

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической  
иммунологии»

На правах рукописи



Назаров Кирилл Вячеславович

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

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.м.н., проф. Сенников Сергей Витальевич

Новосибирск – 2025

## Оглавление

Введение	стр.3
Глава 1 Обзор литературы	стр.13
1.1 Цитологические характеристики эритропоэза	стр.13
1.2 Пространственно-временные особенности эритропоэза у различных видов животных	стр.15
1.3 Поверхностные маркеры эритроидного ростка и их роль в адгезионных взаимодействиях и дифференцировке	стр.18
1.4 Регуляция эритропоэза	стр.22
1.5 Эритропоэз и его регуляция в условиях гемопоэз-активирующих воздействий	стр.30
1.6 Иммунорегуляция эритроидными клетками	стр.36
1.7 Роль эритроидных клеток при беременности	стр.43
1.8 Роль эритроидных клеток при онкологических заболеваниях	стр.46
Глава 2 Материалы и методы	стр.57
Глава 3 Результаты собственных исследований	стр.69
3.1 Исследование транскриптома эритробластов	стр.69
3.2 Исследование секретома эритробластов	стр.75
3.3 Функциональные тесты: Влияние растворимых продуктов эритробластов на фенотип иммунокомпетентных клеток	стр.78
3.4 Фенотипические особенности эритробластов	стр.84
3.5 Оценка экспрессии поверхностных и внутриклеточных иммунорегуляторных белков CD45 <sup>+</sup> и CD45 <sup>-</sup> эритробластами	стр.91
Глава 4 Обсуждение полученных результатов	стр.96
Заключение	стр.107
Выводы	стр.108
Список опубликованных работ	стр.110
Список используемых сокращений	стр.111
Список используемой литературы	стр.113

## **Введение**

### ***Актуальность***

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 (Masario, 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 ядросодержащие 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.

***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 эритробластах 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 эритробластами *in vitro* в норме и при гемопоэз-активирующих воздействиях
3. Оценить *in vitro* иммунорегуляторные эффекты, реализуемые эритробластами 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 эритроблестах различных органов мыши в норме и при гемопоэз-активирующих воздействиях

### ***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 эритроблестах 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.

### ***Научная новизна***

Впервые показана в эритроблестах мыши экспрессия генов хемокинов и хемокиновых рецепторов, экспрессия генов белков с антимикробной активностью *S100a8*, *S100a9*, *Camp*, вовлеченных в реализацию врожденного иммунного ответа; показаны органоспецифические отличия в транскриптом эритробластов 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: МНС 2 класса, а также *Cd274*. Показаны изменения в транскриптом эритробластов мышей, подвергнутых гемопоэзз-активирующим воздействиям, в частности, при воздействиях в эритробластах 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 эритробластами в условиях *in vitro*, в частности, хемокинов CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11. Описаны новые иммунорегуляторные эффекты на иммунокомпетентные клетки *in vitro*, реализуемые эритробластами, 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+ эритробласты характеризуются большим клеточным размером и высокой гранулярностью, также для CD45+ эритробластов показана преимущественная поверхностная экспрессия белков с иммуносупрессивными свойствами – галектина-9 и PDL1, CD45- эритробласты характеризуются меньшим клеточным размером и низкой гранулярностью, также для CD45- эритробластов показана наиболее преимущественная способность к синтезу TGFb, по сравнению с CD45+ эритробластами.

### ***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 эритробластов, в частности, о способности к регуляции процессов врожденного иммунного ответа. Представленные здесь данные о продукции эритробластами хемокинов, причём продукция хемокинов эритробластами носит консервативный характер, свидетельствуют об участии эритробластов в миграции клеток. Регуляторные эффекты растворимых факторов эритробластов выражены в: направлении дифференцировки Т-клеток в сторону Foxp3<sup>+</sup> клеток, то есть Т-регуляторов и направлении дифференцировки В-клеток в сторону PD1<sup>+</sup> 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 эритробластов различных размеров, гранулярности, а также различающихся по фенотипическому маркеру CD45, а, следовательно, различных иммунорегуляторных свойств. Показано, что CD45<sup>+</sup> эритробласты это клетки большего размера с высокой гранулярностью, а также для CD45<sup>+</sup> эритробластов при гемопоэз-активирующем воздействиикратно увеличивается экспрессия поверхностных молекул с иммуносупрессивной активностью (галектин-9 и PDL1), а CD45<sup>-</sup> эритробласты это клетки меньшего размера с низкой гранулярностью, также для CD45<sup>-</sup> эритробластов при гемопоэз-активирующем воздействии показано кратное увеличение синтеза растворимого медиатора с иммуносупрессивным действием (TGFβ). 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, секретостаза 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.

### ***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 клинического иммунологии.

### ***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.

### ***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.

### ***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.

### ***Соответствие специальности***

Данная диссертация соответствует паспорту специальности 3.2.7. Иммунология (направление 1. Фундаментальные исследования, посвященные изучению строения, и функционирования иммунной системы, ее онто- и филогенеза; направление 2. Изучение механизмов врожденного и адаптивного иммунитета в норме и при патологии; направление 3. Изучение молекулярных и клеточных основ противобактериальной, противовирусной, противоопухолевой, противопаразитарной иммунной защиты).

### *Благодарности*

Автор выражает признательность научному руководителю работы д.м.н. Сенникову С.В. за внимательное руководство, к.б.н. Шевченко Ю.А. за помощь в освоении экспериментальных методик, ценные замечания и ментальную поддержку в ходе работы, Перик-Заводскому Р.Ю. за помощь в анализе и интерпретации полученных данных, а также всем сотрудникам лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ.

## Глава 1 Обзор литературы

### *1.1 Цитологические характеристики эритропоэза*

Эритропоэз — это процесс, при котором зрелые эритроциты образуются путём деления и дифференцировки из гемопоэтических стволовых клеток, поэтому эритропоэз неразрывно связан с общим процессом гемопоэза в организме. Этот процесс можно разделить на 3 стадии: ранний эритропоэз, терминальная дифференцировка эритробластов и созревание ретикулоцитов. В раннем эритропоэзе плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки пролиферируют и дифференцируются в коммитированные эритроидные предшественники: бурст-образующие эритроидные единицы БОЕ-Э, а затем колониеобразующие эритроидные единицы КОЕ-Э, которые дифференцируются в проэритробласты. Терминальная дифференцировка эритробластов начинается с морфологически распознаваемых проэритробластов, которые впоследствии подвергаются последовательным митозам, становясь базофильными, полихроматофильными и далее оксифильными ортохромофильными) эритробластами, которые затем выбрасывают ядро (энуклеация) и становятся ретикулоцитами. Во время терминальной дифференцировки эритроидных клеток происходит несколько выраженных изменений, включая уменьшение размера клеток, увеличение гемоглобинизации, усиление конденсации хроматина, выход из клеточного цикла и в итоге выброс клеточного ядра. Кроме того, биохимический анализ показывает, что терминальная дифференцировка также сопровождается изменениями в профиле экспрессии мембранных белков. На заключительном этапе эритропоэза ретикулоциты созревают в дисковидные эритроциты, что сопровождается потерей внутриклеточных органелл, потерей площади поверхности, уменьшением объема клеток и реорганизацией мембранных и скелетных компонентов (Jingping, 2013, Niu, 2024).

Эритропоэз — это уникальный процесс, в котором каждое деление клетки одновременно связано со стадией дифференцировки. Эти наблюдения верны как для терминальной дифференцировки эритробластов человека, так и для эритробластов мышей, с основным различием в том, что мышинные клетки претерпевают на одно деление меньше от проэритробласта до стадии ортохроматического эритробласта (Xiuli, 2015). В экспериментах на мышах установлено, что один проэритробласт претерпевает 3 митоза с образованием последовательно 2 базофильных эритробластов, 4 полихроматических эритробластов и 8 ортохроматических эритробластов. Есть предположение, что человеческие эритробласты подвергаются дополнительному митозу. Чтобы изучить этот вопрос, отсортированные эритробласты каждой стадии развития культивировали и исследовали их способность к размножению. Показано, что, хотя проэритробласты продолжали пролиферировать в течение 4 дней и их количество увеличилось примерно в 18 раз за этот период, оксифильные эритробласты вообще не могли делиться. Количественный анализ пролиферации четырёх независимых экспериментов показал, что проэритробласты, ранние базофильные, поздние базофильные, полихроматофильные и ортохромофильные эритробласты прошли 4, 3, 2, 1 и 0 митозов соответственно (Jingping, 2013).

Переключение на терминальную дифференцировку в предшественниках CFU-E включает в себя ряд событий, которые синхронизированы с клеточным циклом и которые можно отслеживать определенным образом, наблюдая изменения в поверхностной экспрессии CD71 и Ter119. Предшественники CFU-E проходят ограниченное количество делений для самообновления, клетки-потомки последнего клеточного деления претерпевают резкое увеличение поверхностного CD71, когда находятся в начале S-фазы клеточного цикла. Переход, который зависит от прогрессирования S-фазы, знаменует переключение на терминальную дифференцировку и на начало зависимости клеток от эритропоэтина. Последующая индукция эритроидных генов, включая экспрессию маркера Ter119, происходит примерно в то время, когда эти клетки проходят следующий митоз. При переключении с самоподдержания на терминальную дифференцировку

происходит сокращение S-фазы клеточного цикла, для крысиных эритробластов характерна чрезвычайно короткая S-фаза - 2,5 часа (Monette, 1968, Hwang, 2017).

У млекопитающих в ходе дифференцировки эритробласты подвергаются энуклеации и клиренсу органелл, становясь зрелыми эритроцитами. Органеллы очищаются аутофагическими путями, неспецифически нацеленными на органеллы и цитозольное содержимое, или посредством специфической митофагии, нацеленной на митохондрии. Функционал митохондрий в эритроидных клетках не ограничивается координацией метаболизма и гибели клеток, сюда входят такие процессы как синтез гема, синтез простетической группы, необходимой для сборки гемоглобина. У млекопитающих субклеточная локализация митохондрий и взаимодействие митохондрий с другими структурами, такими как эндоплазматический ретикулум и ядро, могут иметь значение для удаления ядра, то есть энуклеации. Обнаружено, что митохондрии постепенно вычищаются со значительным переключением между стадиями полихроматического и оксифильного эритробласта, приобретая округлую форму и теряя места контакта с ЭПР и с ядром. Эндосомы и мультивезикулярные тельца, которые, как известно, участвуют в транспорте железа и синтезе гема, увеличиваются во время перехода от базофильного к полихроматическому эритробласту; аутофагические структуры, такие как аутофагосомы, увеличиваются от стадии проэритробласта к оксифильному эритробласту. Наверно ожидаемо в соответствии с метаболическими изменениями, накопление гликогена наблюдается на стадии оксифильного эритробласта (Dussouchaud, 2022).

## ***1.2 Пространственно-временные особенности эритропоэза у различных видов животных***

Среди животных клетки крови обнаружены у разных типов беспозвоночных, в частности, у плодовой мухи *Drosophila melanogaster*. *Drosophila melanogaster* — это универсальный модельный организм с простой кроветворной системой, который используют как типичный архетип кроветворения беспозвоночных, сравнивая ее с моделями кроветворения высших позвоночных. Разумеется, система

крови и кроветворения у плодовой мухи имеет свои особенности, в частности, незамкнутая кровеносная сеть, жидкость, функционально схожая с кровью, называемая у беспозвоночных гемолимфой, которая медленно омывает органы и полости тела, т.к. физические барьеры по типу эндотелия практически отсутствуют, а также несколько иные клетки, циркулирующие в гемолимфе (Gautam, 2021).

Нередко модельным объектом в исследованиях эритропоэза является рыба дамский чулок – она же Zebrafish, *Danio rerio* (Zhang, 2021). Молекулярные пути, а также регуляторные механизмы эритропоэза в высокой степени консервативны у позвоночных, поэтому нередко исследователи проводят параллели в этом аспекте между рыбами и млекопитающими. Эритропоэз как у *Danio rerio*, так и у человека включает две последовательные волны: примитивную волну и дефинитивную волну. Кроме того, регуляторная сеть эритропоэза в высокой степени консервативна у *Danio rerio* и людей. Например, гомологи почти всех факторов транскрипции, играющих важную роль в эритропоэзе млекопитающих, присутствуют у *Danio rerio*. Из-за высокой консервативности эритропоэза у позвоночных мутации в генах эритропоэза обычно приводят к схожим фенотипам у *Danio rerio* и человека. Хотя эритропоэз *Danio rerio* очень похож на эритропоэз млекопитающих, он отличается в нескольких аспектах: различные анатомические локализации примитивного и дефинитивного эритропоэза, наличие ядер в эритроцитах рыб (Zhang, 2021).

В общем, гемопоэз у высших позвоночных, в частности, у мыши и человека в пренатальный период имеет множество сходств, но также и различия, связанные с пространственно-временными особенностями развития этих организмов. У мыши гемопоэз до 8-9 дня эмбрионального периода (обычно обозначают E8-E9) идёт только экстраэмбрионально в желточном мешке, где происходит закладка первичных клеток крови, практически не имеющих каких-либо отличий между собой. Примерно с E9-E10 гемопоэтические очаги обнаруживаются также ещё в аорто-мезонефральном регионе. С этого же момента в развивающихся сосудах эмбриона можно обнаружить клетки эритроидного ряда различных генераций –

проэритробласты, базофильные, полихроматофильные, оксифильные эритробласты, ретикулоциты и пиреноциты, которые представляют собой пикнотизированное ядро энуклеровавшего эритробласта, окружённое тонким ободком цитоплазмы. К E10-E11 дню начинается миграция первичных клеток крови в эмбриональную печень. На E14 гемопоэз также начинает идти и в селезёнке эмбриона, а с E18 появляются костные структуры и происходит заселение костного мозга стволовыми кроветворными клетками (Palis, 2014). К этому времени из кровотока исчезают проэритробласты и эритробласты различных стадий дифференцировки, а также пиреноциты, т.к. после энуклеации их быстро захватывают макрофаги костного мозга или печени, а в кровоток поступают ретикулоциты, где они окончательно дозревают до эритроцитов. После рождения гемопоэтические очаги ещё сохраняются в печени примерно в течение первых 3 суток, далее с течением времени их количество резко уменьшается и снижается до нуля к 8-9 постнатальному дню. В селезёнке гемопоэз, в частности, эритропоэз может быть активирован в условиях стресса. У человека в пренатальный период до 9-10 недели гемопоэз идёт только в желточном мешке. С 10-12 недели в фетальной печени обнаруживаются маленькие и нерегулярные очаги гемопоэза. С 13 недели печёночная паренхима является основным местом кроветворения, небольшую долю в этом процессе принимает на себя селезёнка плода. С 23 недели начинается переход гемопоэза в костные полости трубчатых костей и к моменту рождения печень практически полностью теряет гемопоэтическую функцию (Palis, 2014).

Физиологическое развитие и созревание эритроцитов в костном мозге регулируется поддерживающим микроокружением, состоящим из макрофагов и мезенхимальных стромальных клеток, в так называемых эритроидных островках. Эти островки считаются функциональными единицами эритропоэза, их можно обнаружить с помощью рутинных гематологических красителей и специфических иммунологических красителей на биоптатах костного мозга (Chasis, 2008). С возрастом количество эритроидных островков в костном мозге уменьшается, в то время как их размер увеличивается, что может указывать на то, что уменьшение количества стволовых клеток и эритроидных предшественников во время старения

может компенсироваться повышенной пролиферацией имеющихся на данный момент клеток-предшественников, а также гипертрофией самих клеток. У пациентов с миелодиспластическим синдромом были описаны нарушения формирования эритроидных островков, а также структурные аномалии внутри этих островков. При некоторых МДС аномальное образование эритроидных островков может быть единственным патологическим изменением, обнаруженным в гистологическом препарате костного мозга. Более того, было описано, что плотность эритроидных островков обратно пропорциональна общей выживаемости у пациентов с МДС. Однако, изменения конфигурации и размера островков (например, увеличение размера) также могут быть обнаружены, когда есть запрос в организме на повышенную продукцию эритроцитов при патологических состояниях, таких как гемолитическая анемия или острая кровопотеря (Buesche, 2016).

Имеются сообщения о наличии популяции гемопоэтических клеток-предшественниц в тонкой кишке мыши среди эпителиальных клеток, причём эти гемопоэтические клетки-предшественницы обладают способностью образовывать кроветворные колонии в селезенке летально облучённых мышей на 8 сутки. Кишечные эпителиоциты стимулируют пролиферативную и колониобразующую активность кроветворных стволовых клеток за счет продукции GM-CSF (Temchura, 2002).

