

На правах рукописи



Назаров Кирилл Вячеславович

**ИММУНОРЕГУЛЯТОРНАЯ ФУНКЦИЯ ЭРИТРОБЛАСТОВ: ЭКСПРЕССИЯ  
ИММУНОАКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ В МОДУЛЯЦИИ ФЕНОТИПА ЛИМФОИДНЫХ  
КЛЕТОК**

3.2.7. Иммунология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук,

Профессор

**Сенников Сергей Витальевич**

**Официальные оппоненты:**

**Савченко Андрей Анатольевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярно-клеточной физиологии и патологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской Академии наук» обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Красноярск

**Шевченко Алла Владимировна**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской Академии наук», г. Томск

Защита состоится « 22 » января 2026 г. в 12:00 на заседании диссертационного совета 24.1.184.01 (Д 001.001.ХХ) в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д.14, к.211

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <https://niikim.ru/ru/наука/объявления-диссовета>

Автореферат разослан « » \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

Кандидат биологических наук

Облеухова И.А.



## Общая характеристика работы

### Актуальность проблемы

Долгое время считалось, что эритроциты имеют лишь одну функцию – перенос кислорода с током крови, а их клетки-предшественники – эритробласты нацелены только на дифференцировку с накоплением гемоглобина. Ранее было показано, что у мышей гемопоэз-активирующие воздействия на фоне усиленной пролиферации эритроидного ростка в органах кроветворения (костный мозг и селезёнка) ведут к подавлению гуморального иммунного ответа. Введение фенилгидразина мышам вызывает гемолитическую анемию и усиленный эритропоэз, а также ведет к резкому угнетению синтеза антител, в частности, при иммунизации мышей эритроцитами барана (Журавкин, 1979). Показано, что обусловленная острой гипоксией иммуносупрессия протекает на фоне усиленной миграции ГСК из костного мозга и подавленной миграции В-лимфоцитов в селезенку, а также экспансии клеток эритроидного ростка (Козлов, 1977). При переносе спленоцитов мышей, подвергшихся острой гипоксии, сингенным мышам-реципиентам, предварительно иммунизированных эритроцитами барана, наблюдается снижение количества антителообразующих клеток к эритроцитам барана в селезёнке мышей-реципиентов. Удаление из переносимых спленоцитов фракции адгезивных клеток указывало именно на участие в супрессии незрелых эритроидных клеток (Чеглякова, 1984). Эритроидная природа супрессорного воздействия была показана следующим образом: обработка переносимых спленоцитов поликлональной анти-эритробластической сывороткой отменяла их иммуносупрессорное действие у реципиентов (Masagio, 1981, Чеглякова, 1984, Цырлова, 1991). Блокада синтеза белка в культуре переносимых эритробластов циклогексимидом отменяла иммуносупрессивное действие эритроидных клеток на гуморальный иммунный ответ (Кашлакова, 1987). Из чего можно сделать вывод, что именно посредством белковых факторов, например, цитокинов, эритроидные клетки опосредуют свои иммунорегуляторные эффекты. Со временем стали появляться и другие сообщения о том, что эритроидные ядродержащие клетки-предшественники способны к синтезу и секреции цитокинов (Sennikov, 1996, Инжелевская, 2001, Sennikov, 2002, Sennikov, 2004), посредством которых эритроидные клетки могут оказывать влияние на развитие других гемопоэтических клеток, а значит могут влиять в общем на гемопоэз и иммунопоэз, модулировать иммунный ответ как в нормальных физиологических условиях, так и при патологических состояниях. Интерес представляет изучение экспрессии иммунорегуляторных медиаторов эритробластами в условиях активации гемопоэза, таких как гемолитическая анемия, кровопотеря и гипоксия, так как эти состояния сопровождаются перестройками в иммунной системе, в частности, снижением иммунного ответа. Однако детальные механизмы иммунорегуляторной активности эритробластов, особенности экспрессии иммуноактивных молекул (поверхностных и растворимых) эритробластами, а также их влияние на лимфоидные клетки остаются недостаточно изученными. В данной работе проведено разностороннее исследование транскрипционной активности эритробластов, экспрессии поверхностных и растворимых белков эритробластов и некоторых эффектов растворимых факторов эритробластов на фенотип лимфоцитов мыши в норме и при гемопоэз-активирующих состояниях.

### Степень разработанности темы

Несмотря на накопленные данные, степень разработанности темы остаётся недостаточной. Ранее был изучен ограниченный список медиаторов, продуцируемых эритробластами, во многом эти исследования были сосредоточены на обнаружение мРНК тех или иных медиаторов в эритробластах методом ПЦР, а также обнаружение конкретного белкового медиатора в кондиционной среде эритробластов методом ИФА. Из изученных регуляторных эффектов эритробластов показан иммуносупрессивный эффект на В-лимфоциты. Однако, до сих пор неясно, какие именно медиаторы и сигнальные пути задействованы в иммунорегуляторной активности эритробластов, а также особенности иммунорегуляторной активности эритробластов при гемопоэз-активирующих состояниях. Не изучены в полной мере органоспецифические особенности эритробластов, их фенотипическая структура и участие эритробластов в иммунорегуляции. На данный момент это направление исследований является востребованным и находящимся на стадии активного формирования и расширения знаний.

**Цель работы:** охарактеризовать профиль экспрессии генов иммунорегуляторных молекул, экспрессию поверхностных и растворимых белков эритробластов в норме и при гемопоэз-активирующих воздействиях, а также эффекты растворимых продуктов эритробластов на фенотип лимфоидных клеток мыши

## Задачи:

1. Проанализировать в эритроцитах из различных органов мыши профиль экспрессии генов иммунорегуляторных молекул в норме и при гемопоэз-активирующих воздействиях: гемолитической анемии, острой кровопотере, гипоксии
2. Оценить продукцию растворимых иммунорегуляторных белков эритроцитами *in vitro* в норме и при гемопоэз-активирующих воздействиях
3. Оценить *in vitro* иммунорегуляторные эффекты, реализуемые эритроцитами за счёт продукции растворимых молекул, на индукцию молекул активации и супрессии Т- и В-клеток (PD1, Foxp3, CD30)
4. Исследовать поверхностные и внутриклеточные иммунорегуляторные молекулы на/в эритроцитах различных органов мыши в норме и при гемопоэз-активирующих воздействиях

## Научная новизна

Впервые показана в эритроцитах мыши экспрессия генов хемокинов и хемокиновых рецепторов, экспрессия генов белков с антимикробной активностью *S100a8*, *S100a9*, *Camp*, вовлеченных в реализацию врожденного иммунного ответа; показаны органоспецифичные отличия в транскриптом эритроцитов интактных мышей: эритроидные клетки костного мозга экспрессируют больше мРНК генов антимикробных белков - кальпротектина (*S100a8*, *S100a9*) и кателецидина (*Camp*), а также *Cxcl12*, *Ctsg*, а эритроидные клетки селезенки экспрессируют достоверно больше мРНК генов: MHC 2 класса, а также *Cd274*. Показаны изменения в транскриптом эритроцитов мышей, подвергнутых гемопоэз-активирующим воздействиям, в частности, при воздействиях в эритроцитах костного мозга мышей повышается экспрессия генов *Clec5a*, *Ctsg*, белковые продукты которых участвуют в поддержании противомикробного иммунитета и ремоделировании межклеточного матрикса, а также некоторых цитокинов - *Tnf*, *Il6*. Впервые показана продукция растворимых белков – хемокинов эритроцитами в условиях *in vitro*, в частности, хемокинов CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11. Описаны новые иммунорегуляторные эффекты на иммунокомпетентные клетки *in vitro*, реализуемые эритроцитами, посредством секретируемых продуктов, а именно - увеличение содержания PD1+CD19+ В-клеток среди селезеночных мононуклеарных клеток мышей, увеличение доли CD3+Foxp3+ Т-клеток среди селезеночных мононуклеарных клеток мышей. Впервые показаны новые фенотипические особенности CD45+ и CD45- эритроидных клеток мыши. CD45+ эритроциты характеризуются большим клеточным размером и высокой гранулярностью, также для CD45+ эритроцитов показана преимущественная поверхностная экспрессия белков с иммуносупрессивными свойствами – галектина-9 и PDL1, CD45- эритроциты характеризуются меньшим клеточным размером и низкой гранулярностью, также для CD45- эритроцитов показана наиболее преимущественная способность к синтезу TGF $\beta$ , по сравнению с CD45+ эритроцитами.

## Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в том, что полученные здесь данные дают возможность более глубокого и детального понимания свойств эритроидных клеток. Эритроидные клетки-предшественники, помимо накопления гемоглобина для подготовки к транспорту O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>, также способны к иммунорегуляции при разных состояниях организма. Описанные в данной работе результаты, а именно экспрессия генов белков с антимикробной активностью, а также иных генов, белковые продукты участвуют в реализации врожденного иммунного ответа, выдвигают вопросы о дальнейшем исследовании новых свойств эритроцитов, в частности, о способности к регуляции процессов врожденного иммунного ответа. Представленные здесь данные о продукции эритроцитами хемокинов, причём продукция хемокинов эритроцитами носит консервативный характер, свидетельствуют об участии эритроцитов в миграции клеток. Регуляторные эффекты растворимых факторов эритроцитов выражены в: направлении дифференцировки Т-клеток в сторону Foxp3+ клеток, то есть Т-регуляторов и направлении дифференцировки В-клеток в сторону PD1+ клеток, то есть фенотипа функционально истощенных В-клеток, чувствительных к проапоптотическим сигналам. Полученные данные указывают на наличие у эритроидного ростка особой структуры, а именно наличие эритроцитов различных размеров, гранулярности, а также различающихся по фенотипическому маркеру CD45, а, следовательно, различных иммунорегуляторных свойств. Показано, что CD45+ эритроциты это клетки большего размера с высокой гранулярностью, а также для CD45+ эритроцитов при гемопоэз-активирующем воздействии кратно увеличивается экспрессия поверхностных молекул с иммуносупрессивной активностью (галектин-9 и PDL1), а CD45- эритроциты это клетки меньшего размера с низкой гранулярностью, также для CD45-

эритробластов при гемопоэз-активирующем воздействии показано кратное увеличение синтеза растворимого медиатора с иммуносупрессивным действием (TGFb). Показаны влияния растворимых продуктов эритробластов на разные популяции иммунокомпетентных клеток, в частности, на Т- и В-лимфоциты, в основном эти влияния носят схожий характер, что говорит о некоем универсальном механизме влияния эритробластов на другие иммунокомпетентные клетки. В практическом аспекте эритробласты имеют потенциал стать мишенью для терапевтического воздействия, в частности, при состояниях, сопровождающихся дисфункциями иммунной системы, такими как опухоли, привычное невынашивание, ревматоидный артрит, гематологические заболевания. Имеющиеся в литературе данные о присутствии эритробластов в тканях плаценты, солидных опухолей различных нозологий и описанные в настоящей работе данные позволяют предположить универсальность иммунных механизмов, которыми эритробласты реализуют свои эффекты на иммунитет, в этом заключается практическая значимость работы. Полученные здесь результаты дополняют уже имеющиеся знания об участии эритробластов в различных иммунных процессах. В дальнейшем эти результаты направят исследователей на более углубленное и расширенное понимание роли эритробластов в поддержании иммуносупрессивного окружения, наблюдаемого при множестве различных патологий и других состояний, сопровождающихся перестройками в иммунной системе организма.

