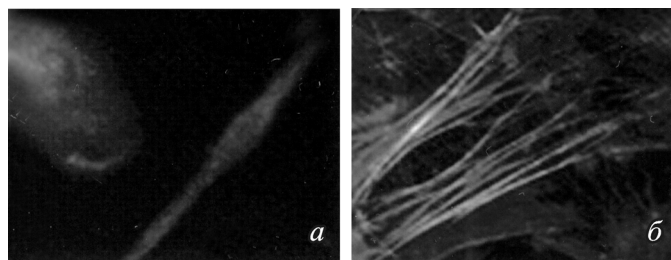


Рис. 5. Клетки периферической крови человека, флуоресцентно меченные антителами к  $\alpha$ -SMA. а — клетки крови, б — миофибробласты. Об. 100×.

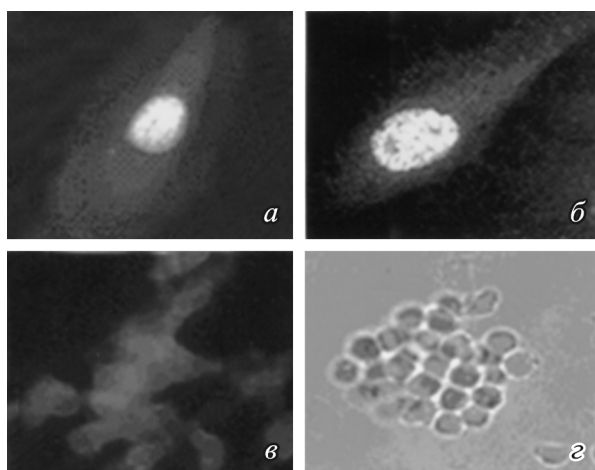


Рис. 6. Клетки периферической крови человека, флуоресцентно меченные антителами к BrdU.

*a* — клетка крови, *б* — фибробласт, *в* — агрегат клеток крови, *з* — агрегат клеток крови в проходящем свете. Об. 100 $\times$ .

стволовых клеток в культуре, что привело к необходимости выявления их способности к синтезу ДНК с помощью окраски антителами к BrdU (рис. 6). Проведенный анализ показал, что из общего пула клеток лейкоцитарной фракции лишь одиночные веретенообразные клетки способны к синтезу ДНК (рис. 6, *a*, *б*). А агрегаты, которые образуются после выделения клеток лейкоцитарной фракции из крови (рис. 6, *в*), остаются неокрашенными, следовательно, синтеза ДНК в них не происходит.

### Обсуждение

Несмотря на то что первые упоминания о существовании предшественников фибробластов появились еще в XIX в. (Paget, 1863), в настоящее время существует не так много исследований в этой области. В результате мы столкнулись с проблемой поддержания жизнеспособности этих клеток в культуре после выделения их из цельной периферической крови. Авторы большинства публикаций культивировали лейкоцитарную фракцию крови в среде DMEM с добавлением 20 % эмбриональной сыворотки коров, а в качестве субстрата использовали фибронектин (Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1998; Abe et al.,

2001; Hartlapp et al., 2001). В нашем случае использование питательной среды DMEM приводило к тому, что после выделения лейкоцитарной фракции и ее культивирования прикреплялось и расплывалось лишь незначительное количество клеток, причем даже изменение условий, например перепад температуры от 37 до 24 °С, приводило к мгновенному откреплению всех клеток. В связи с этим были предприняты попытки подбора оптимальных условий культивирования клеток лейкоцитарной фракции крови, а именно питательной среды, субстрата и плотности посева. Данные представлены в таблице.

Было установлено, что оптимальной питательной средой для поддержания в культуре лейкоцитарной фракции периферической крови и получения из нее фиброцитов является среда SCM с добавлением 20 % инактивированной эмбриональной сыворотки. Этот факт можно объяснить тем, что фиброциты являются клетками-предшественниками и нуждаются в создании особых условий *in vitro*. В частности, необходима достаточно высокая исходная плотность посева ( $6 \cdot 10^6$  кл./см<sup>2</sup>), что практически недопустимо при культивировании дифференцированных клеток, например фибробластов.