### ***1.3 Поверхностные маркеры эритроидного ростка и их роль в адгезионных взаимодействиях и дифференцировке***

Эритроидные ядродержащие клетки имеют на своей поверхности белки-маркеры: CD71 (рецептор трансферрина) и TER119 (его аналог у человека CD235a - гликофорин А). Также эритробласты экспрессируют разнообразный набор молекул адгезии, которые претерпевают динамические изменения во время дифференцировки. Эти белки опосредуют взаимодействия как эритробласт/эритробласт, так и эритробласт/макрофаг, а также прикрепления к компонентам внеклеточного матрикса, таким как фибронектин и ламинин (Elahi,

2013). Фибронектин влияет на рост, дифференцировку, адгезию и миграцию нескольких типов клеток, включая гемопоэтические клетки. Эритробласты экспрессируют 2 интегрина:  $\alpha 4\beta 1$  и  $\alpha 5\beta 1$ , которые связывают фибронектин. Однако экспрессия  $\alpha 5\beta 1$  подавляется во время терминальной дифференцировки, и эритробласты на поздних стадиях экспрессируют почти исключительно  $\alpha 4\beta 1$  на своей поверхности. Интегрин  $\alpha 4\beta 1$  опосредует адгезию к нескольким участкам гликопротеина фибронектина (Roseblatt, 1991). По всей видимости, молекулы адгезии: интегрин, CD45, CD44 и др. опосредуют прилипающую способность эритробластов к различным матриксам. Поверхностная экспрессия CD71 увеличивается в 3-4 раза от проэритробластов до базофильных и полихроматофильных эритробластов. Однако оксифильные эритробласты поздней стадии имели более низкие поверхностные уровни CD71, по сравнению с проэритробластами. Логично предположить, что CD71 исчезает из клетки в ходе энуклеации, т.к. на зрелой клетке CD71 отсутствует. Также на поверхности эритробластов присутствует белок CD44 – это молекула адгезии, миграции и пролиферации клеток, в частности лимфоцитов. CD44 демонстрирует прогрессирующее и резкое снижение в процессе дифференцировки от проэритробласта до ретикулоцита. Аналогичный паттерн экспрессии демонстрируют ICAM-4, актин, тромбоспондиновый рецептор CD36 (Chen, 2009, Jingping, 2013).

TER-119 появляется на эритроидных клетках по мере дифференцировки, начиная с проэритробласта и присутствует на всех последующих стадиях и на конечных эритроцитах. БОЕ-Э и КОЕ-Э, а также опухолевые эритролейкемические клетки не экспрессируют TER-119. У взрослых мышей TER-119 присутствует на поверхности 20–25% клеток костного мозга и 2–3% клеток селезенки, но не на тимоцитах и клетках лимфатических узлов. В кроветворных тканях плода 30–40% клеток желточного мешка (на E10), 80–90% клеток печени плода (на E14) и 40–50% клеток печени новорожденного имеют на своей поверхности TER-119 (Tatsuo, 2000).

В диагностике нашли применение также поверхностные молекулы: эндоглин (CD105) и  $\epsilon$ -кадгерин. CD105 имеет особое значение для обнаружения незрелых эритроидных предшественников в костном мозге пациентов с МДС.  $\epsilon$ -кадгерин также специфически экспрессируется на поверхности эритропоэтических клеток-предшественников в костном мозге человека, однако  $\epsilon$ -кадгерин не используется рутинно в качестве эритроидного маркера в исследованиях методом проточной цитометрии (Bühning, 1996, Eidenschink Brodersen, 2015).

Ху с коллегами обнаружили, что CD63 может служить надежным поверхностным маркером для выделения эритроидных клеток-предшественников у человека и что CD71+ GypA+CD63+ эритроидные клетки присутствовали на нескольких стадиях развития. CD63 является членом семейства тетраспанинов и связан с активацией широкого спектра иммунных клеток, включая Т-клетки, дендритные клетки и нейтрофилы, посредством активации сигнальных путей, таких как АКТ, MAPK и VEGF-A. Поэтому авторы предполагают, что CD63, экспрессируемый на эритроидных клетках, является функциональным и участвует в посредничестве их иммуномодулирующих ролей, хотя эта гипотеза еще не подтверждена (Ху, 2022).

Есть сведения о том, что эритробласты экспрессируют галектины-1, -3, -9 (Shahbaz, 2018, Tsukamoto, 2024) – довольно эволюционно древние и консервативные белки, связывающие лектины. Роль галектинов разнообразна и до сих пор неполностью понята, описано их участие в процессах активации иммунокомпетентных клеток, гемопоэзе, миграции и дифференцировки клеток, взаимодействия с межклеточным матриксом (Hara, 2020). Галектин 3 модулирует экспрессию гликопротеинов, включая CD44, регулируя эндоцитоз. Кроме того, связывание галектина 3 с рецепторными киназами, такими как CD45 и TCR, модулирует работу этих рецепторов (Hara, 2020). Введение антитела против Gal-3 самкам мышей BALB/c вызывало волчаночноподобные гистологические изменения (Shi, 2015). В свете онкологии известно, что экспрессия Gal-3 повышается при многих типах рака, однако в исследованиях, сообщающих об увеличении или снижении показателей выживаемости, имеются различные

результаты (Dong, 2018). Относительно других галектинов, сообщается, что повышенная экспрессия галектина-1 связана с плохим прогнозом, тогда как повышенная экспрессия галектина-9 считается маркером благоприятного прогноза (Thijssen, 2015). Gal-3 экспрессируют опухоль-ассоциированные макрофаги, секретирует опухолевая строма, галектин-3 играет важную роль в микроокружении опухоли, способствуя прогрессированию опухоли. Gal-3 также влияет на ангиогенез опухоли, регулируя фактор роста эндотелия сосудов (Machado, 2014). Описана поверхностная экспрессия галектина-9 на ранних эритроидных предшественниках с фенотипом c-Kit<sup>hi</sup> Sca1-CD34-CD71+, которые можно условно считать клетками BFU-E (Tsukamoto, 2024). Галектин-9 хорошо известен как лиганд к TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3), который регулирует ответ Т-клеток, вызывая истощение Т-лимфоцитов, поэтому галектин-9 рассматривают как чек-пойнт молекулу (Yang, 2021, Shahbaz, 2020). Ось TIM-3/Gal-9 описана как негативный регулятор эффекторных лимфоцитов, таких как Th1, Th17 и антигенспецифические CD8+ Т-клетки (Zhu, 2005, Seki, 2008, Sehrawat, 2010). TIM-3/Gal-9 путь вовлечён в реализацию иммуносупрессии, опосредованной Treg лимфоцитами и миелоидными супрессорами (Wang, 2009, Dong, 2021). Wu с коллегами также сообщают, что взаимодействие Gal-9 с CD44 усиливает стабильность и функциональные свойства индуцированных на периферии Т регуляторов (Wu, 2014). Также есть сведения о том, что Gal-9 усиливает активность натуральных киллеров через взаимодействие на их поверхности с CD44 (Rahmati, 2023). Для галектина-9 описан цитотоксический эффект на клетки острого миелоидного лейкоза, включая CD34+ стволовые лейкемические клетки, полученные от пациентов, но на здоровые гемопоэтические стволовые клетки CD34+, полученных из пуповинной крови этот цитотоксический эффект отсутствовал (Choukrani, 2023).

Показано также, что эритроидные клетки-предшественники экспрессируют на ранних стадиях один из белков аквапоринов AqpO, по мере течения эритропоэза и дифференцировки клетки экспрессия этого аквапорина стремительно снижается. Возможно этот белок можно рассматривать как новый маркёр эритроидных клеток

(Wang, 2021). Меланокортиновые рецепторы среди иммунных клеток есть на нейтрофилах, лимфоцитах, макрофагах, а также присутствуют на эритроблестах (Star, 1995, Catania, 1996). Поверхностная экспрессия MCR1, 2 и 5 показывает их участие в трансдукции сигнала от рецептора эритропоэтина EpoR. MCR1 и 2 участвуют в дифференцировке базофильных и полихроматофильных эритробластов, а MCR5 – в подготовке оксифильного эритробласта к энуклеации, т.е. поляризации клетки и сборке сократительного актомиозинового кольца. Добавление АКТГ, выделенного из плаценты крыс на среднем сроке беременности, к культуре эритробластов ускорило энуклеацию, т.е. созревание эритроидных клеток, а также вызвало секрецию этими клетками фактора ингибирования лейкемии LIF (Simamura, 2015). Также показано, что гемопоэтические клетки-предшественники экспрессируют все три типа рецепторов вазопрессина V1a, V1b, V2, а Arg-вазопрессин вызывает в этих клетках фосфорилирование STAT5 также, как это делает эритропоэтин. Вероятно, этот гипоталамический гормон может активировать эритропоэз (Mayer, 2017).

#### ***1.4 Регуляция эритропоэза***

Регуляция эритропоэза осуществляется различными путями. Здесь участвуют FasL, эритропоэтин, цитокины, глюкокортикоиды, ядерные факторы (например, рецептор активируемый пролифератором пероксисом  $\alpha$  PPAR- $\alpha$ ). Более того, эритропоэз регулируется доступностью питательных веществ, включая глюкозу, L-глутамин и железо. На самых ранних стадиях развитие эритроидных предшественников в основном зависит от SCF и c-Kit и дополнительно поддерживается тромбopoэтином, GM-CSF, IL-3 и IL-11. На более поздних стадиях эритропоэтин вместе с SCF являются основными регуляторами дифференцировки эритроидных клеток (Grzywa, 2021). Хотя Fas экспрессируется на эритроблестах человека на всех стадиях терминальной дифференцировки, только в незрелых эритроблестах перекрестное связывание Fas вызывает апоптоз. FasL не экспрессируется до поздней стадии дифференцировки, а ортохроматические эритроблесты демонстрируют основанную на Fas цитотоксичность в отношении

незрелых эритробластов. Однако, во время стресса передача сигналов от рецептора эритропоэтина подавляет Fas и FasL эритробластов, способствуя тем самым сохранению эритропоэтического ответа на стрессовое воздействие (Socolovsky, 2007). Интересно, что гиперэкспрессия Fas была обнаружена в стволовых клетках CD34<sup>+</sup> у пациентов с апластической анемией, что может способствовать подавлению кроветворения при этом тяжелом заболевании (Niho, 1998).

Эритропоэтин является основным регулятором эритропоэза, причем как в стрессовых, так и в нормальных физиологических условиях. Его рецептор EpoR экспрессируется эритроидными предшественниками, а также дендритными клетками, гранулоцитами, мегакариоцитами, эндотелием, кардиомиоцитами, клетками астроглии и даже клетками некоторых типов солидных опухолей, и представляет собой мембранный белок-гомодимер из семейства рецепторов цитокинов, тесно связанный с цитоплазматическими тирозин-киназами Jak2. После лигирования EpoR эритропоэтином происходит активация Jak2, которая задействует несколько нижестоящих вторичных посредников, включая, киназу PI3, Ras, PKC, PLC $\gamma$  и Stat5. Сигналинг EpoR очень важен во время стресса. Показано, что мыши, экспрессирующие пониженное количество EpoR, или EpoR, лишенный тирозинов в цитоплазматических мотивах рецептора, имеют нормальный базальный эритропоэз, но недостаточный эритропоэтический ответ на стресс. Кроме того, у мышей, лишенных Stat5, наблюдается дефицит реакции на стресс, они страдают анемией и часто умирают в перинатальный период. Недостаточная реакция на стресс у мышей с дефицитом Stat5 была связана со снижением экспрессии антиапоптотического белка Bcl-xL, что вело к снижению выживаемости ранних эритробластов у этих животных. Предыдущие исследования показали, что количество эритроидных колониеобразующих единиц КОЕ-Э в селезенке резко возрастает в результате стресса. Для их выживания требуется EpoR (Ying, 2006). Известно, что эритропоэтин подавляет экспрессию Fas и FasL в эритробластах, чтобы уравновесить негативные сигналы и предотвратить излишний апоптоз эритробластов (Grzywa, 2021). Рецептор эритропоэтина EpoR

необходим для выживания эритробластов, эритроидная дифференцировка в печени плода EpoR  $-/-$  останавливается на стадии CFU-E (Malik, 2013).

Эритробласты проходят меньшее количество и более медленные клеточные циклы при отсутствии сигнала EpoR. CFU-E экспрессируют рецепторную тирозинкиназу Kit и рецептор интерлейкина-3 (von Lindern, 2004). Также у эритропоэтина есть и неэритропоэтические влияния, например, лигирование EpoR его естественным агонистом – эритропоэтином - на поверхности дендритных клеток, выращенных из костномозговых предшественников *in vitro*, приводит к усилению экспрессии MHC II класса, костимулирующих молекул CD80, 86 и увеличивает секрецию IL-12 этими клетками (Lifshitz, 2009).

Помимо Fas/FasL, в гомеостазе эритроидных клеток участвует PD-1 и его лиганд PD-L1. Взаимодействие PD-1/PD-L1 ослабляет положительные сигналы, возникающие в результате активации TCR, ингибирует пролиферацию и секрецию цитокинов, а также способствует апоптозу Т-клеток. PD-1 экспрессируется на поверхности лимфоцитов после активации, в то время как его лиганд, PD-L1, экспрессируется многими типами гемопоэтических клеток и некоторыми негемопоэтическими клетками, особенно после стимуляции интерферонами (Qin, 2019). Путь PD-1/PD-L1 играет роль в развитии и поддержании фетоматеринской толерантности. Высокая экспрессия PD-L1 и PD-L2 наблюдается в эритробластах во время беременности. Причем содержание эритробластов PD-L1+ или PD-L2+ выше в плаценте, чем в селезенке беременных мышей. Однако, эритробласты печени плода не экспрессируют PD-L1 или PD-L2. Блокада PD-L1 отменяет иммуносупрессивное действие эритробластов, вызванных беременностью (Delyea, 2018).

Фактор транскрипции GATA-1 имеет решающее значение для нормальной дифференцировки клетки в эритроидном направлении. Интересно, что проэритробласты подвергаются апоптозу в отсутствие GATA-1, а его гиперэкспрессия подавляет терминальную дифференцировку (Gutiérrez, 2004, Fujiwara, 1996, Whyatt, 2000). Активация рецепторов смерти приводит к запуску

каспаз, которые расщепляют GATA-1, что приводит к остановке созревания или апоптозу эритроидных клеток. Остановка созревания, вызванная деградацией GATA-1, приводит к накоплению эритробластов на самых ранних стадиях дифференцировки. Более того, подавление GATA-1 снижает индукцию антиапоптотических белков, включая Bcl-xL и Bcl-2 (Bouchnita, 2016). Более того, GATA-1 отвечает за репрессию GATA-2, который регулирует пролиферацию и поддержание стволовой клетки крови и ингибирует дифференцировку эритробластов, а также PU.1, который способствует дифференцировке миелоидных клеток, подавляя дифференцировку в эритроидном направлении. Другие факторы транскрипции, имеющие решающее значение для судьбы эритроидных клеток, включают GFI1b, Klf1, Tal1, Lmo2 и c-Myc (Grzywa, 2021). Шапероновый белок теплового шока 70 - HSP70 - играет существенную роль в защите GATA-1 от расщепления каспазой. Действительно, во время эритроидной дифференцировки HSP70 проникает в ядро во время активации каспазы и на этом уровне взаимодействует с GATA-1, защищая его от расщепления. Если эритробласт лишён эритропоэтина, HSP70 экспортируется из ядра и позволяет GATA-1 расщепляться в эритроидных клетках-предшественниках. Эта модель, в которой судьба эритроидных предшественников определяется локализацией HSP70 в ядре, как было показано, изменяется при неэффективном эритропоэзе при различных анемических состояниях, таких как  $\beta$ -талассемия, миелодиспластический синдром и других (Valent, 2018, Arlet, 2014, Hermine, 2013).

Эффект глюкокортикоидов на созревание эритроидных клеток скорее угнетающий, показано, что глюкокортикоиды замедляют или останавливают дифференцировку CFU-E в культуре, способствуя вместо этого обширному самообновлению. Изъятие глюкокортикоидов из культуры ускоряет быструю индукцию эритроидной терминальной дифференцировки и её завершение в течение ~72 часов (von Lindern, 1999). Синтетический глюкокортикоид дексаметазон снижает экспрессию GATA-1 и 2 в эритроидных клетках-предшественницах, но увеличивает экспрессию генов, чьи промоторы обогащены сайтами связывания для HIF1 $\alpha$ . Это говорит о том, что HIF1 $\alpha$  и глюкокортикоиды

могут вызывать экспрессию одних и тех же генов, то есть действовать синергично. HIF1 $\alpha$  стимулирует самообновление БОЕ-Э, т.е. симметричные деления эритроидных клеток-предшественниц. Стимуляция БОЕ-Э к самообновлению зависит от SCF и низкого уровня глюкокортикоидов, что в итоге даёт большее количество КОЕ-Э и эритробластов различных стадий дифференцировки *in vitro*. Также HIF1 $\alpha$  вызывает экспрессию генов цепей фетального гемоглобина в клетках-предшественницах эритроцитов и эритропоэтина в почках (Perry, 2007).