### **Методология и методы исследования**

Исследование выполнено на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ. В работе применяли методы клеточной биологии *in vitro* (выделение клеток из органов, культивирование клеток, сбор кондиционных сред клеток после культивирования, витальное окрашивание), проточная цитометрия, молекулярно-биологические методы (иммуноферментный анализ, выделение РНК, оценка профиля экспрессии генов технологией Nanostring) биоинформатическая и статистическая обработка данных.

Объектом исследования были выбраны эритробласты, полученные из клеток костного мозга и селезенки лабораторных мышей-гибридов первого поколения ♂F1 CBA×C57Bl6. Предмет исследования - изучение транскриптома, секретома и фенотипических особенностей эритробластов, а также эффектов эритробластов на лимфоидные клетки в условиях нормы и гемопоэз-активирующих воздействий.

Лабораторных мышей подвергали гемопоэз-активирующим воздействиям – гемолитической анемии, вызванной введением небольших доз фенилгидразина, острой кровопотере, вызванной однократной пункцией ретроорбитального синуса, острой гипоксии, проведенной путём помещения животных в барокамеру. После достижения пика эритропоэтического ответа мышей подвергали эвтаназии и изымали бедренные кости и селезенку. Эритробласты выделяли методом иммуномагнитной сепарации из суспензий клеток костного мозга и селезенки экспериментальных мышей. Методом проточной цитометрии оценивали фенотип эритробластов по экспрессии поверхностных и внутриклеточных белков, а также чистоту выделенных клеток. Полученные эритробласты культивировали в течение 72 часов, затем осуществляли сбор кондиционных сред эритробластов. Часть выделенных эритробластов использовали для экстракции тотальной РНК, которую далее использовали для оценки валового транскриптома эритробластов методом Nanostring. Содержание иммуноактивных белков, секретированных эритробластами, в кондиционных средах определяли методом BioPlex ImmunoAssay. Для оценки иммунорегуляторных эффектов растворимых продуктов эритробластов проводили культивирование мононуклеарных клеток селезенки мышей, обработанных витальным красителем CFSE, в присутствие соответствующих кондиционных сред эритробластов в течение 24 часов с последующей оценкой фенотипа клеток проточной цитометрией. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью ПО GraphPad Prism 8. Для анализа фенотипа клеток, полученных методом проточной цитометрии, применяли тест Краскела-Уоллиса. Массив численных данных, полученных на Bioplex анализаторе, представляли в виде  $\log_2$ -трансформированных значений для нормализации и устранения погрешностей при измерении продукции иммуноактивных белков. Для биоинформатического анализа данных транскриптома эритробластов применяли ПО nSolver analysis software 4.0 от производителя Nanostring, а также пакет R 3.3.2.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Эритробласты мыши экспрессируют мРНК и продуцируют белки хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 и CCL5 как в норме, так и при гемопоэз-активирующих состояниях, что является неотъемлемым иммунорегуляторным свойством эритробластов.

2. CD45+ и CD45- эритробласты различаются не только клеточным размером и гранулярностью, но также и экспрессией иммунорегуляторных молекул: для CD45+ эритробластов продемонстрирована преимущественная поверхностная экспрессия белков галектина-9 и PDL1, а для CD45- эритробластов – преимущественная способность к синтезу TGF $\beta$ , что является новой иммунологической характеристикой эритроидных клеток.

### **Достоверность результатов и личный вклад автора**

Результаты, представленные в данной диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ, город Новосибирск. Научные положения и выводы обоснованы и получены с использованием классических и современных методов *in vitro* и *in vivo* с достаточной выборкой экспериментальных животных в соответствии с основными принципами работы с лабораторными животными, а также большим объемом материала, который подвергнут глубокому анализу с привлечением методов биоинформатики и математической статистики. Полученные результаты имеют высокий уровень статистической значимости. Опубликованные статьи, содержащие результаты проведенных исследований, написаны лично автором или при его непосредственном участии.

### **Апробация работы**

Научные результаты были представлены на следующих мероприятиях: XVII Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 5 - 8 июня 2023, конференции аспирантов и ординаторов НИИФКИ 2023 и 2024, XI Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов фундаментальной медицины OpenBio 24 сентября 2024.

### **Внедрение результатов в практику**

Полученные в ходе диссертационного исследования результаты включены в курс лекций для студентов Института медицины и психологии имени Зельмана и Факультета естественных наук Новосибирского государственного университета, а также в элективные курсы по специальности для аспирантов и ординаторов НИИ фундаментальной и клинической иммунологии.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 6 статей, из них 6 в журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus, все журналы рекомендованы ВАК. Список опубликованных работ приложен в конце диссертации.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация соответствует требованиям ГОСТ Р 7.0.11–2011. Диссертация написана в традиционном стиле и состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, список используемых сокращений, список используемой литературы. Диссертационная работа изложена на 135 страницах машинописного текста и включает в себя 28 рисунков. Список использованной литературы содержит 223 цитируемых источников.

### **Материалы и методы исследования**

#### **Объект и предмет исследования**

Объектом исследования были выбраны эритробласты, полученные из клеток костного мозга и селезенки лабораторных мышей-гибридов первого поколения ♂F1 CBA×C57Bl6. Предмет исследования - изучение транскриптома, секретома и фенотипических особенностей эритробластов, а также эффектов эритробластов на лимфоидные клетки в условиях нормы и гемопоэз-активирующих воздействий.

#### **Лабораторные животные и этическое заключение**

Для экспериментов использовали мышей-гибридов первого поколения ♂F1 CBA×C57Bl6 в возрасте 3-5 мес. Всех животных содержали в виварии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии в пластиковых клетках в стандартных условиях со свободным доступом к корму и питью.

Исследование проводили в соответствии с принципами, изложенными в Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986). Выведение мышей из эксперимента осуществляли с помощью цервикальной дислокации. В каждой экспериментальной группе было по меньшей мере 6 мышей ( $n=6-8$ ). Все экспериментальные манипуляции были рассмотрены на заседании Локального этического комитета при НИИФКИ и утверждены (протокол №141 от 20.04.2023)

### **Экспериментальные модели**

Для рассмотрения роли эритроидных клеток в иммунорегуляции были смоделированы гемопоз-активирующие состояния: фенилгидразин-индуцированная гемолитическая анемия, острая кровопотеря, острая гипоксия. Для контроля использовали аналогичных интактных мышей (норма). Гемолитическая анемия была вызвана введением фенилгидразина – гемолитического яда, избирательно вызывающего лизис эритроцитов. Мышам вводили интраперитонеально по 1,2 мг/мышь раствора фенилгидразина в PBS (Sigma-Aldrich, США) однократно и в дозе 0,6 мг/мышь двукратно с 12-часовым интервалом между инъекциями. Забор органов осуществляли на четвёртые сутки после начала эксперимента. Острую кровопотерю проводили следующим образом. Мышам под изофлурановой (препарат Аерран, Baxter) анестезией забирали кровь из ретроорбитального синуса в объёме ~0,5-0,7 мл с помощью стеклянного капилляра с заострённым кончиком. Контролировали наступление стадии хирургического наркоза и выход из анестезии для каждого животного. Забор органов осуществляли на третьи сутки после начала эксперимента. Острые гипоксические условия моделировали в барокамере, где насосом создавали отрицательное давление ~ -46кПа. Мышей в клетке с подстилкой, кормом и питьём помещали в барокамеру на ~16 часов. По окончании воздействия мышей возвращали в стандартные условия вивария. Забор органов осуществляли на третьи сутки после начала эксперимента.

### **Выделение органов и получение клеточных культур**

После эвтаназии из мышей, подвергнутых гемопоз-активирующим воздействиям, в стерильных условиях извлекали бедренные кости и селезёнку. Костный мозг вымывали из полости бедренных костей фосфатно-солевым буфером PBS (phosphate-buffered saline) с помощью шприца. Клетки селезенки получали целиком растирая селезёнку в в стеклянном гомогенизаторе в PBS, для удаления клеточных агрегатов и крупных кусочков тканей пропускали клеточную суспензию через нейлоновые сеточки диаметром 40 мкм. Для удаления эритроцитов и гранулоцитов клеточные суспензии центрифугировали в градиенте плотности фиколла-верографина  $\rho=1,119$  г/мл (фиколл: Панэко, Россия, верографин: Schering AG, Германия) 30 мин 1,5 тыс.об. в мин, после разделения клеток на фракции, отбирая интерфазу, содержащую мононуклеарные клетки (МНК). Двумя последовательными отмытками в трехкратном объёме PBS и центрифугированием собранную интерфазу МНК очищали от фиколла-верографина, а после этого подсчитывали количество полученных клеток с помощью автоматического гемоанализатора (Beckman Coulter, США). Для выделения эритроидных клеток из общей клеточной суспензии применяли метод магнитной сепарации с использованием моноклональных, конъюгированных с биотином, антител к TER119 (аналог человеческого гликофорина А) и магнитных наночастиц, конъюгированных со стрептавидином (BioLegend, США). Магнитную сепарацию клеток проводили в стерильных условиях на холоде в специальном буферном растворе на основе PBS, содержащем 2mM ЭДТА и 0.5% бычий сывороточный альбумин (изготовлен *in situ* по мере потребности). Также для магнитной сепарации клеток использовали колонки MiniMACS (тип MS), закреплённые в специальном магните (Miltenyi Biotec, Германия). Полученные в итоге клетки после магнитной сепарации подсчитывали, определяли жизнеспособность полученной культуры клеток окрашиванием трипановым синим и визуализацией под микроскопом. Для дальнейшего анализа и культивирования использовали только культуры клеток с жизнеспособностью не менее 95%. Чистоту выделенной культуры эритроидных клеток, а также фенотипические особенности оценивали проточной цитометрией.