Фиброциты как клетки нового типа были охарактеризованы первооткрывателем (Bucala et al., 1994) и отнесены к клеткам, циркулирующим в крови и имеющим гемопозитическое происхождение. Таким образом, вычленив фиброциты из общей популяции клеток можно по экспрессии ими интегрального мембранного гликопротеина CD34. Мы показали, что клетки, имеющие веретенообразную форму, окрашиваются на CD34. Отсюда можно сделать вывод о том, что эти клетки действительно имеют гемопозитическое происхождение и являются недифференцированными. Экспрессия CD34 уменьшается с течением времени *in vitro* (Aiba et al., 1994; Bucala et al., 1994; Aiba, Tagami, 1997; Hirohata et al., 2001; Barth et al., 2002a, 2002b), что говорит о начале процесса дифференцировки этих клеток.

Полученные нами веретенообразные клетки, экспрессирующие CD34, спустя 10 сут после выделения окрашиваются маркером на коллаген I — основной маркер зрелых фибробластов. Эти результаты совпадают с данными других авторов (Bucala et al., 1994; Chesney et al., 1998; Abe et al., 2001) и доказывают, что *in vivo* при попадании фиброцитов с кровотоком в раневое ложе происходит процесс дифференцировки этих клеток (Chesney et al., 1998). Дальнейшая дифференцировка в миофибробласты происходит, как показано остальными исследователями,

### Варианты экспериментальных условий

Питательная среда и эмбриональная сыворотка коров (FBS)	Субстрат	Плотность посева, <sup>a</sup> кл./см <sup>2</sup>
DMEM + 20 % неинaktivированной FBS	Фибронектин (10 мкг/мл)	$3 \cdot 10^5$ , $1 \cdot 10^6$
	Коллаген I (0.1 мкг/мл)	$2 \cdot 10^6$ , $3 \cdot 10^6$
	Коллаген IV (10 мкг/л)	$4 \cdot 10^6$ , $5 \cdot 10^6$
	Пластик	$6 \cdot 10^6$
DMEM + 10 % неинaktivированной FBS	То же	То же
DMEM + 20 % инактивированной FBS	» »	» »
SCM + 20 % инактивированной FBS	» »	» »
DMEM + 20 % сыворотки доноров	» »	» »

<sup>a</sup> На каждом субстрате во всех 5 сериях экспериментов клетки сеяли в каждой из указанных концентраций.

не ранее чем через 3 нед культивирования (Abe et al., 2001).

Поскольку в периферической крови помимо предшественников фибробластов существует популяция предшественников эндотелиальных клеток (Asahara et al., 1997; Gehling et al., 2000; Peichev et al., 2000; Quirici et al., 2001), мы использовали для идентификации фиброцитов и маркер CD31. Как и ожидалось, веретенообразные клетки, выделенные из лейкоцитарной фракции крови, при определенных условиях превращаются в фиброциты.

После того как оптимальные условия культивирования были подобраны, необходимо было оценить возможность синтеза ДНК фиброцитами и другими клетками в смешанной популяции, так как оказалось, что их пролиферативный потенциал *in vitro* низкий. Было показано, что из общего пула клеток лейкоцитарной фракции лишь одиночные веретенообразные являются фиброцитами и способны к синтезу ДНК, при этом агрегаты клеток, которые образуются после выделения клеток лейкоцитарной фракции из крови, остаются неокрашенными. Но не всегда накопление BrdU свидетельствует об активном процессе пролиферации клеток.

Таким образом, из полученных результатов следует, что в норме в периферической крови человека содержится небольшое количество клеток, способных при определенных условиях дифференцироваться в фиброциты. Благодаря этим клеткам ускоряется процесс заживления ран. Исследование процессов пролиферации и дифференцировки фиброцитов *in vitro*, возможно, позволит в дальнейшем регулировать процессы заживления, а также образования рубцовой ткани.

Авторы приносят благодарность О. М. Моисеевой (НИИ кардиологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург) за значительный вклад в работу и К. М. Крылову (НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург) за предоставление клинического материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта № 02.435.11.3020 «Метод восстановления эпителиально-мезенхимальных дефектов с помощью стволовых клеток», программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и программы поддержки ведущих научных школ (НШ-1244.2003.4).