Цитокины макрофагов, включая IGF-1, вызывают рост как БОЭ-Е, так и КОЕ-Э (Sawada, 1989). Растворимые факторы, секретируемые эритробластами, также выполняют функции в эритроидной нише. Недавно было обнаружено, что Gas6, секретируемый белок, который увеличивает пролиферацию и выживаемость незритроидных клеток, высвобождается эритробластами в ответ на Epo. Секретированный Gas6 связывается со своим рецептором и, активируя PI3-киназу и Akt, усиливает передачу сигналов от EpoR. Кроме того, связывание Gas6 с его рецептором снижает секрецию макрофагами факторов ингибирования эритробластов в эритроидной нише. Следовательно, Gas6 заслуживает особого внимания и дальнейшего изучения в аспекте потенциального терапевтического применения для пациентов с эритропоэтин-резистентными анемиями (Angelillo-Scherrer, 2008).

Хроническое воспаление в организме может ингибировать эритропоэз. Это ингибирование сложное и многофакторное не только потому, что оно индуцируется множеством цитокинов и хемокинов, но также потому, что каждый из этих белков сам по себе может иметь более одного эффекта на развитие эритробластов. TNF $\alpha$  вызывает задержку созревания эритробластов на ранних стадиях и способствует их апоптозу. Этот эффект опосредуется рецептором TNFRSF1A (он же p55) и активацией каспаз. TNF $\alpha$  также активирует p38 MAPK в эритробластах, который фосфорилирует ацетилированный GATA-1, способствуя его деградации (Bibikova, 2014). Более того, TNF $\alpha$  активирует PU.1 и GATA-2 в стволовых клетках крови, которые противодействуют дифференцировке

эритроидных клеток (Manso, 2020). В тканях  $TNF\alpha$  стимулирует макрофаги к секреции металлопротеиназ, некоторые из которых обладают способностью ремоделировать внеклеточный матрикс. Такой эффект, происходящий в эритроидных нишах, будет нарушать адгезивные прикрепления матрикса и эритробласта. У пациентов с миелодиспластическим синдромом макрофаги костного мозга секретируют большое количество  $TNF\alpha$ .  $IFN-\gamma$  побуждает макрофаги и эритробласты секретировать растворимый TRAIL, который ингибирует дифференцировку эритробластов, путем активации внутриклеточного пути ERK/MAPK (Zamai, 2000).

IL-6 регулирует экспрессию гепсидина, который ингибирует экспорт железа из макрофагов, тем самым блокируя доступность железа для эритропоэза (Nemeth, 2006). Другая петля отрицательной обратной связи, регулирующая эритропоэз, включает в себя менее известный растворимый фактор, секретируемый макрофагами костного мозга, названный RCAS1 (рецептор-связывающий раковый антиген, экспрессируемый в клетках SiSo). Связывание RCAS1 с его рецептором, экспрессируемым на незрелых эритробластах, активирует проапоптотические каспазы 8 и 3 (Matsushima, 2001).

Хроническое воспаление подавляет дифференцировку эритробластов на поздних стадиях, что приводит к задержке созревания эритробластов на ранней стадии, которая опосредуется различными цитокинами. Одним из важнейших медиаторов воспаления является  $IFN\gamma$ , который сильно ингибирует эритропоэз, что приводит к анемии. Эритроидные клетки, стимулированные  $IFN\gamma$ , имеют повышенные уровни проапоптотических каспаз, индуцирующих остановку дифференцировки и запускающих апоптоз. Более того,  $IFN\gamma$  усиливает экспрессию Fas на эритробластах, повышая их склонность к апоптозу *in vivo*. Кроме того,  $IFN\gamma$  индуцирует экспрессию ключевого регулятора миелоидной дифференцировки PU.1 в эритробластах. Во время физиологического эритропоэза экспрессия PU.1 подавляется из-за ингибирующих эффектов на функции GATA-1 и дифференцировку эритроидных клеток. Таким образом, хроническая продукция  $IFN\gamma$  приводит к снижению эритропоэза в костном мозге, но увеличению

миелопоэза. Более того,  $IFN\gamma$  сокращает продолжительность жизни эритроцитов и увеличивает фагоцитоз эритроцитов макрофагами, усугубляя анемию и стимулируя экспансию эритробластов (Libregts, 2011). Имеются сообщения о том, что незрелые эритроидные клетки модулируют функциональную активность макрофагов, в частности, индуцируют и подавляют продукцию ими NO через  $IFN\gamma$   $TGF\beta$  (Тарабан, 1997).

Интерлейкины активируют рецепторы цитокинов, которые привлекают янус-киназы (Jak1, 2, 3, Тук) для фосфорилирования тирозинов в их внутриклеточном хвосте, которые впоследствии могут привлекать сигнальные молекулы. IL-3 и IL-6 способствуют выживанию гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (БОЕ-Э и КОЕ-Э). Причем IL-3 может стимулировать БОЕ-Э к делению даже в отсутствие эритропоэтина. IL-9 взаимодействует с IL-3, усиливая как эритропоэз, так и мегакариопоэз (Goswami, 2011). Однако, IL-4 супрессирует IL-3-зависимое эритроидное колониобразование клетками нормального костного мозга. Но в то же время в присутствии IL-3 и эритропоэтина IL-4 стимулирует эритроидное колониобразование. IL-4 поддерживает рост эритроидных колоний в синергизме с Epo, GM-CSF, SCF (de Wolf, 1990, Sonoda, 1997).

$TGF\beta$  описан как регулятор кроветворения с двойственным эффектом в зависимости от стадии клеточной дифференцировки. ВFU-E реагируют на  $TGF\beta$  остановкой пролиферации с увеличением фазы G1 и дифференцировкой от ранних ВFU-E к поздним ВFU-E и CFU-E. Аналогичным образом,  $TGF\beta$  снижает митотическую активность и заставляет дифференцироваться CFU-E до более зрелых стадий, работая синергично с эритропоэтином (Bataller, 2019). Однако, есть данные о том, что  $TGF\beta$  вызывает задержку созревания эритробластов на ранних стадиях за счет неканонической активации p38, которая, в свою очередь, запускает деградацию GATA-1 (Wang, 2016).  $TGF\beta$  поддерживает покой стволовых клеток, в частности, через ап-регуляцию мРНК и белка p57, после чего происходит остановка клеточного цикла в фазе G1. Снижение же базальной экспрессии p57 позволяет гемопоэтическим клеткам быстрее пролиферировать в отсутствие  $TGF\beta$  (Scandura, 2004). В других работах показано также, что  $TGF\beta$  закрывает продвижение клетки

по клеточному циклу, блокирование же TGF $\beta$  запускает клеточный цикл высокопролиферативных недифференцированных стволовых/прогениторных клеток (Batard, 2000), обработка антисмысловыми олигонуклеотидами к мРНК TGF $\beta$  приводило к увеличению колониеобразования ГСК, в частности, эритроидных и гранулоцитарно-моноцитарных колоний (Hatzfeld, 1991).

Другой механизм, посредством которого TGF $\beta$  нарушает эритропоэз, включает IL-33, член суперсемейства цитокинов IL-1. TGF $\beta$ , секретируемый опухолью, индуцирует экспрессию IL-33 в опухолевом микроокружении. Действительно, повышенная концентрация IL-33 выявлена у пациентов с различными типами рака, такими как немелкоклеточный рак лёгкого, плоскоклеточный рак полости рта, рак молочной железы, колоректальный рак, рак желудка, злокачественные опухоли органов головы и шеи, и часто коррелирует с плохим прогнозом. Примечательно, что IL-33 ингибирует дифференцировку эритробластов на ранних стадиях за счет активации NF $\kappa$ B и ингибирования сигнальных путей EpoR и др. (Fournié, 2018).

SCF взаимодействует с другими цитокинами для поддержания жизнеспособности стволовых гемопоэтических клеток и их способности к пролиферации / дифференцировке. SCF продуцируется стромальными клетками в костном мозге как секретируемый растворимый фактор, но также как фактор, связанный с мембраной. SCF особенно важен при кровопотере для усиления пролиферации и задержки дифференцировки эритроидных и мегакариоцитарных предшественников. SCF не является взаимозаменяемым между мышью и человеком: SCF мыши активирует и мышинные, и человеческие клетки, а человеческий SCF только человеческие клетки (Muta, 1995).

Эритроидные предшественники человека (проэритробласты, ранние базофильные эритробласты) экспрессируют Igf1R, а не InsR, который появляется по мере дифференцировки (von Lindern, 1999). Передача сигналов InsR особенно важна для транспорта переносчиков глюкозы Glut4 на клеточную мембрану. Оксифильные эритробласты и зрелые эритроциты зависят от гликолиза, поэтому экспрессируют высокие уровни транспортёров глюкозы (Montel-Hagen, 2009).

Эффект тиреоидных гормонов, в частности, трийодтиронина, по-видимому, сильно зависит от биологического вида и стадии развития. ТЗ оказывает сильное стимулирующее действие на эритропоэз птиц, но эритробласты мыши чувствительны к трийодтиронину только во время неонатального эритропоэза селезенки (Angelin-Duclos, 2005). В культурах эритроидных клеток человека ТЗ усиливает синхронную дифференцировку в энуклеированные ретикулоциты (Leberbauer, 2005).

Также было описано, что полимерный иммуноглобулин А, вырабатываемый в костном мозге, может связываться с трансферриновым рецептором 1, чтобы увеличивать чувствительность эритроидных клеток к эритропоэтину. В соответствии с этой ролью регулятора эритропоэза, синтез полимерного IgA увеличивается во время гипоксии. При патологических состояниях у пациентов с дефицитом IgA наблюдаются более высокие уровни эритропоэтина, и, наоборот, недавно были зарегистрированы пациенты с необъяснимой полицитемией, связанной с избытком синтеза полимерного IgA (Coulon, 2011).

Ху с коллегами идентифицировали две программы регуляции транскрипции в эритроидных клетках. Один из путей был сосредоточен на регионе GATA1, MYC и MYB, задействованных в обеспечении нормальной дифференцировки эритробластов, тогда как другой, GATA2, FOS и JUN нужен для инструктирования иммуномодулирующей активности. GATA2 часто занимает те же сайты хроматина, что и JUN и FOS, гетеродимерные компоненты AP-1, который является основным регулятором генов воспалительного ответа (Ху, 2022). Это предоставляет базу для последующих исследований регуляции активности генов и последующих изменениях в функционале эритробластов.

### ***1.5 Эритропоэз и его регуляция в условиях гемопоз-активирующих воздействий***

У взрослых людей за физиологический эритропоэз отвечает почти исключительно костный мозг. Однако, у мыши около 10% эритроцитов вырабатываются в селезенке. Стрессовое воздействие (кровопотеря, травма,

гипоксия, радиоактивное облучение или чрезмерное повреждение эритроцитов вследствие гемолиза и т.д.) включает в организме механизмы активации дополнительных очагов т.н. экстрамедуллярного эритропоэза, у мыши, в частности, в селезенке. У людей экстрамедуллярный эритропоэз наблюдается у пациентов, страдающих гематологическими заболеваниями, включая наследственный сфероцитоз,  $\beta$ -талассемию, лимфому Ходжкина, миелофиброз, а также остеопетроз (Grzywa, 2021). Процесс экстрамедуллярного эритропоэза регулируется множеством факторов, включая *Vmp4* и путь *Hedgehog*. Более того, экстрамедуллярный эритропоэз требует участия других типов клеток, включая НК-клетки, которые защищают экстрамедуллярные ниши и способствуют экстрамедуллярному гемопоэзу. Стрессовые эритроидные клетки происходят из стволовых клеток крови, которые мигрируют в селезенку и широко пролиферируют там, но не дифференцируются, пока уровень сывороточного эритропоэтина не повысится. Более того, стрессовый эритропоэз зависит от пула резидентных эритроидных предшественников в селезенке. Экстрамедуллярный эритропоэз в селезенке может стать основным источником эритроцитов, особенно когда концентрация *Epo* остается высокой. Селезенка - сложный орган, который отвечает за фильтрацию стареющих эритроцитов, разрушение патогенов и индукцию адаптивного иммунного ответа, а также регуляцию обмена эритроцитов. Важно отметить, что экстрамедуллярный эритропоэз нарушает привычную цитоархитектонику селезенки, что приводит к потере четких границ между *pulpa alba* и *pulpa rubra*, что может повлиять на инициацию иммунного ответа (Grzywa, 2021). Селезёночный гемопоэз, вызванный стрессовым воздействием (в т.ч. социальным стрессом, особенно хроническим), опосредован, по всей видимости,  $\beta$ -адренорецепторами нейроэндокринной сети гипоталамус-гипофиз-надпочечники и симпатической нервной системы. Например, блокада бензодиазепинами реакции на социальный стресс полностью предотвращала как индуцированный стрессом миелопоэз, так и спленомегалию (Weber, 2018). При социальном стрессе у мышей в селезенке обнаруживаются ГМ-КОЕ и ГЭММ-КОЕ, то есть пролиферация стволовых гемопоэтических клеток идёт в сторону миелоидного и моноцитарного

ростка. Отчасти, миелоидная пролиферация позволяет нивелировать развивающуюся после стресса анемию за счёт дифференцировки клеток-предшественниц в эритроидном направлении (McKim, 2018).

Введение фенилгидразина мышам вызывает гемолитическую анемию и усиленный экстрамедуллярный эритропоэз, отмечаемый, в частности, по усиленному включению изотопа  $^{59}\text{Fe}$  в клетки селезенки (Козлов, 1982), а также в селезенке мышей обнаруживаются БОЕ-Э (Alamo, 2017). Однако, известно, что введение фенилгидразина ведет к резкому угнетению синтеза антител, в частности, при иммунизации мышей эритроцитами барана на следующий день после инъекции фенилгидразина содержание антителообразующих клеток в селезенке уменьшилось в 17 раз по сравнению с контролем. Это снижение гуморального иммунного ответа продолжалось до 21 дня после введения фенилгидразина (Журавкин, 1979). Это явление регуляции гуморального иммунного ответа клетками эритроидного ряда было засвидетельствовано как открытие (свидетельство на открытие №385 14.06.1990). Также при введении фенилгидразина в костном мозге и селезенке происходит снижение содержания В-клеток и пре-В-клеток (Burrows, 1978). Фенилгидразин индуцирует экспрессию гена *Vmp4* в селезенке через 12 часов, а пик экспрессии наблюдается через 24 часа. Показано, что гипоксия индуцирует экспрессию *Vmp4* в стромальных клетках селезенки и предполагаемый сайт связывания HIF находится на 3'-конце гена *Vmp4* (Perry, 2007). Клетки эритроидные предшественники  $\text{CD71}^+ \text{GlyA}^+$  наблюдались в периферической крови пациентов с серповидноклеточной анемией и пациентов с  $\beta$ -талассемией (Perry, 2007, Görgülügil, 2024).

Инкубация эмбрионов *Danio rerio* с 36 по 54 часа после оплодотворения (hours post fertilization – hpf - далее по тексту) в 24-луночных планшетах с 1 мкг/мл фенилгидразина с последующей четырехкратной отмывкой приводила к истощению зрелых эритроцитов, что было отчетливо видно на конфокальной микроскопии. Более того, в области каудальной гемопоэтической ткани накапливались группы эритроцитов неправильной морфологии, которые, вероятно, представляли собой умирающие клетки, подвергшиеся воздействию

фенилгидразина, поскольку покадровая съемка показала, что они фагоцитировались крупными клетками, морфологически напоминающими макрофаги (Lenard, 2016).

Интересно, что вместе с истощением зрелых циркулирующих эритроцитов, присутствие GATA1<sup>+</sup> предшественников увеличилось в каудальной гемопоэтической ткани на 3–4 дни после оплодотворения. Таким образом, можно предположить, что эритроидные предшественники из каудальной гемопоэтической ткани, по-видимому, ответственны за регенерацию эритроидного ростка после гемолитической анемии, вызванной фенилгидразином у *Danio rerio*. Эксперименты с покадровой съемкой показали, что GATA1<sup>+</sup> клетки делились и трансформировались в глобин-содержащие клетки. Гибридизации *in situ* показала выраженное повышение экспрессии *cmyb/runx* в каудальной гемопоэтической ткани, что говорит об экспансии гемопоэтических стволовых и ранних прогениторных клеток в ответ на гемолитическую анемию. Двойная гибридизация *in situ* с GATA1 и cMyb показала, что некоторые из cMyb<sup>+</sup> клеток также были GATA1<sup>+</sup>, что говорит об их трансформации в эритроидные прогениторные клетки при индукции анемии (Lenard, 2016).