### **Проточная цитометрия**

Клетки в количестве ~0,5 млн окрашивали следующими моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромами, в концентрациях согласно инструкциям производителя: FITC anti-mouse CD45 Antibody, FITC anti-mouse/human CD11b Ab, FITC anti-mouse Ly-6A/E (Sca-1) Ab, FITC anti-mouse CD3 Antibody, Alexa Fluor® 488 anti-mouse/human CD45R/B220 Ab, Pacific Blue™ anti-mouse TER-119/Erythroid Cells Ab, PE anti-mouse/human CD44 Ab, APC anti-mouse CD71 Ab (все антитела BioLegend, США). Инкубация с антителами составляла 30-40 мин в темноте при комнатной температуре, после этого клетки отмывали от несвязавшихся антител в 1 мл PBS с NaN<sub>3</sub>, центрифугировали 10 мин 1,5 тыс.об. в

мин, сливали надосадов, заменяя его 200 мкл свежего PBS с NaN<sub>3</sub>. Для удаления из анализа мёртвых клеток добавляли 7-аминоактиномицин D (BioLegend, США) в пробы непосредственно перед цитометрией. Эритробласты определяли, как живые клетки, позитивные по маркерам TER-119, CD71. Также проверяли, что выделенный гейт CD71+ TER-119+ клеток негативен по маркерам миелоидных и лимфоидных клеток CD11b- CD3-, CD45R/B220-. Экспрессия CD44 зависит от стадии дифференцировки эритробластов и снижается от проэритробластов к ортохроматофильным эритробластам. Анализ проводили на проточном цитофлюориметре Attune NxT Flow Cytometer (ThermoFisher Scientific, США).

Также проводили цитометрический анализ эритробластов с внутриклеточным окрашиванием иммунорегуляторных молекул, а также поверхностных белков. Клетки подготавливали аналогично, далее окрашивание моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромами, в концентрациях согласно инструкциям производителя: FITC anti-mouse TER119 Ab, Pacific Blue anti-mouse CD45 Ab, APC/Cy7 anti-mouse CXCR4 Ab, APC anti-mouse/human Gal3 Ab, PerCP/Cy5.5 anti-mouse Gal9 Ab, PE/Cy7 anti-mouse PDL1 Ab (все антитела BioLegend, США). Инкубация и отмывка аналогичным образом, как и описано выше. После окрашивания клеток поверхностными антителами проводили фиксацию и пермеабиллизацию клеток для внутриклеточного окрашивания. Клетки фиксировали в 0,5 мл на пробу Fix Buffer (BioLegend, США), содержащим 4% формалин, 20 минут. После фиксации клетки пермеабиллизировали в 1 мл/пробу пермеабиллизующего буфера, приготовленного путём разведения 10x Perm Buffer (BioLegend, США) в 10 раз дис.водой. После пермеабиллизации к клеточному осадку добавляли коктейль моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами, в концентрациях согласно инструкциям производителя: PE anti-mouse CCL2 Ab, PE anti-mouse IL10 Ab, PE anti-mouse TGFb1 Ab, PE/Cy7 anti-mouse IL12/IL23p40 Ab (все антитела BioLegend, США). Инкубация с антителами составляла 20-30 мин в темноте при комнатной температуре, после этого клетки дважды отмывали 1x перм.буфером по 1 мл на пробу. Цитометрический анализ проводили на проточном цитофлюориметре Attune NxT Flow Cytometer. Эритробласты идентифицировали как клетки, несущие маркер TER119, далее TER119+ клетки разделяли на две ветви по наличию на них маркера CD45, таким образом рассматривали две популяции эритробластов: TER119+CD45+ и TER119+CD45-, в/на них уже, в свою очередь, определяли присутствие других поверхностных и внутриклеточных молекул.

#### **Анализ продукции цитокинов**

Выделенные эритроидные клетки культивировали в 6-луночных планшетах или флаконах T25 (TPP, Швейцария) в бессывороточной среде X-VIVO 10, содержащей L-глутамин (Lonza, Швейцария) в концентрации 1 млн/мл среды в инкубаторе при 37 градусах Цельсия и 5% содержании CO<sub>2</sub> в течение 3 суток. По истечении этого времени собирали кондиционные среды (растворимые продукты) эритробластов, маркировали и сохраняли в холодильнике при -80°C для последующего анализа. Анализ продукции цитокинов в кондиционных средах эритробластов проводили с использованием набора Bio-Plex Pro Mouse cytokine 23-plex assay и прибора Bio-Plex 100 System (Bio-Rad Laboratories, США). Полученные данные были обработаны с помощью программного обеспечения Bio-Plex Manager (версия 6.1) в соответствии с пятипараметрической аппроксимацией кривой и преобразованы в пикограммы на миллилитр.

#### **Анализ профиля экспрессии генов**

Для анализа профиля экспрессии из эритроидных клеток выделяли тотальную РНК с использованием набора Total RNA Purification Plus Kit в соответствии с инструкциями производителя (Norgen Biotec, Канада). Концентрацию и чистоту полученной РНК оценивали прибором Nanodrop 2000. Готовую РНК маркировали и сохраняли в холодильнике при -80°C для последующего анализа. Профилирование экспрессии генов на основе системы анализа Nanostring nCounter SPRINT Profiler было выполнено на 50 нг тотальной РНК каждого образца. Образцы РНК были подвергнуты анализу с помощью панели nCounter Mouse Immunology panel (NanoString Technologies, США), состоящей из 547 иммунных и ассоциированных с воспалением генов, 14 генов «домашнего хозяйства», 8 отрицательных и 6 положительных контрольных образцов, которые использовали для вычитания фона и нормализации количества необработанных транскриптов мРНК во всех образцах. Образцы подвергали реакции гибридизации в течение ночи при 65°C, где 5 мкл тотальной РНК объединяли с 20 мкл зондов nCounter Reporter в гибридизационном буфере и 5 мкл зондов захвата nCounter до общего реакционного объема 30 мкл. После гибридизации зондов к интересующим мишеням в образцах количество молекул-мишеней количественно определяли с использованием цифрового анализатора nCounter.

## Исследование фенотипа иммунокомпетентных клеток, инкубированных в присутствии растворимых продуктов эритробластов

Для выяснения роли растворимых продуктов, производимых эритробластами, в процессах иммунорегуляции проводили следующий функциональный тест, включающий в себя культивирование моноклеарных клеток селезенки мыши в присутствии 50% по объему кондиционной среды эритробластов. Моноклеарные клетки селезенки мышей культивировали в концентрации 500 тыс./500мкл в полной среде RPMI-1640 (Вектор, Россия). Полная среда RPMI-1640 включает в себя следующие добавки: 10мМ HEPES, 300 мг глутамина (Биолот, Россия), 5 мг гентамицина (Панэко, Россия), 100 тыс.Ед бензилпенициллина (Биолот, Россия), 250 мкл 0,7мкМ 2-меркаптоэтанола (Sigma, USA), 10% (v/v) FCS; указанные количества рассчитаны на 500 мл заводской среды RPMI-1640 производства Биолот, Россия. В экспериментальные лунки добавляли по 250 мкл соответствующих кондиционных сред, полученных от эритробластов, то есть объемное содержание кондиционных сред составляло 50%. В качестве контроля были клетки, инкубированные без кондиционных сред, вместо неё добавляли 250 мкл стандартной среды RPMI-1640. В случае, где это было необходимо, клетки предобрабатывали витальным красителем CFSE, накапливающимся в цитоплазме клеток, это позволяет оценить интенсивность деления клеток. Культивирование клеток с кондиционными средами проходило в течение суток в 48-луночных планшетах во влажном инкубаторе при 37 градусах Цельсия и 5% содержании CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации клетки собирали интенсивным ресуспендированием из лунок планшетов в цитометрические пробирки, отмывали от среды, проводили окрашивание следующими моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромами, в концентрациях согласно инструкциям производителя: PacificBlue CD3, AlexaFluor488 CD4, APC/Cyanine7 CD8, PerCP/Cyanine5.5 CD16|32, BrilliantViolet 510 CD279 и PacificBlue CD3, PerCP CD19, FITC CD14, APC CD30, BrilliantViolet 510 CD279, AlexaFluor 700 FoxP3 (все антитела BioLegend, США). Внутриклеточное окрашивание FoxP3 для выявления Treg клеток проводили в соответствии с инструкцией производителя с применением фиксирующего буфера и пермеабилизирующего буфера (BioLegend, США). Анализ проводили на проточном цитофлюориметре Attune NxT Flow Cytometer (ThermoFisher Scientific, США). Определяли фенотип клеток, выделяя гейтами CD3<sup>+</sup>, то есть Т-клетки, CD16|32<sup>+</sup> NK-лимфоциты, CD19<sup>+</sup> В-клетки, CD14<sup>+</sup> моноциты. Из CD3<sup>+</sup>клеток выбирали популяции, несущие маркёры Т-цитотоксических CD8<sup>+</sup> клеток и Т-хелперных CD4<sup>+</sup> клеток. Среди CD3<sup>+</sup> клеток выявляли FoxP3<sup>+</sup> клетки и идентифицировали их как Т-регуляторные клетки. Из CD19<sup>+</sup>клеток выбирали популяцию активированных В-клеток, несущих маркёр активации CD30, и популяцию супрессированных клеток, несущих маркёр супрессии CD279 (PD1).

### Анализ данных

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью ПО GraphPad Prism 8. Для анализа фенотипа клеток, полученных методом проточной цитометрии, применяли тест Краскела-Уоллиса. Данные представляли в виде медианы и интерквартильного интервала Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub> (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>). Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . Массив численных данных, полученных на Bioplex анализаторе, представляли в виде log<sub>2</sub>-трансформированных значений для нормализации и устранения погрешностей при измерении продукции цитокинов. Для биоинформатического анализа данных профиля экспрессии применяли ПО nSolver analysis software 4.0 от производителя Nanostring, а также пакет R 3.3.2. Для определения порогового значения фона (background thresholding) сырых данных использовали среднее±2 станд.отклонения заводских негативных контролей. Для нормализации применяли заводские позитивные контроли и гены домашнего хозяйства *Alas1*, *G6pdh*, *Gusb*, *Gapdh*, *Oaz1*, *Polr2a*, *Sdha*, *Tubb5*. Нормализованные данные исследовали для выявления качественных изменений в экспрессии генов, а также использовали в модуле Advanced analysis, исследуя дифференциальную экспрессию генов, вычисляя log<sub>2</sub> ratios и q-values (с применением критерия Бенджамина-Якутиелли для вычисления FDR - False Discovery Rate, позволяющего отсеять ложноположительные результаты), а также строили volcano plot для дифференциально экспрессируемых генов (Q=5%).