#### Список литературы

- Abe R., Donnelly S. C., Peng T., Bucala R., Metz C. N. 2001. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J. Immunol.* 166 : 7556—7562.
- Aiba S., Tabata N., Ohtani H., Tagami H. 1994. CD34+ spindle-shaped cells selectively disappear from the skin lesion of scleroderma. *Arch. Dermatol.* 130 : 593—597.
- Aiba S., Tagami H. 1997. Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids. *J. Cut. Path.* 24 : 65—69.
- Asahara T., Murohara T., Sullivan A., Silver M., van der Zee R., Li T., Witzenbichler B., Schatteman G., Isner J. M. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 275 : 964—967.
- Barth P. J., Ebrahimsade S., Hellinger A., Moll R., Ramaswamy A. 2002a. CD34+ fibrocytes in neoplastic and inflammatory pancreatic lesions. *Virch. Arch.* 440 : 128—133.
- Barth P. J., Ebrahimsade S., Ramaswamy A., Moll R. 2002b. CD34+ fibrocytes in invasive ductal carcinoma, ductal carcinoma in situ, and benign breast lesions. *Virch. Arch.* 440 : 298—303.
- Brown J., Greaves M. F., Molgaard H. V. 1991. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain and embryonic fibroblasts. *Int. Immunol.* 3 : 175—184.
- Bucala R., Spiegel L. A., Chesney J., Hogan M., Cerami A. 1994. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol. Med.* 1 : 71—81.
- Chandrakasan G., Torchia D. A., Piez K. A. 1967. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. *J. Biol. Chem.* 251 : 6062—6067.
- Chesney J., Metz C., Stavitsky A. B., Bacher M., Bucala R. 1998. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J. Immunol.* 160 : 419—425.
- Fathke C., Wilson L., Hutter J., Kapoor V., Smith A., Hocking A., Isik F. 2004. Contribution of bone marrow derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells.* 22 : 812—822.
- Fina L., Fina L., Molgaard H. V., Robertson D., Bradley N. J., Monaghan P., Delia D., Sutherland D. R., Baker M. A., Greaves M. F. 1990. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood.* 75 : 2417—2426.
- Gehling U. M., Erun S., Schumacher U., Wagener C., Pantel K., Otte M., Schuch G., Schafhausen P., Mende T., Kilic N., Kluge K., Schafer B., Hossefeld D. K., Fiedler W. 2000. *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood.* 95 : 3106—3112.
- Hartlapp I., Abe R., Saeed R. W., Peng T., Voelter W., Bucala R., Metz C. N. 2001. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis *in vivo*. *FASEB J.* 15 : 2215—2224.
- Hirohata S., Yanagida T., Nagai T., Sawada T., Nakamura H., Yoshino S., Tomita T., Ochi T. 2001. Induction of fibroblast-like cells from CD34(+) progenitor cells of the bone marrow in rheumatoid arthritis. *J. Leuk. Biol.* 70 : 413—421.
- Kleinman H. K. 1994. Isolation of laminin-1 and type IV collagen from the EHS sarcoma. *J. Tissue Culture Meth.* 16 : 231—233.
- Paget J. 1863. Lectures on surgical pathology. Royal College of Surgeons of England. London: Longmans. 15 p.
- Peichev M., Naiyer A. J., Pereira D., Zhu Z., Lane W. J., Williams M., Oz M. C., Hicklin D. J., Witte L., Moore M. A., Rafii S. 2000. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 95 : 952—958.
- Quirici N., Soligo D., Caneva L., Servida F., Bossolasco P., Deliliers G. L. 2001. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133+ cells. *Br. J. Haematol.* 115 : 186—194.
- Ruoslani E., Hayman E. G., Pirschnbacher M., Engvall E. 1982. Fibronectin: purification, immunochemical properties and biological activities. *Meth. Enzymol.* 82 : 803—830.

---

ALLOCATION AND IDENTIFICATION OF FIBROCYTES FROM HUMAN PERIPHERAL BLOOD

*E. V. Skorogataya,<sup>1</sup> N. V. Kalmykova, M. I. Blinova, G. P. Pinaev*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; <sup>1</sup> e-mail: rev22@mail333.com

Fibrocytes are the cells circulating in peripheral blood that synthesize a big number of various factors and take part in the start of reclaiming processes. The wound healing is a result of activity of fibrocytes. It is known that they participate in formation of hypertrophic and keloid scars. The purpose of the present work was to research specific properties of fibrocytes *in vitro*. The data obtained testify that these cells really have hematopoietic origin and are undifferentiated. In this connection, while cultivating fibrocytes it is necessary to keep to some specific conditions: the use of the medium specific for stem cells and very high density of cultivation. In 10 days of culturing, the fibrocytes differentiate into fibroblasts. From the general pool of peripheral blood mononuclear cells, only fibrocytes are capable of DNA synthesis but in spite of it proliferative potential of these cells is very low.

Key words: peripheral blood, fibrocytes, wound healing.

---