Установлено, что у мышей, подвергнутых воздействию острой гипоксии до и после иммунизации ЭБ, наблюдается повышение пролиферативной активности клеток эритроидного ростка в селезёнке и при этом происходит задержка развития гуморального иммунного ответа (Меерсон, 1981). Продемонстрировано, что иммуносупрессия в течение 7 дней после острой гипоксии ведёт к снижению содержания АОК в селезёнке и протекает на фоне усиленной миграции стволовых кроветворных клеток из костного мозга и угнетения миграции В-клеток. Спленциты мышей, подвергшихся острой гипоксии, отбирали на 3 и 7 дни после гипоксического воздействия и переносили сингенным мышам в индуктивную или в продуктивную фазу иммунного ответа (предварительно мышей иммунизировали ЭБ, перенос спленцитов в индуктивную фазу иммунного ответа – через 24 часа после иммунизации ЭБ, в продуктивную – через 72 часа после иммунизации ЭБ). При этом наблюдали снижение количества АОК к ЭБ в селезёнке мышей-

реципиентов более чем в 2 раза в каждом исследованном случае, как при переносе в индуктивной фазе иммунного ответа, так и при переносе в продуктивной фазе. Введение актиномицина Д (блокатор синтеза РНК) постгипоксичным мышам-донорам спленоцитов полностью отменяло иммуносупрессивный эффект в индуктивной фазе иммунного ответа, и лишь частично – в продуктивной фазе (Чеглякова, 1984). Перенос как Fc+, так и Fc- спленоцитов (то есть прилипающих и неприлипающих к пластику/стеклу клеток) от постгипоксичных мышей иммунизированным эритроцитами барана мышам-реципиентам показал значимую иммуносупрессию гуморального иммунного ответа у реципиентов, однако, группы Fc+, так и Fc- спленоцитов не отличались между собой по уровню вызываемой иммуносупрессии (Чеглякова, 1984). Аналогичный эффект супрессии гуморального ответа можно было наблюдать при переносе мышам-реципиентам сингенных клеток фетальной печени, а также клеток селезенки неонаталов 1-3 суточного возраста (оба этих органа богаты незрелыми эритроидными клетками). Лишь при переносе сингенных клеток селезенки неонаталов 6-9 суточного возраста иммуносупрессивное действие на мышей-реципиентов отсутствовало, что, видимо, связано с обеднением селезенки мышат эритроидными клетками к этому возрасту (Чеглякова, 1984).

Эритроидная природа супрессорного воздействия была показана следующим образом: обработка переносимых спленоцитов поликлональной анти-эритробластической сывороткой отменяла их иммуносупрессорное действие на реципиентов (Цырлова, 1991).

Гипоксия, созданная *in vitro* культивированием БОЕ-Э клеток селезенки в течение 5 суток в атмосфере 2% O<sub>2</sub> в присутствии различных факторов (SCF, Epo, Vmp4 и их разных комбинаций), приводит к усиленному разрастанию колоний БОЕ-Э в метилцеллюлозной среде по сравнению с теми же колониями в присутствии тех же факторов и их комбинаций, но росших в атмосфере 20% O<sub>2</sub>. Добавление Noggin, антагониста Vmp4, к культурам, выращиваемым в среде, содержащей только Epo при 2% O<sub>2</sub> подавляет способность гипоксии увеличивать количество БОЕ-Э. Более того, действие SCF увеличивало размер колоний БОЕ-Э,

но не влияло на их количество, тогда как в условиях 2% O<sub>2</sub> *in vitro* гипоксии SCF был способен увеличивать и количество колоний, и их размер. SCF увеличивает чувствительность гипоксических колоний БОЕ-Э к Epo, что может играть роль на ранней или, возможно, поздней стадии ответа, когда уровни эритропоэтина в крови не так высоки (Perry, 2007).

Селезёночным БОЕ-Э для пролиферации требуется только эритропоэтин, а БОЕ-Э костного мозга для пролиферации требуется эритропоэтин и некий второй фактор. Синтетические глюкокортикоиды, такие как дексаметазон, способствуют пролиферации эритроидных предшественников в печени плода *in vitro*. Рецептор глюкокортикоидов GR взаимодействует с HIF1 $\alpha$ , управляя пролиферацией незрелых эритроидных предшественников. Эти факторы поддерживают экспрессию генов, которые ингибируют дифференцировку и замедляют индукцию программы дифференцировки эритробластов. В ответ на фенилгидразин-индуцированную анемию популяция стрессовых БОЕ-Э увеличивается в селезенке, в то время как продукция БОЕ-Э в костном мозге снижается. Это общая черта экспериментальных анемий, вызванных различными процедурами, начиная от инъекции фенилгидразина, заканчивая моделями стерильного воспаления (Paulson, 2020).

Активация глюкокортикоидного рецептора GR необходима для стрессового эритропоэза и подавления дифференцировки *in vitro*. Интересно, что глюкокортикоиды активируют в основном одни и те же гены ингибирования роста в эритробластах и в лимфоцитах, но ингибированию роста противодействует активация EpoR / Kit, поэтому глюкокортикоиды способствуют селективной пролиферации эритроидных предшественников, поддерживая пролиферацию эритроидных клеток и подавляя пролиферацию других миелоидных и лимфоидных клеток-предшественников (Kolbus, 2003).

Также немаловажно отметить, что при ревматоидном артрите – аутоиммунном заболевании, при котором происходит поражение соединительной ткани суставов, зачастую имеет место анемия, причем разного рода: микроцитарная, мегалобластная, гипохромная (Kojima, 2012, Ватутин, 2013).

Также у пациентов с ревматоидным артритом и сопутствующей анемией в крови увеличено содержание эритроидных клеток-предшественников, а применение эритропоэтина улучшает клиническую картину и приводит к норме показатели крови (Сизиков, 2005, Сизиков, 2006). Некоторые исследователи связывают анемию при ревматоидном артрите с усиленным апоптозом эритроидных предшественников в костном мозге, который можно нивелировать анти-TNF терапией (Papadaki, 2002)

### ***1.6 Иммунорегуляция эритроидными клетками***

На сегодняшний день считается, что эритробласты (как и все ядродержащие клетки) способны к продукции и секреции иммуноактивных белков – цитокинов. Посредством цитокинов эритроидные клетки могут оказывать регуляторное влияние на стволовые гемопоэтические клетки, на бластные клетки различных ростков и на, собственно, эритроидные клетки, то есть вероятны аутокринные и паракринные эффекты. Блокада синтеза белка культуры эритробластов циклогексимидом 500 мкг/мл отменяет иммуносупрессивное действие эритроидных клеток на гуморальный иммунный ответ. Блокада синтеза ДНК митомицином С и блокада синтеза РНК актиномицином D в эритроидных клетках не влияли на их иммуносупрессорную активность (Сенников, 1988). Вероятнее всего, эритробласты опосредуют свои влияния через мембранотоксический эффект и через продукцию растворимых факторов – цитокинов. Спектр продуцируемых цитокинов разнообразен, а их многофакторное влияние на гемопоэз до сих пор остаётся недостаточно изученным. В нормальных физиологических условиях можно считать установленными следующие факты: эритробласты пуповинной крови человека на уровне мРНК экспрессируют гены IL-1 $\alpha$  и  $\beta$ , IL-2, 4, 6. Эритробласты взрослого человека продуцируют белки: IL-1 $\alpha$  и  $\beta$ , IL-2, 4, 6, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IFN $\gamma$ . Однако остаются спорные и неясные моменты относительно продукции IL-3, 5, 10, GM-CSF человеческими эритробластами. Неонатальные мышечные эритробласты экспрессируют на уровне мРНК IL-1 $\alpha$  и  $\beta$ . Эритробласты взрослых мышцей экспрессируют на уровне мРНК гены IL-1 $\alpha$  и  $\beta$ , IL-

4, 6 (Sennikov, 2004, Rincon, 2012, Karsten, 2018, Han, 2018, Chen, 2021). Синтез цитокинов эритроблестами также зависит от присутствия эритропоэтина (Инжелевская, 2001)

Показано, что CD71+ эритроидные клетки оказывают иммуносупрессивное влияние на новорожденных мышат, делая их неспособными бороться с инфекцией, вызванной *Bordetella pertussis* (возбудитель коклюша), путём ингибирования продукции цитокинов IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-12, снижением фагоцитарной активности нейтрофилов, макрофагов. Введение же анти-CD71 антител новорожденным мышам, заражённых *Bordetella pertussis*, облегчало течение болезни, отменяло супрессию иммунного ответа, уменьшало патологические изменения в лёгких, вызванные инфекцией (Dunsmore, 2017).

Эритроидные клетки CD71+ нарушают защиту неонатального организма от инфекции, однако это явление носит временный характер и зачем же оно нужно? Вероятнее всего обогащенность неонатального организма иммуносупрессивными клетками нужна для того, чтобы предотвратить чрезмерное воспаление, которое в противном случае может развиться при резком переходе от стерильных внутриутробных условий к колонизации комменсальными микроорганизмами во внешней среде (Elahi, 2013). Недавние исследования показали, что снижение иммунной реактивности у новорожденных - это скорее активная иммуносупрессия, необходимая для индукции иммунной толерантности к безвредным антигенам в сложной нестерильной среде, чем результат незрелости иммунных клеток (Grzywa, 2021).

Роль эритробластов в противовирусном иммунном ответе, особенно на новую коронавирусную инфекцию, вызываемую SARS-CoV-2 изучается. Есть сообщения о том, что при COVID-19 в костном мозге человека происходит экспансия незрелых эритроидных клеток, а также эритробласты обнаруживаются в периферической крови, причём это явление коррелирует с тяжестью течения инфекции. Эритробласты экспрессируют аргиназу 1, 2 и АФК, опосредуя иммуносупрессию. На эритроцитах присутствует белок ACE2, позволяющий коронавирусу проникнуть внутрь клетки, однако экспрессия ACE2 показана и на

эритроидных клетках и моноцитах, как в периферической крови пациентов с COVID-19, так и в костном мозге на эритроидных и моноцитарных предшественниках при COVID-19 (Shahbaz, 2021). Вероятно, в эритроцитах SARS-CoV-2 может ингибировать метаболизм гема и вызывать денатурацию гемоглобина (Cavezzi, 2020). Но экспрессию ACE2 на эритроидных клетках снижает дексаметазон 2 мкг/мл *in vitro*. Также при этом наблюдается снижение содержания вирусной РНК SARS-CoV-2. Дексаметазон усиливает созревание эритробластов до зрелых эритроцитов, что было показано на молодых здоровых мышах *in vivo* (Shahbaz, 2021).

Спленоциты новорожденных мышат подавляли пролиферативный ответ взрослых спленоцитов на митогены, однако, они не влияли на их цитотоксичность. Дальнейшие исследования показали, что неонатальные спленоциты снижают секрецию TNF $\alpha$  из гранулоцитов и макрофагов CD11b<sup>+</sup>, дендритных клеток CD11c<sup>+</sup> и лимфоцитов B220<sup>+</sup>. Более того, было показано, что неонатальные спленоциты подавляют активацию Т-клеток (Elahi, 2013, Grzywa, 2021). Совместное культивирование эритробластов из селезенки неонатальных мышат с наивными CD4<sup>+</sup> Th0-клетками вело к индукции в них FoxP3 и дифференцировке наивных Th0 в Treg клетки (Shahbaz, 2018).

Показано, что повышенные концентрации G-CSF (вызванные искусственным введением G-CSF или инфекцией *E.coli* или введением ЛПС) стимулируют пролиферацию гранулоцитарного ростка, но также и снижают эритропоэз в костном мозге, снижают экспрессию GATA-1 (гена, который контролирует и запускает экспрессию нескольких эритропоэз-специфичных генов) в клетках костного мозга, причем обратимо и дозозависимо (Weiqiang, 2020). Вероятно, это связано с истощением макрофагов костного мозга (Jacobsen, 2014, de Kruijf, 2020). Но G-CSF способствует эритропоэзу селезенки у мышей, что можно увидеть по увеличению количеств колоний БОЕ-Э в селезенках мышей, которым вводили G-CSF. Спленэктомия и последующее введение G-CSF значительно снизило содержание эритроцитов в крови, концентрацию гемоглобина, гематокрита и количество ретикулоцитов у мышей, по сравнению с ложнооперированными

мышами, указывая на то, что эритропоэз в селезенке необходим для поддержания гомеостаза эритроцитов у мышей, получавших G-CSF. Обработка анти-G-CSF антителами снижала концентрацию G-CSF в сыворотке у мышей, получавших ЛПС, восстанавливая эритропоэз в костном мозге, блокировала экстренный гранулопоэз в костном мозге и снижала содержание нейтрофилов в крови. Мыши TLR4 -/- показали низкие сывороточные уровни G-CSF, нарушение экстренного гранулопоэза в костном мозге и резко сниженное количество нейтрофилов в крови после введения ЛПС. В совокупности это показывает, что TLR4-опосредованная продукция G-CSF играет важную роль в селезеночном эритропоэзе, вызванном воспалением. Однако, G-CSF регулируется эритропоэтином, т. к. показано, что введение анти-Epo антител ингибирует G-CSF-индуцированный эритропоэз в селезенке. Поскольку эритропоэтин вырабатывается почками, то у мышей можно смоделировать повреждение почек, например, диетой с 0,3% содержанием аденина. Это вызывает непрерывное прогрессирующее повреждение почек с повышением уровня мочевины и креатинина в сыворотке. Гистология почек выявляет атрофию канальцев, эрозию проксимальных канальцев с уплощением эпителия и очаговую гипертрофию канальцевого эпителия. Как и ожидалось, хроническое повреждение почек, вызванное аденином, привело к снижению уровней эритропоэтина в сыворотке и ингибировало эритропоэз селезенки у мышей, получавших G-CSF. Это доказывает, что почечный эритропоэтин играет ключевую роль в эритропоэзе, индуцированном G-CSF (Weiqiang, 2020).

In vitro выращенные из стволовых клеток-предшественников эритробласты отличаются по ряду свойств от нативных эритробластов, в частности, по поверхностным фенотипическим маркерам, по транскриптому, спектру продуцируемых белковых медиаторов и супрессивным свойствам. CD71+ эритробласты, выращенные in vitro из CD34+ стволовых клеток-предшественников, отличаются наличием более многочисленной популяции CD45+ эритробластов, чем нативные CD71+ эритробласты, среди которых популяция CD45+ является минорной. По транскриптому для выращенных in vitro CD71+ эритробластов характерно преобладание экспрессии генов *B2m*, *Cd44*, *Hla-*

*A, Il8*, которые участвуют в процессах активации лимфоцитов, клеточной адгезии, хемокиновом сигналинге, NLR-сигналинге, интерфероновом сигналинге. Для нативных костномозговых CD71<sup>+</sup> эритроидных клеток характерно преобладание экспрессии генов *Ilf3, Tall, Cd36*, которые участвуют в регуляции транскрипции и окислительного стресса. По продукции белковых медиаторов было показано, что нативные CD71<sup>+</sup> эритробласты секретируют значительно больше IL-1 $\beta$ , IL-13, CCL5, IL-12 (p40), IL-1 $\alpha$ , IL-10, IL-17, IP-10, PDGF-B и SDF-1 $\alpha$ , тогда как выращенные CD71<sup>+</sup> эритробласты секретируют больше IL-3, IL-5 и SCF. В тесте смешанной культуры лимфоцитов кондиционная среда от нативных CD71<sup>+</sup> эритробластов не повлияла на пролиферативную активность мононуклеарных клеток крови при стимуляции аллоантигеном. При добавлении кондиционной среды от выращенных CD71<sup>+</sup> эритробластов пролиферативная активность мононуклеарных клеток крови была подавленной в СКЛ. In vitro выращенные эритробласты по вышеописанным свойствам напоминают экстрамедуллярные эритробласты, возникающие, например, в большом количестве в эритропоэтических очагах в селезенке при развитии опухоли в организме (Shevchenko, 2023).

Дифференцирующиеся эритробласты человека также секретируют ангиогенные факторы, в частности, фактор роста эндотелия сосудов VEGF-A и фактор роста плаценты PlGF. Среда из культивируемых эритробластов индуцирует миграцию моноцитов и повышенную проницаемость эндотелиальных клеток, что можно ингибировать антителами к VEGF-A и PlGF. Эритробласты не имеют рецепторов для VEGF-A или PlGF, следовательно, эти секретируемые ангиогенные факторы могут иметь паракринные влияния, опосредуя перекрестное взаимодействие между макрофагами и развивающимися эритробластами, которые регулируют островковую структуру. Кроме того, влияя на целостность соединения эндотелиальных клеток, эти секретируемые белки могут способствовать перемещению ретикулоцитов в синусоидные капилляры костного мозга (Tordjman, 2001). Важно отметить, что VEGF-A стимулирует секрецию EPO клетками стромы селезенки мышей, экспрессирующих рецептор фактора роста тромбоцитов  $\beta$

PDGFR- $\beta$ . Повышенная концентрация VEGF-A в плазме приводит к увеличению количества ретикулоцитов в кровотоке и экспансии эритроидных предшественников на ранних стадиях в костном мозге и селезенке мыши (Greenwald, 2019).