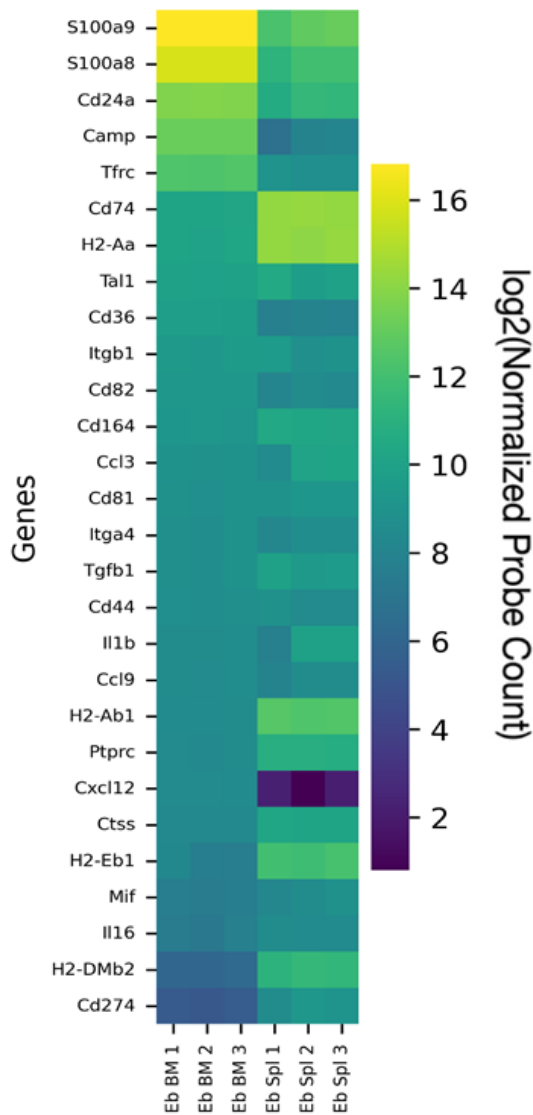
### Результаты исследования и их обсуждение

#### Исследование транскриптома эритробластов

При анализе профиля экспрессии мРНК генов иммуноактивных белков показано, что эритробласты костного мозга нормальной (интактной) мыши экспрессируют множество генов, в частности, гены цитокинов, хемокинов и их рецепторов. Важно заметить, что обнаружена экспрессия ранее неописанных в этих клетках генов, в частности, МНС II класса (*H2-Aa*, *H2-Ab1*, *H2-K1*), генов белков с антимикробной активностью (*S100a9*, *S100a8*, *Camp*, *Ctsg*, *Clec4e*, *Clec5a*), цитокинов и хемокинов (*Ccl3*, *Ccl9*, *Il1b*, *Tgfb1*,

*Il16*), причем экспрессия этих генов сохраняется стабильной во всех исследованных органах и при гемопоэз-активирующих воздействиях. Также стоит заметить, что задетектирована высокая экспрессия гена рецептора трансферрина *Tfrc*, эта белковая молекула является поверхностным маркером эритробластов CD71, а также генов *Tall* и *Cd36*, которые также являются маркерами клеток красного ростка, это служит признаком высокой чистоты выделенных иммуномагнитной сепарацией эритроидных клеток.

Эритроидные клетки селезенки интактной мыши (норма) экспрессируют множество генов, в



частности, гены цитокинов, хемокинов и их рецепторов. Здесь также можно заметить, что обнаружена экспрессия ранее не описанные в этих клетках генов, в частности, МНС II класса (*H2-Aa*, *H2-Ab1*, *H2-K1*, *H2-Eb1*), генов белков с антимикробной активностью (*S100a9*, *S100a8*, *Camp*, *Ctsg*, *Clec4e*), цитокинов и хемокинов (*Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl5*, *Ccl9*, *Il1b*, *Tgfb1*, *Il16*, *Cxcl12*). Как и в случае с эритробластами костного мозга, в эритробластах селезенки задетектирована высокая экспрессия гена рецептора трансферрина *Tfrc*, а также генов *Tall* и *Cd36*, которые являются маркерами клеток красного ростка, что указывает на высокую чистоту выделенной популяции клеток.

Проведя сравнение транскриптома эритробластов из костного мозга и селезенки интактной мыши, можно заметить некоторые отличия: эритробласты селезенки мыши экспрессируют достоверно большее количество копий следующих генов: *H2-Aa*, *Cd74*, *H2-Ab1*, *Ptprc*, *H2-Eb1*, *H2-Dmb2*, *Cd274*. А эритробласты костного мозга мыши экспрессируют достоверно большее количество копий следующих генов: *S100a9*, *S100a8*, *Camp*, *Cd24a*, *Cd36*, *Cxcl12*, *Ctsg*, *Icam4*. См.рис.1

Рис. 1 ← Дифференциальная экспрессия генов в эритробластах костного мозга и селезенки в норме: тепловая карта экспрессируемых генов (чем ближе к желтому цвету, тем выше экспрессия гена).

При фенилгидразин-индуцированной гемолитической анемии были найдены достоверные различия в экспрессии генов эритроидными клетками костного мозга по сравнению с нормой (интактным контролем). Была обнаружена экспрессия генов цитокинов и хемокинов (в порядке убывания числа копий): *Cxcr4*, *Ccl3*, *Tgfb1*, *Il1b*, *Ccl9*, *Ccr2*, *Il16*, *Mif*, *Csf2rb*, *Cxcr5*, а также генов белков антимикробного ответа *S100a9*, *S100a8* и *Camp*. Присутствует во всех образцах исследованных эритроидных клеток наличие экспрессии генов МНС 2 класса..

Обнаружены статистически и биологически значимые изменения в экспрессии генов. После гемолитической анемии эритробласты костного мозга имели более высокую экспрессию генов: *S100a8*, *S100a9*, *Camp*, *Ctsg*, *Clec5a*, *Il16*, *Cd274*, *H2-Dmb2*, *H2-Ob*, и значительно более низкую экспрессию генов: *Tfrc*, *Cd24a*, *Cd36*, *Tall*, *Il1b*, *Tnfsf14*, *Il1r2*.

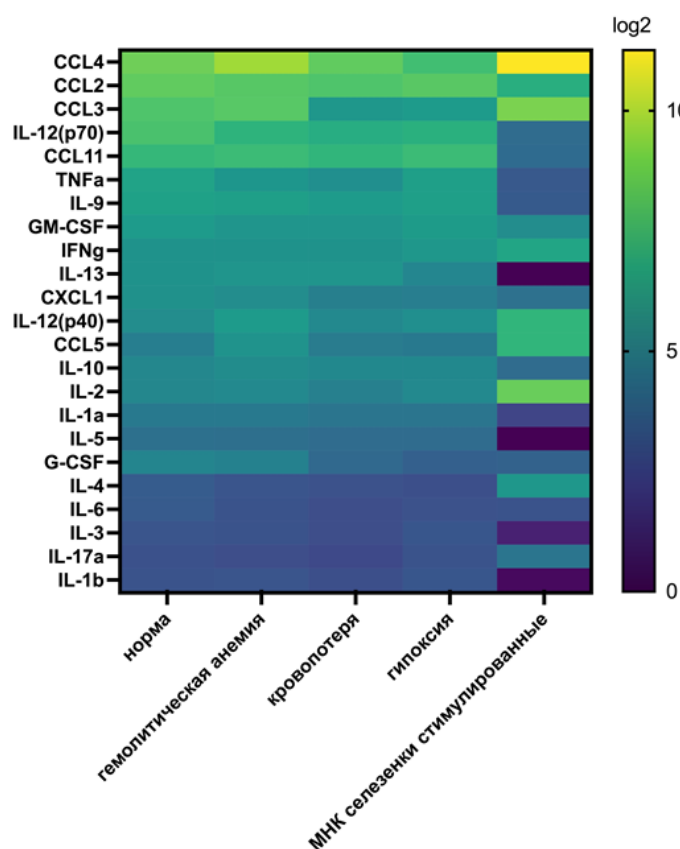
При острой кровопотере были найдены достоверные различия в экспрессии генов эритроидными клетками костного мозга. После острой кровопотери эритробласты костного мозга имели более высокую экспрессию генов: *Csf3r*, *Cdkn1a*, *Ctsg*, *Hlx*, *Clec5a*, *Ltb4r1*; и значительно более низкую экспрессию генов: *Cxcl12*, *Il1r2*, *Ccr2*, *Psmc2*, *Tnfaip3*, *Cd2*, *Cd79b*, *Cd55*, *Cd24a*, *Clqbp*, *Pml*, *Ms4a1*, *Itga4*, *Itgb1*, *Ptpn2*, *Cttnb1*, *Irgm1*, *H2-Aa*, *H2-Ab1*. Исследуя экспрессию генов в эритробластах костного мозга после гипоксии, было найдено, что экспрессия генов *Clec4e*, *Clec5a*, *Irak3*, *Il6* и *Tnf* была повышена, а гена *Cxcl12* была понижена по сравнению с нормальными костномозговыми эритробластами мыши.

Исходя их полученных данных можно сказать, что есть предпосылки к новой, ранее малоописанной роли эритроидных клеток, а именно вовлеченности эритроидных клеток в процессы врожденного иммунного ответа: во всех исследованных случаях эритробласты стабильно экспрессируют гены белков с антибактериальной активностью: *S100a8*, *S100a9*, которые являются частями кальпротектина, а также *Camp* – белковый продукт этого гена — это предшественник кателецидина, антимикробного белка. Роль кателецидина в противомикробной защите организма описана достаточно

широко (Zanetti, 2004), также описана роль антимикробных белков, в том числе и кателицидина, в патогенезе иммуноопосредованных заболеваний (Lande, 2014, Бахлыкова, 2021). Важно заметить, что кателицидин относится к большому семейству антимикробных белков, к этой группе также относятся и дефензины (Kościuczuk, 2012), белки участвующие во врожденном иммунном ответе на микроорганизмы, а также участвующие в поддержании барьера в кишечнике. Экспрессия гена альфа-дефензина была показана в эритроблестах здоровых людей (Perik-Zavodskii, 2022). Эту общую для мышинных и человеческих эритробластов закономерность нельзя обойти вниманием. Можно предположить, что эритробласты костного мозга активно участвуют в поддержании барьера гемопозитических ниш, предотвращая попадание патогенов в костный мозг посредством активной продукции антимикробных белков, но это требует дальнейшего экспериментального рассмотрения и уточнения. Также в эритроблестах присутствует экспрессия *Ctsc* и *Ctsg* – катепсинов (дипептидилпептидаз), ферментов, расщепляющих пептидные связи, которые активно участвует в разрушении и ремоделировании межклеточного матрикса, а также активируют гранзимы при воспалении. Имеются экспериментальные подтверждения того, что кондиционная среда эритробластов костного мозга как мыши, так и человека подавляет рост кишечной палочки (Perik-Zavodskii, 2025). Также во всех исследованных случаях эритробласты экспрессируют гены МНС II класса, причем экспрессия этих генов терпит минимальные изменения при гемопоз-активирующих воздействиях, что позволяет предположить конститутивный характер экспрессии этих генов в эритроидных клетках, вполне вероятно, что эритробласты могут выполнять антиген-презентирующую функцию. Учитывая, что уже имеются сообщения о способности эритробластов селезенки мыши захватывать пептиды и представлять их Т-клеткам (Fan, 2024), то этот аспект нуждается в дальнейшем более подробном и тщательном изучении.