Кроме влияния на иммунопоз, было установлено, что колониеобразующая активность стволовых кроветворных клеток костного мозга увеличивалась при их совместной трансплантации с эритроидными клетками, обработанными митомицином C, который блокирует синтез ДНК. Обработка эритроидных клеток поликлональной анти-эритробластической сывороткой полностью отменяет этот эффект (Сенников, 1988).

Также существуют свидетельства того, что не только цитокины эритробластов опосредуют иммунорегуляторные влияния. Например, было показано, что  $\beta$ -глобиновая цепь гемоглобина, выделенная из эритробластов, снижает пролиферативную активность клеток КОЕ селезенки. А у старых мышей и мышей с аутоиммунными заболеваниями  $\beta$ -глобиновая цепь нормализует кроветворения, причем эти эффекты опосредованы H1-гистаминовыми рецепторами (Орловская, 1997).

Показано присутствие эритробластов в периферическом кровотоке у пациентов с ювенильным идиопатическим артритом, сокультивирование этих эритробластов с моноцитами здоровых людей вело к уменьшению продукции провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 моноцитами (Kanemasa, 2021).

Истощение L-аргинина за счёт работы фермента аргиназы Arg1, расщепляющей L-аргинин в L-орнитин и мочевины, приводит к ингибированию пролиферации T-клеток и нарушению их эффекторных функций (Rodriguez, 2002, Rodriguez, 2007, Grzywa, 2020). Иммунорегуляция, опосредованная аргиназой, является характерной особенностью миелоидных клеток. Активность аргиназы также используется опухолевыми клетками в качестве механизма ускользания от иммунного надзора (Czystowska-Kuzmich, 2019). Ингибирование аргиназы или добавление L-аргинина отменяет иммуносупрессивные эффекты неонатальных эритробластов на провоспалительный ответ миелоидных клеток и опосредованное

эритробластами ингибирование фагоцитоза. Напротив, в этих исследованиях ингибирование миелопероксидазы, НАДФН-оксидазы, супероксидазы-дисмутазы или нейтрализации АФК N-ацетилцистеином не влияло на эритробласт-опосредованную иммуносупрессию. Точно так же ингибиторы индоламиндиоксигеназы и TGF $\beta$  или anti-IL10R антитела не смогли уменьшить снижение продукции TNF $\alpha$  миелоидными клетками, совместно культивированными с неонатальными эритроидными клетками, предполагая, что иммуномодулирующие свойства эритробластов новорожденных мышей зависят в основном от активности аргиназы. Дальнейшие исследования показали, что подавление иммунного ответа, опосредованное аргиназой, также является особенностью эритробластов плода и эритробластов беременных мышей, а также эритробластов взрослых мышей с колитом (Elahi, 2013, Delyea, 2018, Shim, 2021).

Эритробласты мыши на стадии CD71<sup>high</sup> TER119<sup>mid</sup> наиболее сильно ингибируют пролиферацию Т-клеток, а также выработку IFN $\gamma$  Т-клетками. Это ингибирование зависит как от аргиназы, так и от АФК, поскольку только комбинация ингибиторов аргиназы и ингибиторов АФК значительно уменьшает подавление активации Т-клеток и нивелирует подавление продукции IFN $\gamma$ . Последующая дифференцировка эритроидных клеток ведёт к полной утрате супрессивного действия на Т-клетки (Sosnowska, 2021). Причём это свойство эритробластов зависит от пола: у самок иммуносупрессивное действие эритроидных клеток на Т-клетки более выражено, чем у самцов (Mashhour, 2021).

Следует отметить наличие существенных различий в экспрессии аргиназы между эритробластами мыши и человека. Эритроидные клетки мыши экспрессируют митохондриальную аргиназу Arg2, но имеют низкую или неопределяемую экспрессию цитозольной аргиназы Arg1. Напротив, эритробласты человека ярко экспрессируют как Arg1, так и Arg2. Более того, у беременных мышей плацентарные эритробласты имеют более высокую экспрессию Arg2, чем селезеночные эритробласты. Экспрессия Arg2 выше в эритробластах при аллогенной беременности по сравнению с сингенной. Активность аргиназы (в плаценте в т.ч.) беременных женщин имеет решающее значение для снижения

иммунореактивности во время беременности и для поддержания фетоматеринской толерантности. Однако, факторы, регулирующие экспрессию аргиназы в эритроидных клетках, остаются неизвестными (Elahi, 2013, Delyea, 2018, Shim, 2021). Иммунный ответ регулируется не только наличием L-аргинина, но также L-триптофана, который метаболизируется IDO. Различные инфильтрирующие опухоль клетки экспрессируют IDO, что приводит к подавлению ответа Т-клеток. Эритроидные клетки человека экспрессируют IDO, и его экспрессия снижается по мере созревания. Однако остается неизвестным, вносит ли деградация L-триптофана индоламиндиоксигеназой вклад в иммунорегуляцию, опосредованную эритробластами (Kedia-Mehta, 2019, Sibon, 2019).

### ***1.7 Роль эритроидных клеток при беременности***

Беременность – это уникальное с точки зрения иммунологии состояние, сопровождаемое перестройками в иммунной системе материнского организма, в которых также задействованы и эритробласты. Показано, что эритробласты содержатся в плаценте и эндометрии матки, а также в пуповинной крови при беременности. Они оказывают локальное иммуносупрессивное влияние, которое необходимо для того, чтобы организм матери мог принять имплантирующийся эмбрион, не отторгал его, то есть для поддержания фетоматеринской толерантности. Показано, что спленомегалия, развивающаяся при беременности, связана с увеличением содержания эритробластов, несущих  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ -интегрины, в селезенке беременных мышей (Colonne, 2015). Показано, что истощение эритроидных клеток у беременных мышей привело к нарушению фетоматеринской толерантности и активации материнского противофетального иммунного ответа. Уменьшение количества эритробластов приводило к увеличению рекрутирования CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в плаценту, что сопровождалось увеличением продукции провоспалительных цитокинов, включая TNF $\alpha$  и IL-6. Более того, истощение эритроидных клеток у беременных мышей снижает концентрации противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-4, которые играют центральную роль в развитии толерантности плода и матери. Все эти эффекты наблюдались

только при аллогенной беременности и приводили к полной резорбции плода, подтверждая, что эритробласты играют решающую роль в развитии и поддержании фетоматеринской толерантности (Gomez-Lopez, 2016, Delyea, 2018).

Плацентарные эритробласты человека обладают значительными иммуномодулирующими свойствами и ингибируют пролиферацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток *in vitro* (Miller, 2018, Dunsmore, 2019). Было обнаружено, что эритроидные клетки пуповинной крови более эффективно подавляют воспалительную реакцию стимулированных клеток периферической крови взрослых, чем моноциты пуповинной крови, что позволяет предположить, что эритробласты плода могут подавлять материнский иммунный ответ, предотвратить воспаление и развитие нежелательного иммунного ответа против плода (Cui, 2016).

В сыворотке крови беременных женщин обнаружены повышенные концентрации TGFβ по сравнению с небеременными женщинами. Аналогичное явление наблюдали и у беременных мышей по сравнению с небеременными мышами (Fu, 2023). Повышенное присутствие TGFβ во время беременности способствует дифференцировке CD34<sup>+</sup> гемопоэтических стволовых клеток в эритробласты, не влияя на пролиферацию самих ГСК, что в итоге ведёт к усилению эритропоэза. Важно упомянуть, что в плаценте и пуповинной крови присутствуют ГСК (Serikov, 2008). Наблюдаемое увеличение содержания эритробластов во время беременности в первую очередь было связано с экстрамедуллярным гемопоэзом, происходящим в селезенке. Во время беременности у мышей было обнаружено, что строма селезенки оказывает значительное влияние на селезеночный эритропоэз посредством сигнализации TGFβ. Однако, селезеночные макрофаги способствуют экстрамедуллярному эритропоэзу TGFβ-независимым способом (Fu, 2023). Роль селезенки в экстрамедуллярном гемопоэзе во время беременности очень важна, спленэктомия снижает содержание эритробластов в периферической крови и децидуальной ткани беременных мышей (Fu, 2023).

Эритробласты недоношенных новорожденных имеют сниженную экспрессию гена TGFβ. Интересно, что у недоношенных младенцев повышено содержание эритробластов по сравнению с доношенными (Dulay, 2008). Вероятно,

изменения иммунорегуляторного потенциала эритроидных клеток могут способствовать усилению иммунореактивности против плода, что приводит к преждевременным родам.

Во время беременности легкая анемия физиологична, это вызвано увеличением объема плазмы, которое не может быть быстро компенсировано пропорциональным увеличением содержания эритроцитов. Повышенные концентрации эстрадиола и 27-гидроксихолестерина, действующие через рецептор эстрогена альфа ER $\alpha$ , способствуют делению стволовой гемопоэтической клетки и вместе с эритропоэтином способствуют эритропоэзу и увеличению содержания эритробластов в селезенке матери, а также увеличению общей массы селезенки матери (Norton, 2009, Oguro, 2017). Однако, есть сообщения о том, что эстрадиол, прогестерон и  $\beta$ ХГЧ не оказывают влияния на образование эритробластов из человеческих CD34+ ГСК (Fu, 2023). Эритробласты в селезенке беременных мышей имеют повышенную экспрессию EPO $R$  и сниженную экспрессию рецептора смерти Fas, что связано с их повышенной пролиферацией и снижением апоптоза (Norton, 2009).

Важную роль в поддержании так называемого состояния «иммунного молчания» в матке во время беременности играют децидуальные Treg клетки с фенотипом CD4+ CD25+ FoxP3+. Также эти клетки экспрессируют CTLA4 и PD-L1 и секретируют IL-10 и TGF- $\beta$ , посредством которых поддерживают местное иммуносупрессивное состояние: противовоспалительный и толерогенный фенотип M2-макрофагов и толерогенных дендритных клеток.IDO, продуцируемая толерогенными ДК, ухудшает выживаемость Th1-клеток, а гемоксигеназа-1, секретируемая Treg клетками, нацелена на внутриматочные ДК и поддерживает их незрелое состояние (Tsuda, 2019). Показана более низкая экспрессия мРНК FoxP3 в тканях эндометрия при бесплодии неясного генеза (Krop, 2020). В плаценте рядом с Т-клетками располагаются и Vreg клетки, для которых пока нет явного маркера, но характерна секреция IL-10 и IL-35, для последнего цитокина также описаны явные иммуносупрессивные эффекты. Vreg посредством IL-10 способствуют

индукции Treg клеток, а посредством IL-35 активно поддерживают пролиферацию Treg и подавляют дифференцировку Th17 клеток (Niedbala, 2007, Benner, 2020).

В одной из работ, показано, что мышинные эритроидные клетки плаценты в основном представлены CD45+ клетками, для которых присущи иммуносупрессивные свойства. Содержание эритробластов в плаценте снижается с течением срока беременности, а также имеются отличия при сравнении двух типов беременности – с иммунологическим конфликтом (аллогенная – хорошо моделирует беременность у *Homo sapiens*) и без иммунологического конфликта (сингенная). В аллогенной плаценте на среднем сроке беременности E12.5 эритробластов достоверно больше, чем в аллогенной плаценте позднего срока E19.5. При сравнении разных типов беременности на среднем сроке E12.5 обнаружено, что содержание эритробластов достоверно больше в аллогенной плаценте E12.5, чем в сингенной аналогичного срока. Найдено, что эритробласты плаценты секретируют множество цитокинов и хемокинов, наибольший уровень продукции отмечен для хемокинов CXCL1, CCL2, CCL3 и CCL4. Продукция цито- и хемокинов эритробластами также меняется с течением срока беременности и при сравнении двух типов беременности. В основном здесь можно наблюдать схожие тенденции: продукция цито- и хемокинов достоверно выше эритробластами плацент при аллогенной беременности на сроке E12.5 в сравнении с эритробластами плацент при сингенной беременности на сроке E12.5. При любом из рассмотренных типов беременности продукция цито- и хемокинов эритробластами плацент снижается от среднего срока E12.5 к позднему E19.5 (Nazarov, 2023). Известно, что хемокины обеспечивают хемотаксис многих типов клеток иммунной системы, а потому потенциально могут выступать в качестве «приманки», привлекающей иммунокомпетентные Т-клетки в плаценту. Можно предположить, что иммунные клетки, попав в «ловушку» эритроидных клеток плаценты, могут стать анергичными или толерогенными, что обеспечивает развитие и сохранение плода при беременности.

### ***1.8 Роль эритроидных клеток при злокачественных заболеваниях***

При опухолевом процессе в организме происходят иммунные перестройки. В частности, в сыворотке крови пациентов можно наблюдать повышенные концентрации G-CSF, IL-3, EPO, TGF- $\beta$ . Опухолевое микроокружение производит большие количества G-CSF, IL-3, TGF- $\beta$ , BMP-11 (GDF11), активина A (Grzywa, 2021). VEGF-A продуцируется злокачественными и стромальными клетками опухолевого микроокружения для индукции неоваскуляризации, ремоделирования сосудов и для модуляции противоопухолевого иммунного ответа. Концентрация VEGF-A существенно увеличена в плазме крови у пациентов с опухолями (Kut, 2007).

Рост опухоли в организме сопровождается нарастающей иммуносупрессией, при этом эритробласты являются активными участниками, создаваемой иммуносупрессии, а также эритробласты представлены в опухолевом микроокружении (Shevchenko, Nazarov, 2023). Эритроидные клетки при злокачественных заболеваниях производят активные формы кислорода, TGF- $\beta$ , IL-10 и экспрессируют PD-L1, что вызывает мощное подавление работы Т-клеток. Более того, эритробласты способствуют росту опухоли за счет секреции факторов роста, включая нейротрофический фактор артемин. Экспансия эритробластов при раке является следствием нарушения регуляции эритропоэза, что приводит к остановке дифференцировки на ранних стадиях (Grzywa, 2021). В моделях на мышах истощение эритроидных клеток антителом к CD71 подавляет рост опухоли. Аналогичным образом, CD45<sup>+</sup> CD71<sup>+</sup> TER119<sup>+</sup> эритроидные клетки-предшественники, которые накапливаются в селезёнке у больных раком, сильно подавляют пролиферацию Т-клеток и продукцию IFN $\gamma$ , что ведёт в конечном счёте к общему снижению иммунного ответа на различные патогены, в т.ч. и на опухолевые антигены. Перенос CD45<sup>+</sup> эритробластов мышам с опухолью ускорял рост опухоли, подтверждая подавление противоопухолевого ответа эритроидными клетками. Истощение эритробластов не только замедляет рост опухоли, но также приводит к восстановлению иммунного ответа до уровней, наблюдаемых у мышей без опухолей. Напротив, адаптивный перенос эритробластов снижает

пролиферацию Т-клеток, а также продукцию IFN $\gamma$  в ответ на инфекцию вирусом хронического лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) (Zhao, 2018).

Ex vivo эритроидные клетки ингибируют пролиферацию и дифференцировку CD4<sup>+</sup> Т-клеток, а также ингибируют пролиферацию и цитотоксичность CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Такие же эффекты наблюдались для эритробластов человека, выделенных из мононуклеаров периферической крови раковых пациентов. Важно отметить, что эритробласты, проникающие в микроокружение опухоли, подавляли секрецию IFN $\gamma$  и пролиферацию внутриопухолевых CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, выделенных из опухолей печени человека (Chen, 2021). Введение анти-Еро антител или антиCD71 антител оказывало умеренное противоопухолевое действие и замедляло прогрессирование опухоли (Sano, 2021). Тем не менее, существуют значительные различия в экспрессии иммуномодулирующих молекул, включая PD-L1, 2B4 (Sano, 2021) и др., между эритроидными клетками, выделенными из костного мозга, селезенки и опухолевого микроокружения. Это предполагает, что различия в свойствах эритробластов могут быть результатом стимуляции некоторыми факторами, предположительно цитокинами или компонентами опухолевого микроокружения, которые могут усиливать или уменьшать иммуносупрессивные свойства эритроидных клеток.

Было обнаружено, что эритробласты на ранней стадии, которые имеют CD45, сильно подавляют Т-клетки, в отличие от более зрелых CD45<sup>-</sup> эритроидных клеток, которые имеют очень низкие или вообще неопределяемые уровни иммунных медиаторов, включая IL-10, TGF $\beta$ , IL-4, PGE2 и АФК, не влияют на пролиферацию Т-клеток, активацию дендритных клеток и секрецию цитокинов, а также не индуцируют Treg, следовательно, CD45<sup>-</sup> эритроидные клетки не способствуют росту опухоли. Таким образом, можно сказать, что эритробласты обладают мощными, но временными иммуномодулирующими свойствами, которые исчезают во время дифференцировки эритробластов. Однако в костном мозге здоровых взрослых людей эритробласты ранней стадии очень редки по сравнению с эритробластами поздней стадии. Таким образом, регуляция иммунного ответа с помощью эритроидных клеток имеет наибольшее значение при заболеваниях со

значительным увеличением эритробластов с задержкой созревания на самых ранних стадиях дифференцировки (Justyniarska, 2021). Транскриптомный анализ выявил выраженную сверхэкспрессию нейротрофического фактора артемина в CD45- эритроидных клетках. Физиологическая роль артемина заключается в регуляции выживания, поддержания и дифференцировки нейронов. Артемин также обладает проонкогенной активностью и способствует выживанию, пролиферации, миграции и инвазии раковых клеток. В моделях на мышах он способствует росту опухоли и ускоряет прогрессирование заболевания. Артемин активирует семейство рецепторов нейротрофического фактора глиальных клеток GDNF альфа-3 (GFR $\alpha$ 3) и его корецептор RET на раковых клетках. Передача сигналов артемина внутри клетки способствует фосфорилированию киназы, регулируемой внеклеточными сигналами ERK, протеинкиназы В (АКТ) и каспазы-9, способствуя пролиферации и инвазии, одновременно предотвращая апоптоз в опухолевых клетках, даже вызванный терапией. Артемин-экспрессирующий CD45- эритробласты были обнаружены в селезенке пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой и протоковой аденокарциномой поджелудочной железы, что предполагает существование их роли в патогенезе этих заболеваний (Han, 2018).

Имеются сообщения, что CD45- эритробласты накапливаются в тканях опухоли при раке желудка, а также облегчают метастазирование в лимфоузлы через эпителиально-мезенхимальный переход, в участие белков S100A8/9 (Wen, 2023).

У мыши и человека иммуносупрессивный эффект оказывают миелоидные супрессорные клетки, опухоль-ассоциированные макрофаги, Treg-клетки и эритроидные клетки, но по своей силе иммуносупрессорного эффекта они отличаются. У мышей подавляющая способность CD45+ эритроидные клеток находится между Treg и миелоидными супрессорными клетками, но у человека CD45+ эритроидные клетки являются даже более мощными иммуносупрессорами, чем Treg и миелоидные супрессорные клетки (Chen, 2021).

У онкопациентов эритробласты секретируют IL-10, что приводит к подавлению Т-клеток. Это подавление пролиферации Т-клеток может быть восстановлено ингибиторами передачи сигналов IL-10, включая ингибиторы NF $\kappa$ B

и STAT3 (Chen, 2021). Более того, эритробласты пуповинной крови могут стимулировать моноциты секретировать IL-10, что является паракринным механизмом иммунорегуляции. Блокирование IL-10R восстанавливает продукцию воспалительных цитокинов миелоидными клетками в присутствии эритробластов. В моноцитах эритробласты также индуцируют секрецию IL-19, 20, 24; все эти цитокины принадлежат к суперсемейству IL-10 (Cui, 2016).

В ноябре 2024 года были опубликованы результаты клинического исследования II фазы, показавшие, что комбинированное применение ингибитора гистондеацетилазы – вальпроата – и ингибитора PD-L1 – авелумаба – безопасно и эффективно для лечения вирус-ассоциированных видов злокачественных опухолей. В данном клиническом испытании были обнаружены следующие закономерности, в частности, уровень поверхностной экспрессии галектина-9 на периферических моноцитах отрицательно коррелировал с эффективностью данного лечения, а повышенные уровни сывороточных IL-8 и IL-18, а также содержание CD71+ эритроидных клеток-предшественников в крови предсказывали плохие результаты лечения (Kolinsky, 2024).

В другом клиническом исследовании, опубликованном в 2023 году, также было замечено, что у пациентов с вирус-ассоциированными злокачественными опухолями содержание эритробластов в кровотоке было значительно выше на исходном уровне и на протяжении всего исследования у не ответивших на терапию по сравнению с пациентами, у которых наблюдали ответ на терапию анти-PD-L1 – авелумабом. Отмечена обратная корреляция: чем выше содержание эритробластов в кровотоке, тем ниже содержание гемоглобина, то есть тяжелее анемия у пациентов с вирус-ассоциированными злокачественными опухолями, причём у женщин эта корреляция выражена ярче, чем у мужчин. У мышей-носителей меланомы B16 отмечена экспансия эритробластов в селезенке, терапия анти-PD-L1 снижает экспансию эритробластов в селезенке и снижает рост опухоли, а совместное применение анти-PD-L1 и эритропоэтина нивелирует эффекты анти-PD-L1 терапии, способствуя экспансии эритробластов в селезенке мышей (Bozorgmehr, 2023). Также замечено, что CD45+ эритробласты разделялись

на две группы клеток по наличию поверхностного маркера VISTA<sup>+</sup> и VISTA<sup>-</sup>, причем CD45<sup>+</sup> VISTA<sup>+</sup> эритробласты продуцируют достоверно больше активных форм кислорода, чем CD45<sup>+</sup>VISTA<sup>-</sup> эритробласты. Учитывая роль VISTA в иммунном истощении и толерантности, возможно предположить, что эритробласты могут оказывать супрессивное влияние на Т-клетки через межклеточный контакт, это взаимодействие VISTA<sup>+</sup> эритробластов через межклеточные контакты с другими иммунными клетками нуждается в дальнейшем изучении (Bozorgmehr, 2023).

Помимо селезенки, печень является еще одной нишей экстрамедуллярного гемопоэза, которая поддерживает накопление эритробластов в тканях опухоли. Имеются сообщения о том, что содержание CD45<sup>+</sup> эритробластов в кровотоке у пациентов с гепатитом В и ассоциированной печеночной недостаточностью может быть коррелятом и прогностическим маркером течения заболевания (Zhang, 2025). Также очаги кроветворения обнаружены в плевре у пациентов с плоскоклеточным раком пищевода (Бао, 2018). Можно предположить, что эритробласты могут происходить из костного мозга или они могут быть напрямую сгенерированы опухолевым микроокружением. Есть данные, что опухолевое микроокружение может вызывать редифференцировку эритробластов, накапливающихся в опухоли, в миелоидные клетки-предшественники, в частности, под действием GM-CSF (Long, 2022). Популяция миелоидных клеток описана как тумор-ассоциированные клетки с ярко выраженными иммуносупрессивными свойствами, за что получила своё название, часто используемое в литературе, как миелоидные супрессоры. Однако, опухоль-ассоциированные миелоидные клетки представляют собой весьма гетерогенную популяцию, их можно разделить по крайней мере на два основных подтипа: мононуклеарные с иммунофенотипом CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>high</sup> и полиморфноядерные с иммунофенотипом CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>low</sup> (Bronte, 2016). Помимо отдельных поверхностных маркеров, мононуклеарные миелоидные клетки оказывают более сильную иммуносупрессию, чем полиморфноядерные миелоидные клетки (Youn, 2013). Новая идентифицированная популяция миелоидных клеток, дифференцированных из эритроидных, демонстрирует более

высокие уровни ингибиторных молекул, включая PD-L1, PD-L2, iNOS, Arg1 и CD49, по сравнению с Ter119–CD71–миелоидными клетками. Это отражает более сильную способность миелоидных клеток, дифференцированных из эритроидных, ингибировать пролиферацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток и продукцию ими IFN $\gamma$  (Long, 2022). Сформировавшиеся опухоли вызывают анемию и впоследствии инициируют экстрамедуллярный гемопоэз при этом происходит накопление CD45<sup>+</sup> эритробластов в селезенке и печени. Однако, экстрамедуллярный гемопоэз не восполняет пул эритроцитов, поскольку имеет место арест созревания эритробластов. Эти арестованные CD45<sup>+</sup> эритробласты могут дифференцироваться в миелоидные клетки. Это помогает объяснить следующие клинические явления: популяция миелоидных клеток, дифференцированных из эритроидных, увеличивается в численности у пациентов с продвинутыми стадиями рака; анемия и иммунодефицит часто ассоциируются с продвинутыми стадиями рака у человека; хотя рекомбинантный человеческий эритропоэтин rhEPO и эритропоэз-стимулирующие агенты способствуют росту и дифференциации эритроцитов и могут эффективно лечить анемию, они не продлевают выживаемость онкологических больных с анемией (Arcasoy, 2008; Hedley, 2011); анемия может предсказывать эффективность иммунотерапии (Long, 2022). Вышеописанное кратко иллюстрирует схема ниже:

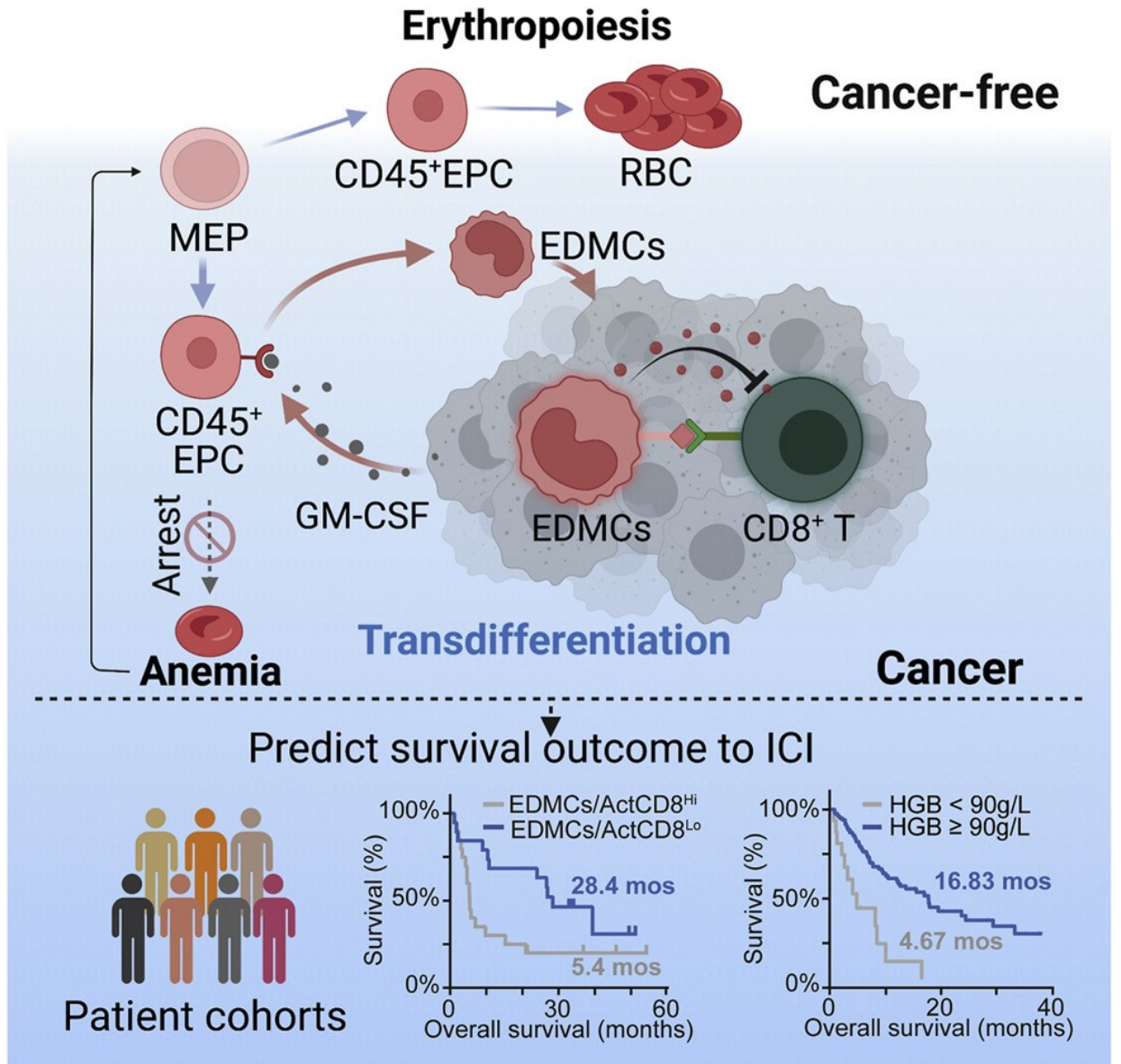


Рис. 1 Схематичное изображение нормального эритропоэза и эритропоэза в организме при развитии опухоли: миелоидные клетки, дифференцированные из эритроидных предшественников, вызванных опухолью, опосредуют иммуносупрессию, анемию и снижают эффективность иммунотерапии анти-PD-1/PD-L1. Рисунок предоставлен Long с соавторами (Long, 2022)

Имеются данные, согласно которым некоторое подмножество CD45<sup>+</sup> эритробластов происходит из CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитов. В условиях гипоксии клетки мышинной В-клеточной лимфомы способны преобразовываться в эритробластоподобные клетки с фенотипом CD45<sup>+</sup>TER119<sup>+</sup>, которые оказывают

иммуносупрессивное действие на CD8 Т-клетки. Кроме того, неопухолевые В-клетки обладают схожими способностями дифференциации и оказывают такое же иммуносупрессивное действие при анемии или опухолевых состояниях у мышей. Похожие В-клетки существуют у новорожденных мышей. Более того, CD19+CD235a+ двойные положительные клетки идентифицированы в периферической крови пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом. Вероятно, некоторые CD45+эритробласты дифференцируются из популяции CD19+ В-лимфоцитов в ответ на стрессы (Yang, 2023).

На сегодняшний день есть исследования, показывающие, что эритробласты способны представлять антигены (Fan, 2024). Исследователи из Китая провели серию экспериментов *in vitro et in vivo*, доказывающих, что селезеночные CD45+ эритробласты способны захватывать пептиды и представлять их Т-лимфоцитам, однако ответ Т-клеток в этом случае это анергия, а не активация. Показано, что CD45+ эритробласты поглощают растворимые белки, представляют антигенные эпитопы на своей поверхности и вызывают антиген-специфическую анергию CD8+ Т-клеток. В модели адоптивного переноса процентное содержание донорских CD45.1+CD8+ Т-клеток у мышей-реципиентов, которым ранее ввели CD45+ селезеночные эритробласты, нагруженные специфическими пептидами, было значительно снижено в сравнении с аналогичными мышами-реципиентами, которым вводили CD45+ селезеночные эритробласты, нагруженные неспецифическим - контрольным пептидом. CD45+ эритробласты, нагруженные специфическими пептидами, также ингибировали появление эффекторных функций у CD45.1+CD8+ Т-клеток, в частности, отмечено снижение внутриклеточной продукции IFN $\gamma$ . Причём, описанные эффекты являются МНС I рестриктивными. Существует несколько потенциальных объяснений снижения функции CD8+ Т-клеток, например, анергия, истощение или гибель клеток. Но для уточнения необходимы дальнейшие исследования в этом поле. Кроме того, показано, что CD45+ эритробласты напрямую присоединяют нитро-группы тирозинам в комплексе TCR/CD8 посредством продукции активных форм кислорода и пероксинитрита, не давая CD8+ Т-клеткам реагировать на

специфические пептидные антигены. Более того, обработка мочевого кислотой эффективно отменяла иммуносупрессивные эффекты CD45+ эритробластов во время адоптивного переноса CD8+Т-клеток, тем самым повышая активность лимфоидных клеток. Обработка мочевого кислотой также уменьшало долю миелоидных супрессорных клеток и макрофагов в опухолевых тканях, но не повлияло на долю Treg и тумор-ассоциированных фибробластов. Эти результаты продемонстрировали, что толерантность CD8+ Т-клеток у мышей с опухолями индуцируется CD45+ эритробластами (Fan, 2024). Есть и другие работы, показывающие способность эритробластов презентировать антиген и вызывать толерантность (Clements, 2024).

CD45+ эритробласты, вызванные ростом опухоли, накапливаются в селезенке, где становятся основной популяцией клеток. CD45+ эритробласты, полученные от пациентов с опухолями и мышей, имеющих большие опухоли, содержат много миелоидных генных сигнатур и поверхностных маркеров, характерных для миелоидных клеток (Zhao, 2018). Однако, в одной из работ секвенированием РНК единичных клеток было установлено, что среди общего пула эритробластов костного мозга здоровых доноров есть эритробласты, которые экспрессируют мРНК генов, характерных для клеток миелоидного ростка, в частности, для классических моноцитов - *Ifitm2*, *Bcl2a1*, *Cxcr4*, *Nampt*, *S100a12*, *Fth1*, *Btg1*, *Cd63*, *Cxcl8*, *HLA-A*, *Dusp1*, *Fcer1g*, *S100a9*, *Fosb*, *Gapdh*, *Fcn1*. Эти клетки назвали миелоид-подобные эритробласты, то есть эритробласты, схожие по транскриптому с миелоидными клетками. Также была обнаружена минорная популяция эритроидных клеток, экспрессирующих дефензин-1. Ещё обнаружил себя довольно большой кластер эритроидных клеток, экспрессирующих аргиназу-1, причём эти эритробласты были преимущественно оксифильными (Perik-Zavodskii, Shevchenko, 2024). Однако, сравнив данные транскриптома костномозговых эритробластов здоровых доноров и костномозговых эритробластов пациентов с острыми лимфобластными лейкозами, было установлено, что эритроидные клетки экспрессируют миелоидные сигнатурные гены даже без каких-либо трансдифференцирующих стимулов, таких как наличие

опухоли в организме (Perik-Zavodskii, 2024). Также было установлено, что растворимые продукты костномозговых эритробластов, как человека, так и мыши, угнетают рост кишечной палочки *E.coli* in vitro (Perik-Zavodskii, 2025).