### Исследование секретома эритробластов

Мультиплексный анализ кондиционной среды эритроидных клеток мыши, выделенных из различных органов при различных состояниях, показал, что эритробласты секретируют широкий ряд



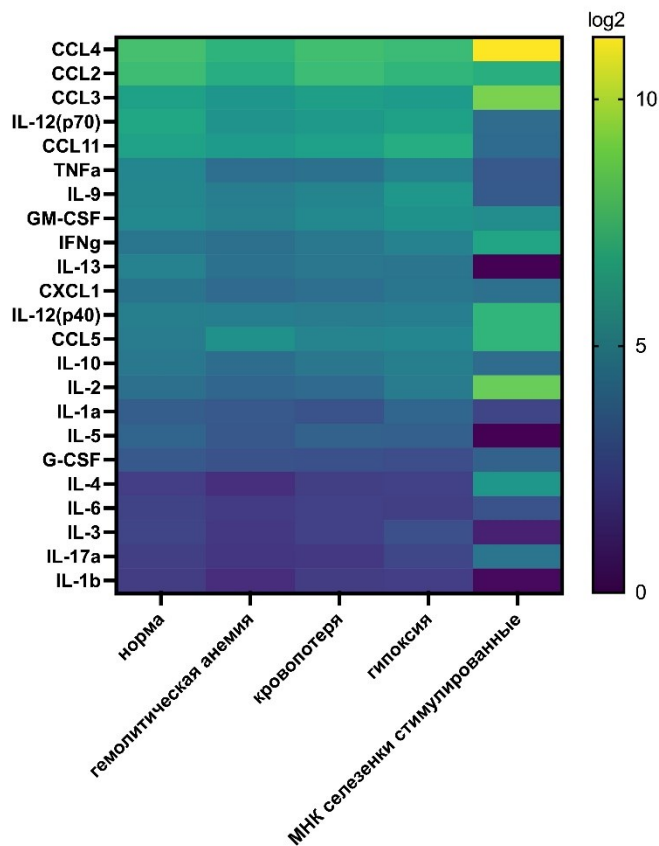
цитоклинов и хемокинов. Как можно увидеть на тепловой карте (рис.2) эритробласты костного мозга продуцируют множество цито- и хемокинов, причём уровни продукции во многих исследованных случаях сопоставимы с уровнями их продукции в контроле – мононуклеарных клеток селезенки, стимулированных митогеном КонА, в частности для CCL2, CCL3, CCL4, GM-CSF, IFNg, CXCL1, IL-10, G-CSF, IL-6. Наиболее заметными по уровню продукции были замечены хемокины CCL2, CCL3, CCL4, CCL11 и цитокин IL12p70.

Рис. 2 ←Тепловая карта медианных значений содержания цитокинов и хемокинов в кондиционных средах эритробластов костного мозга мыши, представлены медианы log<sub>2</sub> трансформированных значений концентраций, n=6

Рис. 3 →Тепловая карта медианных значений содержания цитокинов и хемокинов в кондиционных средах эритробластов селезенки мыши, представлены медианы  $\log_2$  трансформированных значений концентраций, n=6

Аналогичную картину можно увидеть на тепловой карте медианных значений содержания цитокинов в кондиционных средах эритробластов селезенки мыши (рис.3). Здесь также видно, что эритробласты, выделенные из селезенки, продуцируют множество цито- и хемокинов, причём уровни продукции во многих исследованных случаях сопоставимы с уровнями продукции мононуклеарными клетками селезенки, стимулированными митогеном КонА. Однако, стоит обратить внимание, что есть медиаторы, продукция которых по уровням сопоставима между эритробластами как костномозговыми, так и селезеночными, и МНК селезенки, это CCL3, CCL4, CCL5 и IL12p40. Также стоит заметить, что костномозговые эритробласты демонстрируют несколько более высокий уровень продукции медиаторов по сравнению с селезеночными эритробластами практически во всех исследованных случаях, однако лишь на уровне тенденции.

Хемокиновая сеть в организме чрезвычайно широка, а её эффекты очень разнообразны. Подтвержденная продукция некоторых хемокинов эритробластами позволяет предполагать, что эритробласты опосредуют или непосредственно участвуют в процессах миграции гемопоэтических и иммунокомпетентных клеток. Причём задетектированные уровни продукции хемокинов эритробластами довольно высоки, их даже можно назвать сопоставимыми с уровнями продукции хемокинов другими типами иммунокомпетентных клеток мыши, например, дендритными клетками (Proietto, 2004). Синтез хемокинов эритробластами, по-видимому, видонеспецифичное явление, т.к. в одной из работ было обнаружено, что эритробласты человека продуцируют хемокины CXCL5 и IL8 (Perik-Zavodskii, 2022). Надо сказать, что эритробласты присутствуют в опухолевом микроокружении и вносят свой вклад в общую иммуносупрессию, способствуя развитию опухоли. Если понять, как можно регулировать продукцию хемокинов эритробластами и другими клетками в опухолевом микроокружении, то это может стать инструментом при разработке терапевтических подходов онкологических заболеваний.



## Влияние растворимых продуктов эритробластов на фенотип иммунокомпетентных клеток

- контроль
- кондиц.среда эритробластов норма
- кондиц.среда эритробластов гемолитическая анемия
- кондиц.среда эритробластов кровопотеря
- кондиц.среда эритробластов гипоксия

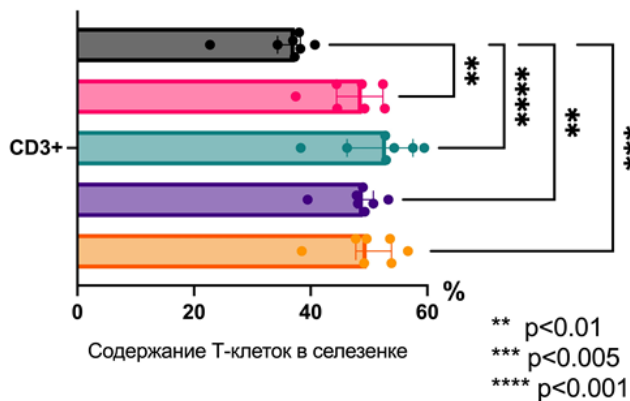
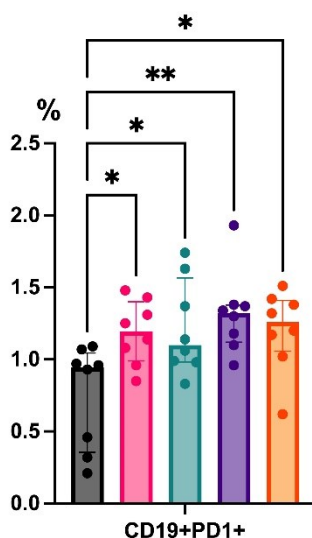


Рис. 4 ↑Процентное содержание CD3+ клеток в культуре мононуклеарных клеток селезенки при обработке кондиционными средами эритробластов, Med, Q25-Q75, n=7

Рис. 5 →Процентное содержание Foxp3+ клеток среди CD3+ МНК селезенки при обработке кондиционными средами эритробластов, Med, Q25-Q75, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.005 vs контроль

Важно отметить, что, исследуя соотношение содержания CD4+ и CD8+ Т-клеток во всех случаях не было выявлено изменения соотношения CD4+/CD8+, что означает, что растворимые факторы эритробластов действуют не выборочно на какую-то одну популяцию Т-клеток, а в общем на все Т-клетки.

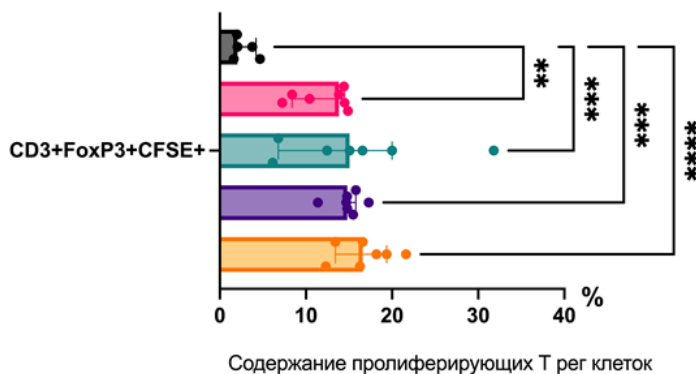
- контроль
- кондиц.среда эритробластов норма
- кондиц.среда эритробластов гемолитическая анемия
- кондиц.среда эритробластов острая кровопотеря
- кондиц.среда эритробластов гипоксия



выявлено каких-либо значимых изменений содержания указанных клеток. Это означает, что действие растворимых факторов эритробластов выборочно, то есть они действуют на определенные популяции иммунокомпетентных клеток. Способность эритробластов ингибировать пролиферацию В-лимфоцитов и

При добавлении к МНК селезенки кондиционных сред эритробластов, полученных как от интактных мышей (норма), так и от мышей с различными гемопоэз-активирующими воздействиями, наблюдается: увеличение содержания CD3+ клеток среди МНК селезенки в культуре по сравнению с контролем (Рис.4), причем среди CD3+ клеток происходит увеличение доли Foxp3+ клеток в культуре по сравнению с контролем, что подтверждает также окрашивание витальным красителем CFSE, позволяющим оценить пролиферацию клеток (Рис.5)

- контроль
- кондиц.среда эритробластов норма
- кондиц.среда эритробластов гемолитическая анемия
- кондиц.среда эритробластов кровопотеря
- кондиц.среда эритробластов гипоксия



При добавлении к мононуклеарным клеткам селезенки кондиционных сред эритробластов, полученных как от интактных мышей (норма), так и от мышей с различными гемопоэз-активирующими воздействиями, было замечено увеличение доли CD19+ PD1+ клеток среди МНК селезенки в культуре по сравнению с контролем (см.Рис.6), что означает, что CD19+ В-клетки начинают уходить в состояние истощения и становятся более чувствительны к проапоптотическим сигналам

Рис. 6← Процентное содержание CD19+ PD1+ клеток среди МНК селезенки при обработке кондиционными средами эритробластов, Med, Q25-Q75, \* p<0.05, \*\* p<0.01 vs контроль, n=8

Важно заметить, что, исследуя содержание CD19+, CD19+CD30+ В-клеток, CD16|32+ NK-клеток, CD14+ моноцитов среди клеток селезенки во всех случаях не было

в целом ингибировать гуморальный иммунный ответ у мышей и у человека была показана в работах Macario (Macario, 1981), Чегляковой В.В. с коллегами (Чеглякова, 1984, Кашлакова, 1987) и Самарина Д.М. (Самарин, 1997). Один из молекулярных механизмов действия эритробластов на В-клетки был установлен, в частности, описана роль растворимого фактора TGFb (Seledtsov, 1998). Однако, по данным полученным в этой работе, можно очертить ещё один механизм действия эритробластов на В-клетки, где важное место отводится поверхностной молекуле с супрессивным функционалом PD1. По представленным здесь данным можно полагать, что после получения сигнала от эритробластов, посредством поверхностного PDL1, в В-клетках происходят процессы, готовящие В-лимфоцит к переходу в супрессивное состояние, одним из них является усиление поверхностной экспрессии белка PD1, что здесь удалось отследить.