Исходя из вышеизложенного, можно сказать, что эритроидные клетки регулируют процессы кроветворения, противоопухолевый, противомикробный и противовирусный иммунитет. Важный, но пока ещё нерешенный вопрос заключается в том, каким образом происходит опосредованная эритробластами регуляция иммунных процессов: клеточными механизмами, цитокинами, в частности, как меняется иммунорегуляторная активность эритробластов при гемопоэз-активирующих воздействиях. Более подробное рассмотрение этого вопроса с углублением в молекулярные и клеточные механизмы поможет понять регуляторные цепи процессов гемопоэза и иммуногенеза с участием эритроидных клеток с другими типами клеток и объяснить различия в физиологии эритроидных клеток в норме и при патологических явлениях.

## Глава 2 Материалы и методы

### *Лабораторные животные*

Для экспериментов использовали мышей ♂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).

### *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 гемопоэз-активирующим воздействиям, в стерильных условиях извлекали бедренные кости и селезёнку.

Для выделения красного костного мозга от бедренных костей срезали эпифизы и с помощью 2 мл шприца многократно промывали костную полость стерильным фосфатно-солевым буфером PBS (phosphate-buffered saline) для максимального сбора клеток костного мозга, вымывая клетки в центрифужную пробирку. Для выделения спленоцитов цельную селезёнку мыши многократно промывали PBS с помощью 2 мл шприца в чашке Петри, после собирали жидкость с клетками в центрифужную пробирку. Пробирки с растворами клеток центрифугировали 10 мин 1,5 тыс.об. в мин, сливали супернатант, заменяя его свежим PBS, а для удаления клеточных агрегатов и крупных кусочков лишних тканей пропускали клеточную суспензию через нейлоновые сеточки диаметром 40 мкм. Для удаления эритроцитов и гранулоцитов клеточные суспензии центрифугировали в градиента плотности фиколла-верографина  $\rho=1,119$  г/мл (фиколл: Панэко, Россия, урографин: Schering AG, Германия) в течение 30 мин на скорости 1,5 тыс.оборотов в мин, после разделения клеток на фракции, отбирая интерфазу, содержащую мононуклеарные клетки, то есть смесь лимфоцитов, моноцитов, бластных клеток различных генераций. Двумя последовательными отмывками в трехкратном объеме PBS и центрифугированием 10 мин 1,5 тыс.об. в мин собранную интерфазу мононуклеарных клеток 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 A) 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. Чистота выделенных сепарацией эритроидных клеток представлена на рисунке ниже.

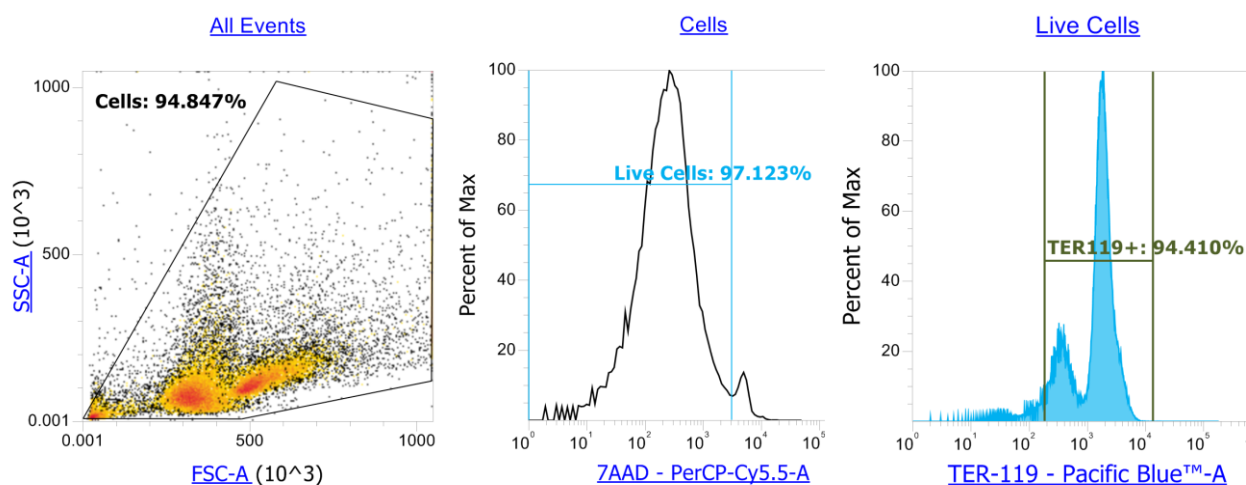


Рис. 2 Оценка чистоты выделенных эритробластов после магнитной сепарации с помощью проточной цитометрии

### ***Проточная цитометрия***

Клетки в количестве ~0,5 млн отмывали от среды в 1 мл PBS с 0,09% NaN<sub>3</sub>, центрифугировали 10 мин 1,5 тыс.об. в мин, сливали надосадок, заменяя его 200 мкл свежего PBS с 0,09% NaN<sub>3</sub>. Далее проводили окрашивание 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 0,5-1 мл PBS с NaN<sub>3</sub>, центрифугировали 10 мин 1,5 тыс.об. в мин, сливали надосажок, 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). Стратегия гейтирования представлена на рисунке ниже.

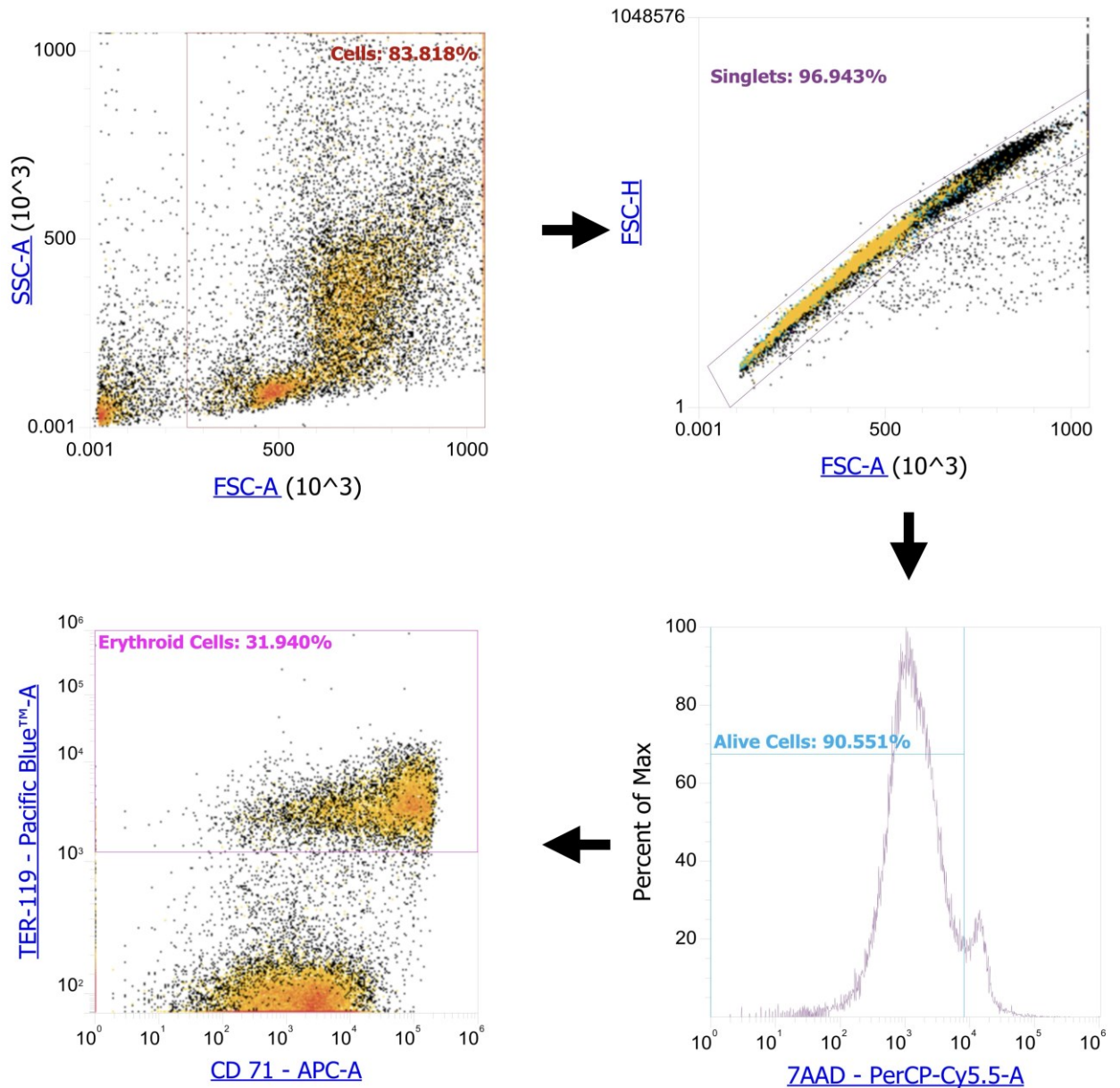


Рис. 3 Стратегия гейтирования эритробластов на проточной цитометрии

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, в течение 20 минут. После фиксации и отмывки от фиксатора клетки пермеабиллизировали в 1 мл/пробу пермеабиллизующего буфера, приготовленного путём разведения 10x Perm Buffer (BioLegend, США) в 10 раз дис.водой. Пермеабиллизацию проводили следующим образом: к клеточному осадку добавляли 1 мл 1x перм.буфера, интенсивно ресуспендировали, вортиксовали ~10". Затем клетки осаждали центрифугированием 10 мин 1,5 тыс.об. в мин, сливали надосажок, заменяя его ещё 1 мл 1x перм.буфера. Клеточный осадок интенсивно ресуспендировали, вортиксовали ~10" и снова осаждали центрифугированием 10 мин 1,5 тыс.об. в мин, сливали надосажок. 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. После второй отмывки клеточный осадок ресуспендировали в 200 мкл PBS с NaN<sub>3</sub> и проводили цитометрический анализ на проточном цитофлюориметре Attune NxT Flow Cytometer. Эритробласты идентифицировали как клетки, несущие маркер TER119, далее TER119<sup>+</sup> клетки разделяли на две ветви по наличию на них маркера CD45, таким образом рассматривали две популяции эритробластов: TER119<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> и TER119<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>, 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 культуры эритроидных клеток собирали интенсивным

ресуспендированием в пробирки, центрифугировали 10 мин 1,5 тыс.об. в мин, супернатанты отбирали в 1,5 мл пробирки-эппендорфы, маркировали и сохраняли в холодильнике при  $-80^{\circ}\text{C}$  для последующего анализа.

Анализ продукции цитокинов в кондиционных средах эритробластов проводили с использованием набора Bio-Plex Pro Mouse cytokine 23-plex assay (Bio-Rad Laboratories, США). Эта аналитическая платформа основана на технологии флуоресцентных шариков в сочетании с сэндвич-иммуноанализом, это позволяет проводить индивидуальный и мультиплексный анализ до 100 различных аналитов в одной лунке микропланшета. Для этого исследования была использована панель на 23 цитокина (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17A, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN $\gamma$ , KC (CXCL1), MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES (CCL5), TNF $\alpha$ ) в формате 96-луночного микропланшета в соответствии с инструкциями производителя. Содержимое каждой лунки анализировали с помощью Bio-Plex 100 System (Bio-Rad Laboratories, США) для количественного определения каждой конкретной реакции на основе цвета гранул и интенсивности флуоресцентного сигнала. 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). Для этого клетки в количестве 0,5 млн лизировали в лизирующем буфере, клеточный лизат прогоняли центрифугированием через первую колонку, которая удаляет геномную ДНК. Далее добавляли этиловый спирт (согласно инструкции производителя) и полученную смесь прогоняли центрифугированием через вторую колонку, которая задерживала РНК, а белки и прочие молекулы пропускала. Путем нескольких промывок РНК концентрировали на колонке и очищали, а в конце вымывали элюирующим буфером в пробирку, очищенную от РНКаз. Концентрацию и

чистоту полученной РНК оценивали прибором Nanodrop 2000. Готовую РНК маркировали и сохраняли в холодильнике при  $-80^{\circ}\text{C}$  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  $65^{\circ}\text{C}$ , 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.

***Функциональные тесты: 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 мононуклеарных клеток селезенки мыши в присутствии 50% по объему кондиционной среды эритробластов.

Мононуклеарные 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 глутамин (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 среды, 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. Для этого выделенные клетки из органа собирали в концентрации 10-50 млн клеток в 1 мл среды RPMI-1640, добавляли к ним 1 мкл 5мМ раствора CFSE (разведен заранее), интенсивно размешивали, инкубировали в инкубаторе 20 мин, затем клетки интенсивно отмывали 10 мл теплой среды RPMI-1640, осаждали центрифугированием 10 мин 1,5 тыс.об. в мин, сливали надосадок. Клеточный осадок размешивали в 1 мл полной среды RPMI-1640, суспензию оставляли на 5 мин постоять и далее использовали клетки.