В некоторых работах сообщалось о стимуляторном влиянии эритробластов на пролиферацию Т-лимфоцитов (Кашлакова, 1984, Самарин, 1997). Другим механизмом общего супрессивного влияния эритробластов на дифференцировку лимфоидных клеток, можно рассматривать увеличение содержания Т регуляторных клеток. Также известно, что TGFb, производимый в том числе и эритроидными клетками, является мощным индуктором дифференцировки Т-лимфоцита в сторону Т-регуляторной клетки (Shevach, 2008). По представленным здесь данным, небольшой порядка 10%, но достоверный прирост CD3+ Т-клеток среди селезеночных МНК, обработанных кондиционными средами эритробластов, может быть обусловлен появлением и пролиферацией в культуре CD3+Foxp3+ Т-клеток, что здесь и было проверено. И это можно рассматривать как еще одно доказательство о влиянии эритробластов на дифференцировку лимфоидных клеток.

### Фенотипические особенности эритробластов

Исследуя методом проточной цитометрии содержание поверхностных и внутриклеточных иммуноактивных белков на/в эритробластах, были обнаружены следующие особенности в фенотипе эритроидных клеток. Замечено, что эритроидный росток мыши — это неоднородная популяция клеток. С помощью методов биоинформатического анализа, в частности, кластерирования, было выявлено, что эритроидные клетки мыши расходятся на две группы: большую и малую, которые различаются между собой наличием поверхностного белка CD45, различным клеточным размером и разной гранулярностью. Большая группа CD45 негативная, клетки большой группы имеют меньший размер и низкую гранулярность, малая группа CD45 позитивная, клетки малой группы большего размера и высоко гранулярны. Причём в малой группе эритробластов мыши также выявляются все без исключения стадии созревания: ранние и поздние базофильные, полихроматические, оксифильные. Клетки обеих групп имеют общие моменты: практически не различаются по наличию поверхностной экспрессии молекулы TER119, по мере созревания клетки обеих групп характеризуются снижением поверхностной экспрессии белка CD71.

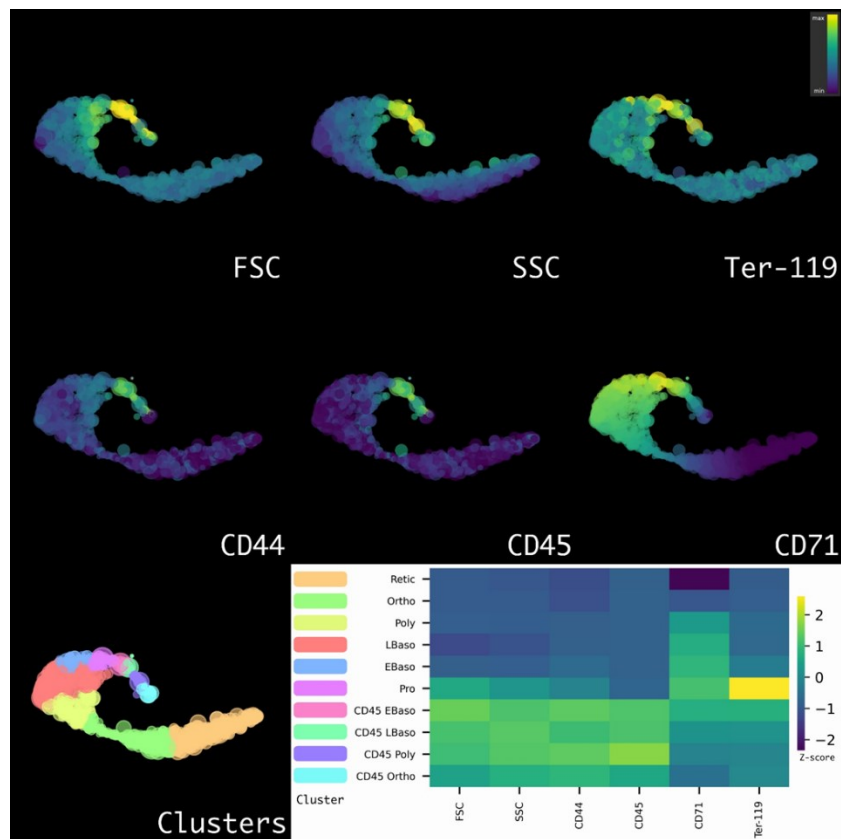


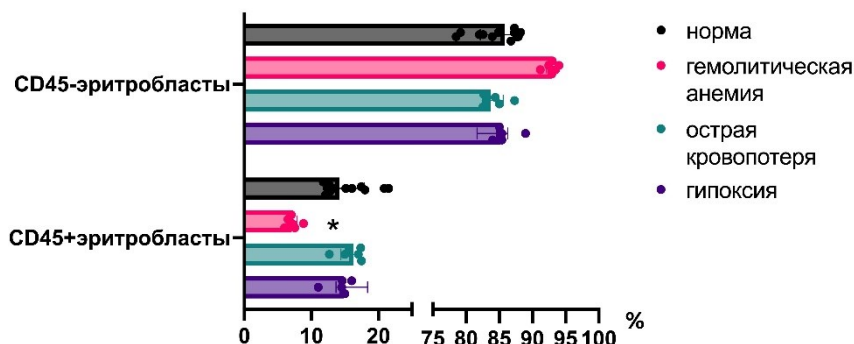
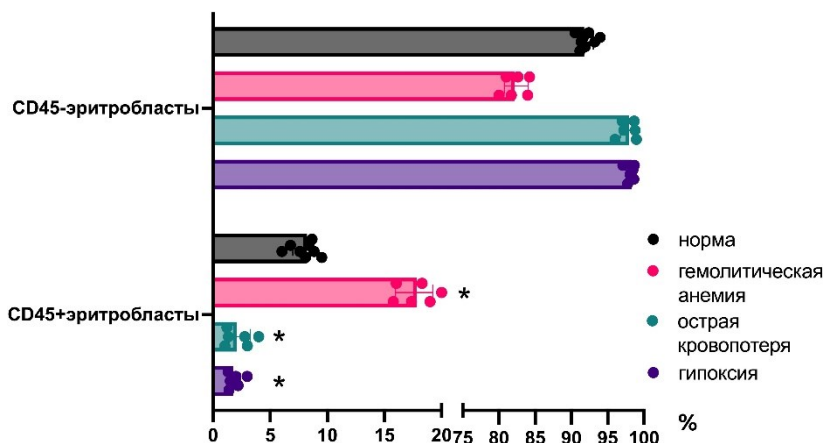
Рис. 7 ← Результаты кластерирования эритробластов костного мозга мыши в норме (интактные) по поверхностным маркерам, размеру и гранулярности клеток; FSC – параметр прямого светорассеяния отражает размер клеток, SSC – параметр бокового светорассеяния отражает гранулярность клеток, Ter119, CD44, CD45, CD71 – поверхностные маркёры эритробластов, Pro - проэритробласты, EBaso – ранние базофильные эритробласты, LBaso – поздние базофильные, Poly – полихроматические, Ortho – ортохроматические (оксифильные) эритробласты, Retic – ретикулоциты. Можно заметить, что как в кластере CD45+, так и в CD45- клетках, выявляются эритробласты всех стадий созревания, в частности, это отмечено по нисходящей поверхностной экспрессии CD44. Аналогичные

тенденции прослеживаются в других исследованных случаях.

Проведенный анализ показал, что доля эритробластов, несущих CD45, от всех эритроидных клеток, небольшая, но меняется при гемопоэз-активирующих воздействиях. В частности, в костном мозге интактной мыши в норме доля CD45+ эритробластов от всех эритроидных клеток составляет порядка 8%, при гемопоэз-активирующих воздействиях статистически достоверно меняется, составляя при гемолитической анемии ~16%, при острой кровопотере ~1%, а при гипоксии ~1,5%. Результаты представлены на рисунке 8.

Рис. 8 → Процентное содержание CD45+ и CD45- эритробластов от всех эритроидных клеток костного мозга мыши; Med, Q25-Q75, \* P<0.01 vs норма, n=6

В селезенке ситуация с содержанием CD45+ эритробластов иная. В норме у интактной мыши их доля составляет порядка 14%, при гемолитической анемии статистически достоверно меняется, составляя ~7,5%, однако, при других гемопоэз-активирующих



воздействиях (острой кровопотере и гипоксии) достоверно доля CD45+ эритробластов не меняется. В более ранних работах было показано, что содержание CD45+ эритробластов в селезенке мышей с фенилгидразин-индуцированной анемией, а также в селезенке беременных мышей уменьшается (Colonne, 2015).

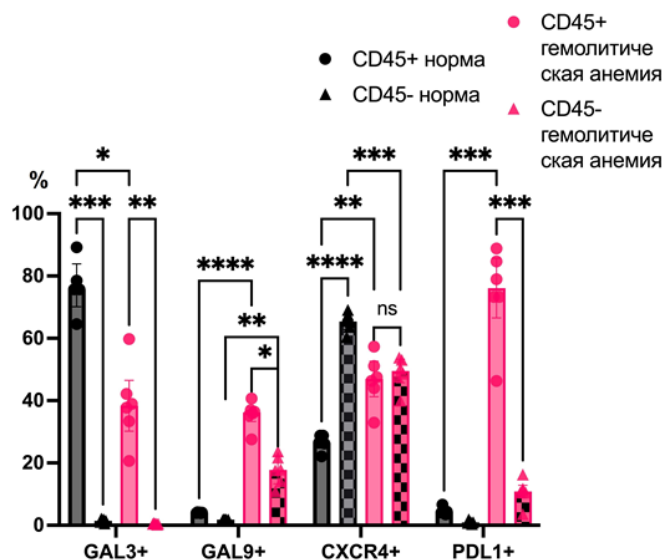
Рис. 9 ← Процентное содержание CD45+ и CD45- эритробластов от всех эритроидных

клеток селезенки мыши; Med, Q25-Q75, \* P<0.01 vs норма, n=6

Рассматривая структуру эритрона были найдены две группы эритроидных клеток, различающихся по наличию поверхностного маркера CD45. Множество эритробластов CD45+ представлены клетками крупного размера и высокой гранулярности, множество эритробластов CD45- представлены клетками мелкого размера и низкой гранулярности. В каждой группе эритробластов выявляются все стадии созревания эритроидной клетки: базофильные, полихроматические, оксифильные эритробласты. Принадлежность клеток каждой группы к эритроидному ростку не вызывает сомнений, т.к. клетки каждой группы имеют высокую поверхностную экспрессию белка-маркера эритроидного ростка TER119. Вместе с этим, можно сказать, что ответ CD45+ и CD45- эритробластов на гемопоэз-активирующее воздействие неодинаков. Было найдено, что при гемолитической анемии среди костномозговых эритробластов увеличивается доля CD45+ клеток по сравнению с нормой, а при других гемопоэз-активирующих воздействиях (кровопотере и гипоксии) доля CD45+ эритробластов падает по сравнению с нормой, из чего можно предположить, что CD45+ и CD45- эритробласты могут обладать разным пролиферативным потенциалом и разным регуляторным потенциалом, причём эти различия могут быть органоспецифичны. Так как при гемолитической анемии доля CD45+ эритробластов снижается по сравнению с нормой, а при других гемопоэз-активирующих воздействиях (кровопотере и гипоксии) доля CD45+ эритробластов в селезенке существенно не меняется.

## Оценка экспрессии поверхностных и внутриклеточных иммунорегуляторных белков CD45+ и CD45- эритробластами

Поскольку наиболее явные фенотипические изменения можно было наблюдать при гемолитической анемии было решено также изучить некоторые поверхностные и внутриклеточные иммунорегуляторные молекулы в/на эритробластах при данном гемопоэз-активирующем воздействии. Было показано, что в костном мозге интактной мыши в норме: CD45+ эритробласты несут на своей поверхности галектин-3 (медиана ~80%), CD45- эритробласты не несут галектин-3, CD45+ и CD45- эритробласты имеют малое присутствие на своей поверхности галектина-9 (медианы 3% и 1% соответственно) и лиганда клеточной смерти PDL1 (медианы 5% и 0,5% соответственно), CD45- эритробласты несут на своей поверхности больше CXCR4 (медиана 60%), чем CD45+ эритробласты (медиана 29%).



При гемолитической анемии в фенотипе костномозговых эритробластов происходят следующие изменения: существенное снижение содержания галектина-3 на CD45+ эритробластах (в норме медиана ~80%, при гемолитической анемии медиана 39%), повышение содержания галектина-9 на CD45+ эритробластах (в норме медиана ~3%, при гемолитической анемии медиана 37%) и лиганда клеточной смерти PDL1 на CD45+ эритробластах (в норме медиана ~1%, при гемолитической анемии медиана 79%), снижение содержания CXCR4 на CD45- эритробластах с одновременным повышением на CD45+ эритробластах, см.Рис.10

Рис. 10 ↑Процентное содержание клеток, несущих исследуемые поверхностные маркеры (галектин 3 Gal3, галектин 9 Gal9, CXCR4, PDL1), от CD45+ и CD45- эритробластов костного мозга мыши; Med, Q25-Q75, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.005, \*\*\*\* P<0.001, ns = non significant не значимо, n=6

Исследуя содержание внутриклеточных иммунорегуляторных молекул в эритробластах костного мозга мыши было показано, что: при гемолитической анемии внутриклеточное содержание TGFb увеличивается как в CD45+, так и в CD45- эритробластах по сравнению с нормой, при гемолитической анемии наиболее значимое увеличение внутриклеточного содержания TGFb можно наблюдать именно в CD45- эритробластах, в 10 раз по сравнению с нормой, при гемолитической анемии внутриклеточное содержание IL10 уменьшается в CD45- эритробластах по сравнению с нормой, см.Рис.11

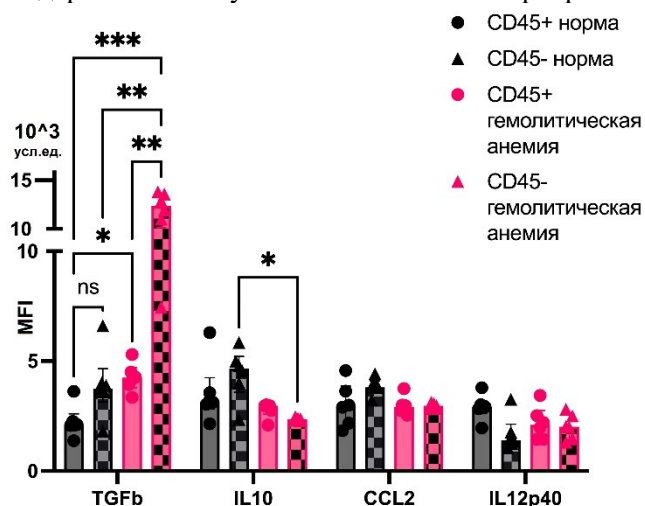
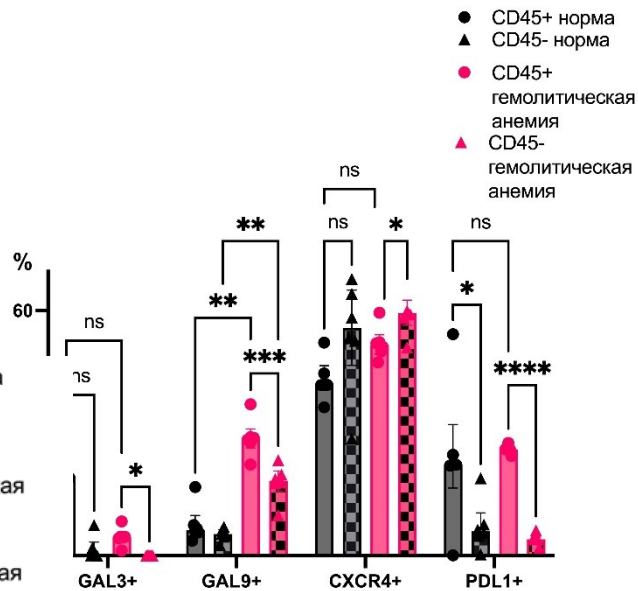
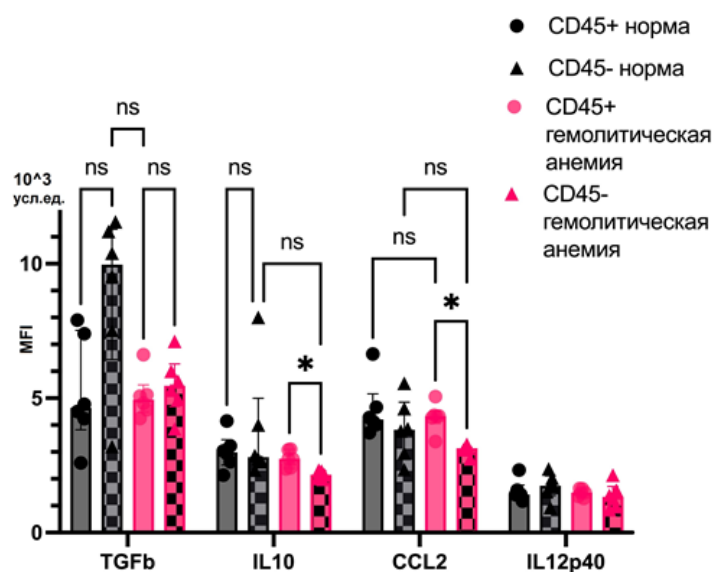


Рис. ←11 Медианная интенсивность флуоресценции (Median Fluorescence Intensity – MFI) внутриклеточного содержания иммунорегуляторных медиаторов (TGFb, IL10, CCL2, IL12p40) в CD45+ и CD45- эритробластах костного мозга мыши; Med, Q25-Q75, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.005, ns = non significant не значимо, n=6

Исследуя иммунорегуляторные молекулы на поверхности эритробластов селезенки мышей, было показано, что: в норме CD45+ эритробласты несут на своей поверхности больше лиганда клеточной смерти PDL1, чем CD45- эритробласты (медианы 20% и 5% соответственно), также и при гемолитической анемии (медианы 22% и 2% соответственно), при гемолитической анемии на CD45+ и CD45- эритробластах повышается содержание галектина-9, причем наиболее значимое повышение – на CD45+ эритробластах (в норме медиана 8%, при гемолитической анемии 29%), см.рисунок 12.

Рис. 12 →Процентное содержание клеток, несущих исследуемые поверхностные маркеры (галектин 3 Gal3, галектин 9 Gal9, CXCR4, PDL1), от CD45+ и CD45- эритробластов костного мозга мыши; Med, Q25-Q75, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.005, \*\*\*\* P<0.001, ns = non significant не значимо, n=6

Исследуя содержание внутриклеточных иммунорегуляторных молекул в эритробластах селезенки мыши было замечено, что при гемолитической анемии CD45- эритробласты селезенки несут внутри своих клеток достоверно меньше IL10 и CCL2 по сравнению с CD45+



эритробластами селезенки (см.рисунок 13).

Рис. 13 ←Медианная интенсивность флюоресценции (Median Fluorescence Intensity – MFI) внутриклеточного содержания иммунорегуляторных медиаторов (TGFb, IL10, CCL2, IL12p40) в CD45+ и CD45- эритробластах селезенки мыши; Med, Q25-Q75, \* P<0.05, ns = non significant не значимо, n=6

Из полученных данных можно сказать, что CD45+ костномозговые эритробласты в норме в большинстве своём несут на своей поверхности галектин-3, в отличие от CD45- эритробластов. При гемолитической анемии содержание Gal3+ CD45+ эритробластов в костном мозге снижалось, а для CD45- эритробластов также оставалось очень низким. Однако, при гемолитической анемии на костномозговых эритробластах достоверно увеличивалось поверхностное содержание галектина-9, причем как на CD45+, так и на CD45- эритробластах. Известно, что одним из основных лигандов галектина-9 является белок на поверхности иммунокомпетентных клеток TIM3, присоединение галектина-9 к TIM3 на Т-лимфоцитах вызывает снижение эффекторных функций Т-киллеров, ингибирование Th1-ответа, индукцию периферической толерантности (Zhu, 2005, Gorman, 2014, Wolf, 2020). Аналогичное явление можно было наблюдать среди селезеночных эритробластов при гемолитической анемии. Среди CD45+ костномозговых эритробластов доля клеток, несущих на своей поверхности PDL1 очень мала, порядка 1-5%, а при гемолитической анемии увеличивается примерно до 22%. В селезенке такого большого скачка не обнаружено, но как в костном мозге, так и в селезенке найдено, что при гемолитической анемии CD45+ эритробласты несут на своей поверхности достоверно больше PDL1, чем CD45- эритробласты. Из чего можно сделать вывод, что иммуносупрессия, оказываемая эритробластами при гемолитической анемии может осуществляться способом контактных взаимодействий CD45+ эритробластов с другими иммунокомпетентными клетками за счёт поверхностной экспрессии молекул галектина-9 и PDL1. По выше представленным данным для CD45- эритробластов наиболее характерна продукция секретируемого медиатора с иммуносупрессивными свойствами – TGFb, в частности, в условиях гемолитической анемии. Это явление наиболее характерно для CD45- эритробластов костного мозга, хотя среди селезеночных эритробластов такого тренда не замечено. Отсюда можно сделать вывод, что CD45- эритробласты могут оказывать иммуносупрессивное действие в условиях гемолитической анемии в основном за счёт продукции растворимых медиаторов, в

частности, TGF $\beta$ . Для разных типов иммунокомпетентных клеток описаны множества функциональных и фенотипических подтипов, например, классические, неклассические и переходные моноциты, M1/M2 макрофаги, Т-хелперные лимфоциты Th1/Th2 и др. Как уже ранее было описано, разные иммунокомпетентные клетки продуцируют большой спектр медиаторов, в частности, цитокинов, хемокинов, ростовых факторов, поверхностных белков, зачастую, с разнонаправленными действиями и противоположными свойствами. И эритробласты также не исключение. В данной работе предложено рассмотреть две группы эритроидных клеток-предшественников мыши CD45+ и CD45-, по существующим данным различающиеся по иммунорегуляторной способности. Для CD45+ эритробластов более характерна способность к оказанию иммуносупрессивных эффектов за счёт контактных взаимодействий посредством поверхностных молекул галектина-9 и PDL1, а для CD45- эритробластов – за счёт продукции растворимых белков с иммуносупрессивными свойствами, в частности, TGF $\beta$ , причём супрессивный потенциал как CD45+, так и CD45- эритробластов усиливается при гемопоэз-активирующем воздействии, в частности, при гемолитической анемии, вызванной введением мышам фенилгидразина.

### **Заключение**

Эритроидные клетки-предшественники обладают спектром характеристик и свойств, позволяющих считать эти клетки иммунорегуляторными. В эритробластах имеет место ранее не описанная экспрессия генов хемокинов, хемокиновых рецепторов, МНС 2 класса, генов белков с антимикробной активностью, а также иных генов, белковые продукты участвуют в процессах реализации врожденного иммунного ответа. При гемопоэз-активирующих воздействиях транскрипционный профиль эритробластов меняется, в частности, при гемолитической анемии и при острой кровопотере можно заметить повышение экспрессии генов, белковые продукты которых участвуют в процессах реализации врожденного иммунного ответа, а при гипоксии имеет место в эритробластах повышение экспрессии генов некоторых цитокинов (*Tnf, Il6*). При гемопоэз-активирующих воздействиях продукция растворимых белков-медиаторов эритробластами меняется незначительно. Хемокины, продуцируемые эритробластами, позволяют рассматривать участие эритроидных предшественников в регуляции миграционных процессов гемопоэтических и иммунокомпетентных клеток. За счет продукции растворимых и поверхностных белков-медиаторов эритробласты способны оказывать регуляторное влияние на иммунокомпетентные клетки. Эффекты растворимых продуктов эритробластов селезенки на лимфоидные клетки заключаются в фенотипических изменениях лимфоцитов, в частности, в присутствии растворимых продуктов эритробластов происходит увеличение содержания PD1+CD19+ В-клеток среди селезеночных МНК мышей, что можно расценивать одним из иммуносупрессивных механизмов на дифференцировку В-лимфоцитов. Продемонстрировано, что в присутствии растворимых продуктов эритробластов происходит увеличение доли CD3+Foxp3+ Т-клеток среди селезеночных МНК мышей что можно считать одним из механизмов влияния эритроидных клеток на дифференцировку Т-лимфоцитов. Эритробласты это неоднородная популяция клеток-предшественников, различающихся по параметрам фенотипа, по транскриптому и способности к продукции иммунорегуляторных молекул. Полученные данные указывают на наличие у эритроидного ростка мыши особой структуры, а именно CD45+ эритробластов с клетками крупного размера и высокой гранулярности и CD45- эритробластов с клетками меньшего размера и низкой гранулярности, что позволяет говорить о потенциальной различной способности этих эритроидных предшественников к иммунорегуляции. При гемопоэз-активирующих воздействиях в кроветворных органах мыши происходит перераспределение клеток в структуре эритроидного ростка, по-видимому, эритробласты разных групп по-разному реагируют на разные гемопоэз-активирующие воздействия. Для CD45+ эритробластов характерно преимущественное присутствие на клеточной поверхности белков с иммуносупрессивными свойствами, в частности, галектина-9 и лиганда клеточной смерти PDL1, поверхностная экспрессия которых значимо увеличивается на CD45+ эритробластах при гемолитической анемии. Для CD45- костномозговых эритробластов характерна преимущественная продукция TGF $\beta$ , которая кратно увеличивается при гемолитической анемии. Обобщая можно заключить, что эритробласты это широкая, неоднородная популяция клеток гемопоэтического происхождения с обширными и ещё не полностью понятыми иммунорегуляторными свойствами.

### **Выводы**

1. Эритробласты синтезируют множество мРНК иммуноактивных белков, в частности хемокинов, цитокинов, но на наиболее высоком уровне отмечены мРНК субъединиц кальпротектина и кателецидина, особенно при гемопоэз-активирующих воздействиях, что свидетельствует об экспрессии эритробластами генов, белковые продукты которых участвуют в противомикробном иммунитете.
2. Эритроидные клетки костного мозга экспрессируют больше мРНК генов антимикробных белков - кальпротектина и кателецидина, а также *Sxcl12, Ctsg*, а эритроидные клетки селезенки экспрессируют достоверно больше мРНК генов: МНС 2 класса, а также *Cd274*, что показывает наличие органоспецифичных отличий в транскриптоме эритробластов.

3. Показано, что эритробласты, полученные от животных с гемолитической анемией, острой кровопотерей, гипоксией, а также от интактных животных, продуцируют на высоком уровне хемокины CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, что отражает роль эритробластов в привлечении и координации иммунных клеток в различных органах

4. Установлено, что добавление растворимых факторов эритробластов, полученных как от интактных мышей, так и от мышей при гемопоэз-активирующих воздействиях (гемолитическая анемия, острая кровопотеря, гипоксия), увеличивает содержание CD19+PD1+ В-клеток и CD3+Foxp3+ Т-клеток среди селезеночных мононуклеарных мышей в культуре, что свидетельствует о регуляторном действии эритробластов на фенотип лимфоидных клеток.

5. Установлено, что CD45+ и CD45- эритробласты мыши различаются не только клеточным размером и гранулярностью, но также и в экспрессии поверхностных и внутриклеточных белков, в частности, при гемолитической анемии для CD45+ эритробластов характерно повышение поверхностной экспрессии молекул галектина-9 и PDL1, а для CD45- эритробластов характерно повышение внутриклеточного содержания TGFb, что свидетельствует о фенотипической гетерогенности эритроидных клеток мыши.

6. Эритробласты продуцируют ряд иммуноактивных растворимых и мембраносвязанных молекул, являющиеся активными регуляторами врождённого и адаптивного иммунитета, а также проявляют органоспецифичные и фенотипические особенности

#### Список опубликованных работ

##### Статьи:

1. Заводский Р.Ю., Шевченко Ю.А., Конева О.Ю., **Назаров К.В.**, Кузнецова М.С., Сенников С.В. Иммунорегуляторная роль эритроидных ядродержащих клеток. Иммунология. 2022; 43 (1): 103–111. doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-1-103-111

2. Шевченко Ю.А., **Назаров К.В.**, Сенников С.В. Исследование фенотипических и цитотоксических свойств эритроидных клеток селезенки при гемопоэз-стимулирующих воздействиях. Медицинская иммунология. 2023;25(3):495-500. doi.org/10.15789/1563-0625-SOP-2730

3. Perik-Zavodskaja O, Perik-Zavodskii R, **Nazarov K**, Volynets M, Alrhoun S, Shevchenko J, Sennikov S. Murine bone marrow erythroid cells have two branches of differentiation defined by the presence of CD45 and a different immune transcriptome than fetal liver erythroid cells. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(21):15752. doi.org/10.3390/ijms242115752

4. **Nazarov K**, Perik-Zavodskii R, Perik-Zavodskaja O, et al. Phenotypic alterations in erythroid nucleated cells of spleen and bone marrow in acute hypoxia. Cells. 2023;12(24):2810. doi:10.3390/cells12242810

5. **Nazarov K**, Perik-Zavodskii R, Perik-Zavodskaja O, Alrhoun S, Volynets M, Shevchenko J, et al. (2024) Acute blood loss in mice forces differentiation of both CD45-positive and CD45-negative erythroid cells and leads to a decreased CCL3 chemokine production by bone marrow erythroid cells. PLoS ONE 19(9): e0309455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309455>

6. **Nazarov K**, Perik-Zavodskii R, Shevchenko J and Sennikov S. Erythroblasts promote the development of a suppressive lymphocyte phenotype via Treg induction and PD1 upregulation on the surfaces of B-cells a study on the subpopulation-specific features of erythroblasts, Curr. Issues Mol. Biol. 2025, 47(7), 550; <https://doi.org/10.3390/cimb47070550>

##### Тезисы материалов конференций:

**К. В. Назаров**, Ю. А. Шевченко, Р. Ю. Перик-Заводский, О. Ю. Перик-Заводская, С. Алрхмун, М. О. Вольнец, С. В. Сенников, ОСТРАЯ КРОВОПОТЕРЯ ВЫЗЫВАЕТ ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РАМР-ГЕНА CLEC5A В ЭРИТРОИДНЫХ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ, ОСТРАЯ КРОВОПОТЕРЯ ВЫЗЫВАЕТ ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РАМР-ГЕНА CLEC5A В ЭРИТРОИДНЫХ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ, XI Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов фундаментальной медицины — 2024 : сб. тез. / АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2024. — 780 с. DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-30

##### Список используемых сокращений

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ДК – дендритные клетки

МНК – мононуклеарные клетки

об. в мин. – оборотов в минуту

CD – кластер дифференцировки

CFSE – карбоксифлуоресцеин сукцинимидиловый эфир

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

IL – интерлейкин  
MHC – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex), он же  
HLA – человеческий лейкоцитарный антиген (human leucocyte antigen)  
PBS – фосфатно-солевой буферный раствор (phosphate-buffered saline)  
PD-1/PD-L1 – белок программируемой клеточной смерти и его лиганд  
TCR – Т-клеточный рецептор  
TGF – трансформирующий фактор роста  
TIM3 - T-cell immunoglobulin and mucin domain  
TNF – фактор некроза опухоли  
Th – Т хелперные лимфоциты  
Treg – Т регуляторные лимфоциты