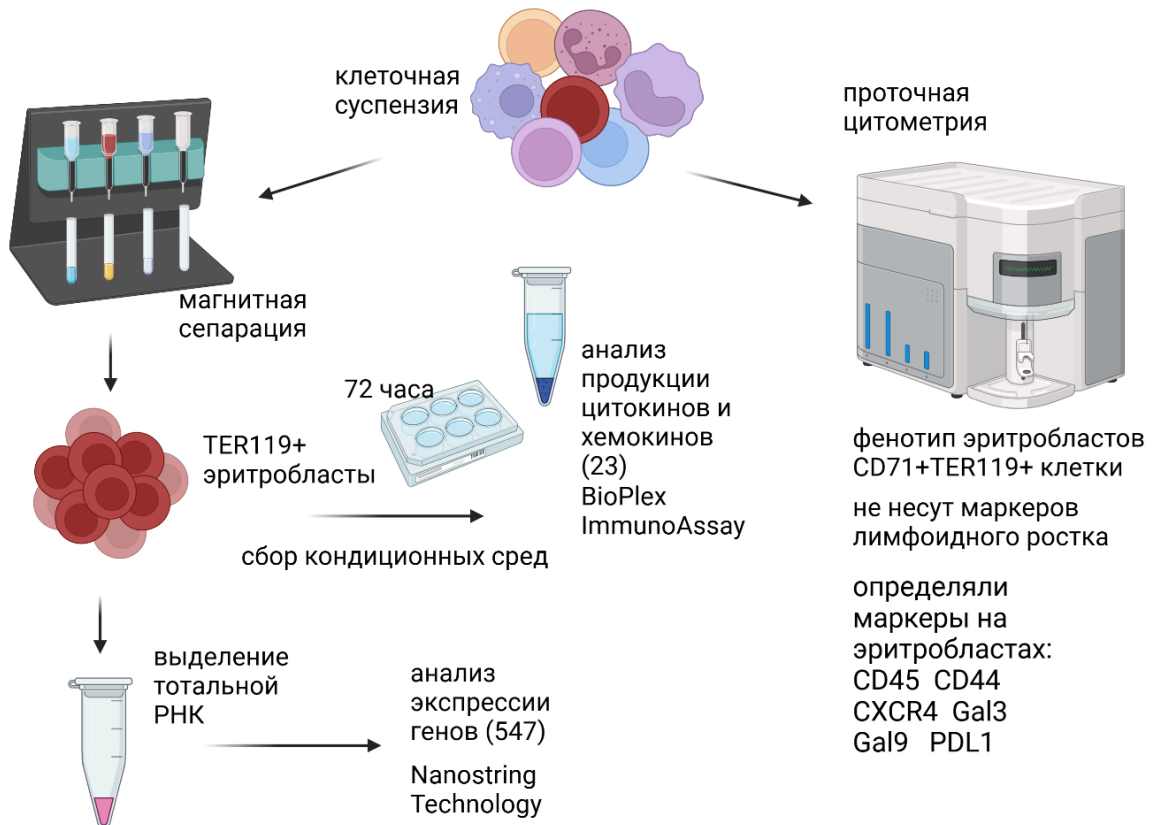
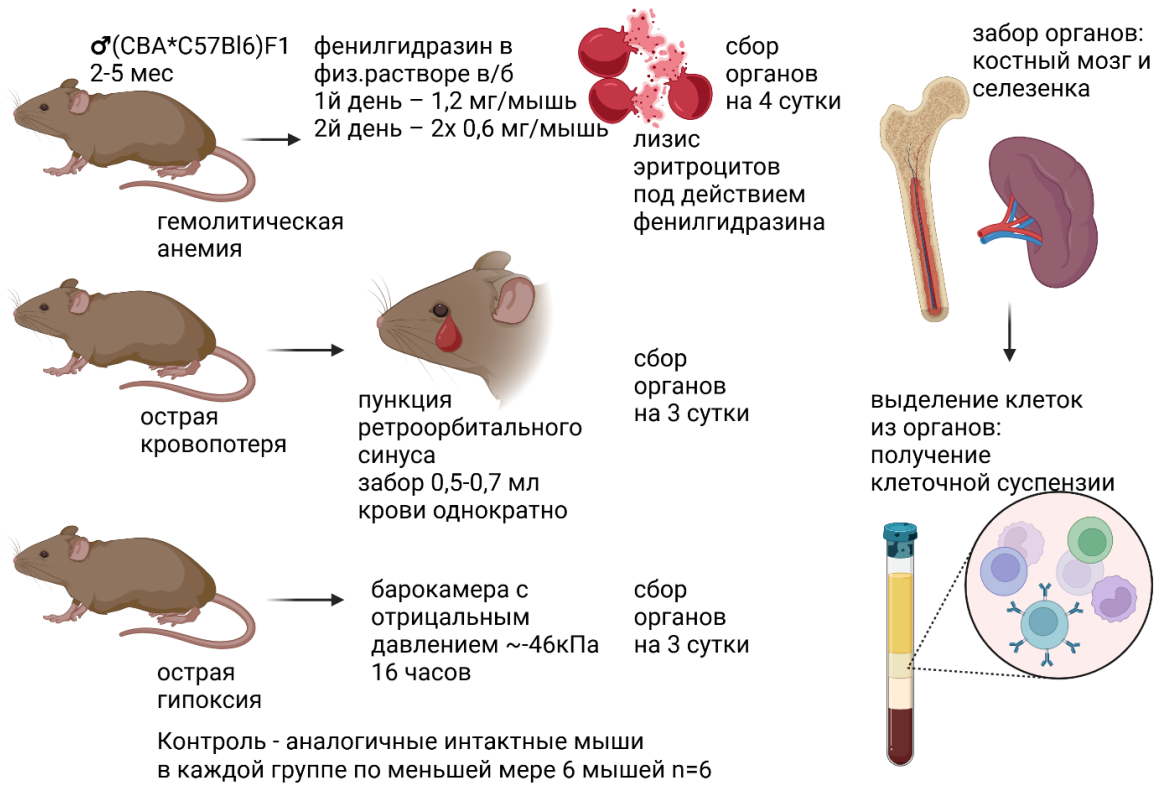
Культивирование клеток с кондиционными средами проходило в течение суток в 48-луночных планшетах во влажном инкубаторе при 37 градусах Цельсия и 5% содержании CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации клетки собирали интенсивным ресуспендированием из лунок планшетов в цитометрические пробирки, отмывали от среды в ~1 мл PBS с 0,09% NaN<sub>3</sub>, центрифугировали 10 мин 1,5 тыс.об. в мин, сливали надосадок, заменяя его 200 мкл свежего PBS с 0,09% NaN<sub>3</sub>. Далее 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). Инкубация с антителами составляла 30-40 мин, после этого клетки отмывали от несвязавшихся антител в 0,5-1 мл PBS с NaN<sub>3</sub>, центрифугировали 10 мин 1,5 тыс.об. в мин, сливали надосадок, заменяя его 200 мкл свежего PBS с NaN<sub>3</sub>. 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> НК-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 Q25-Q75 (Q1-Q3). Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . Массив численных данных, полученных на Bioplex анализаторе, представляли в виде  $\log_2$ -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  $\pm 2$  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  $\log_2$  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%).

Схемы экспериментов графически представлены на рисунках ниже.



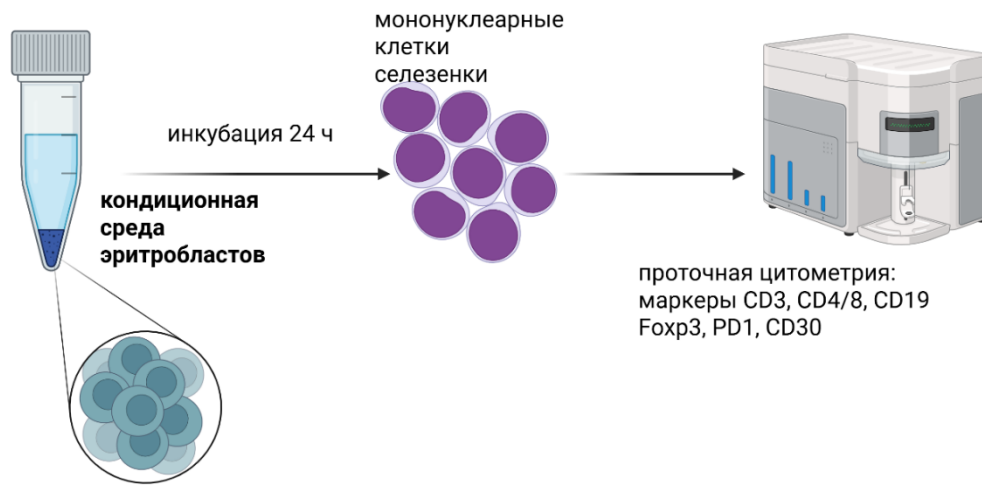


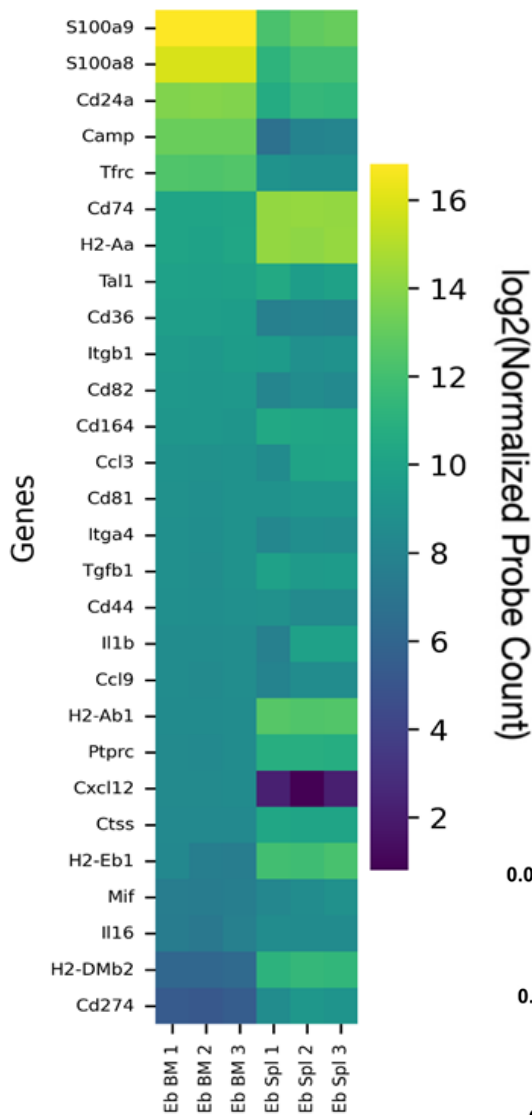
Рис. 4, 5, 6 Схемы экспериментов

## Глава 3 Результаты

### 3.1 Исследование транскриптома эритробластов

Прежде всего было решено исследовать транскрипция каких вообще генов идёт в эритробластах. В первую очередь нас интересовали гены иммуноактивных белков. 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 маркёром 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 неописанные 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.7

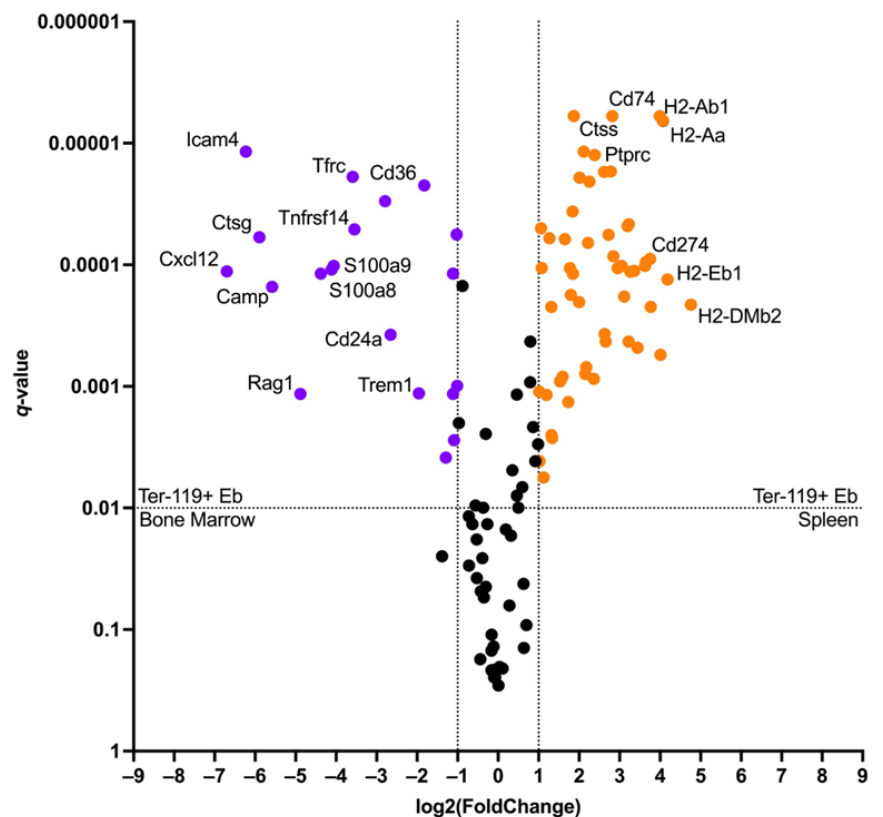


Рис. 7 Дифференциальная экспрессия генов в эритроблстах костного мозга и селезенки в норме. Слева - тепловая карта экспрессируемых генов (чем ближе к желтому цвету, тем выше экспрессия гена). Справа - Вулкано-плот статистически достоверно дифференциально экспрессируемых генов в эритроблстах костного мозга в норме в сравнении эритроблстами селезенки в

норме (фиолетовые точки слева – гены, которых достоверно экспрессируется больше в эритроблотах костного мозга, оранжевые точки справа – которые достоверно больше в селезенке),  $n=3$

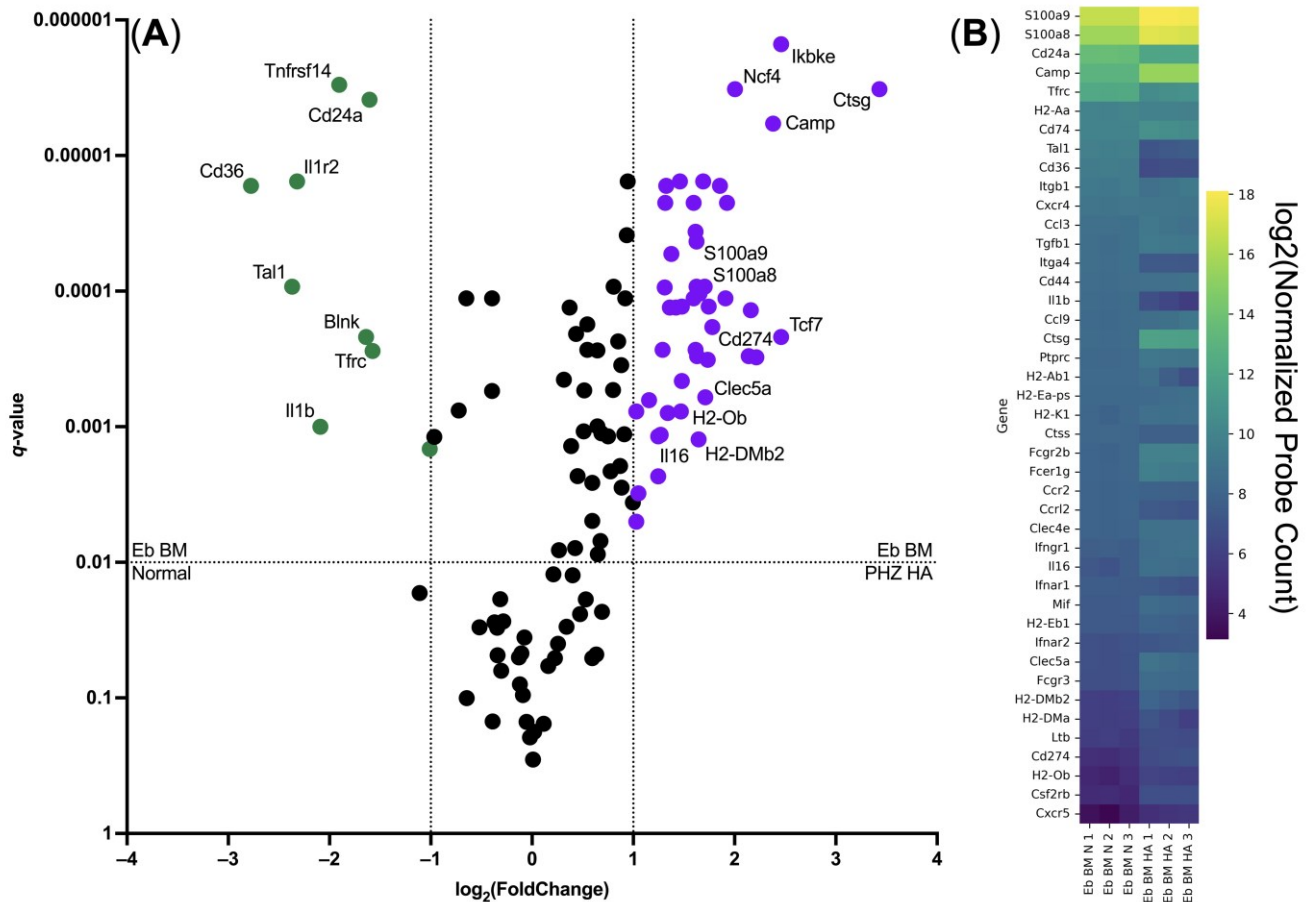


Рис. 8 Дифференциальная экспрессия генов в эритроблотах костного мозга при фенилгидразин-индуцированной гемолитической анемии (PHZ HA); А – вулканоплот статистически достоверно дифференциально экспрессируемых генов в эритроблотах костного мозга после гемолитической анемии в сравнении с нормой (зеленые точки слева – гены, которых достоверно экспрессируется больше в норме, сиреневые точки справа – которые достоверно больше при гемолитической анемии), В – тепловая карта экспрессируемых генов (чем ближе к желтому цвету, тем выше экспрессия гена),  $n=3$

При фенилгидразин-индуцированной гемолитической анемии были найдены достоверные различия в экспрессии генов эритроидными клетками костного мозга по сравнению с нормой (интактным контролем). Исследованные эритроидные клетки экспрессировали гены, характерные для красного роста *Tfrc*, *Tal1* и *Cd36*,

что показывает высокую чистоту сепарированных клеток. 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: *H2-Aa*, *H2-Ab1*, *H2-Ea-ps*, *H2-K1*, *H2-Eb1*, *H2-Dmb2*, *H2-Dma*, *H2-Ob*. 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*. См.рис.8

При острой кровопотере были найдены достоверные различия в экспрессии генов эритроидными клетками костного мозга (см.Рис.9). Исследованные эритроидные клетки экспрессировали гены, характерные для эритроидного ростка *Tfrc*, *Tall* и *Cd36* в большом количестве копий, что показывает высокую чистоту сепарированных клеток. Была обнаружена экспрессия генов цитокинов и хемокинов (в порядке убывания числа копий): *Ccl3*, *Tgfb1*, *Il1b*, *Cxcl12*, *Ccl2*, *Mif* и *Il16*, а также генов белков антимикробного ответа *S100a9*, *S100a8* и *Camp*. Обнаружены статистически и биологически значимые изменения в экспрессии генов. 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*, *Ctnnb1*, *Irgm1*, *H2-Aa*, *H2-Ab1*.



Рис. 9 Дифференциальная экспрессия генов в эритроблестах костного мозга при острой кровопотере. А – вулкано-плот статистически достоверно дифференциально экспрессируемых генов в эритроблестах костного мозга после острой кровопотери в сравнении с нормой (зеленые точки справа – гены, которых достоверно экспрессируется больше при кровопотере, сиреневые точки слева – которые достоверно меньше). В – тепловая карта экспрессируемых генов (чем ближе к желтому цвету, тем выше экспрессия гена),  $n=3$

Исследуя экспрессию генов в эритроблестах 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 эритроблестами мыши. См.Рис.10-11

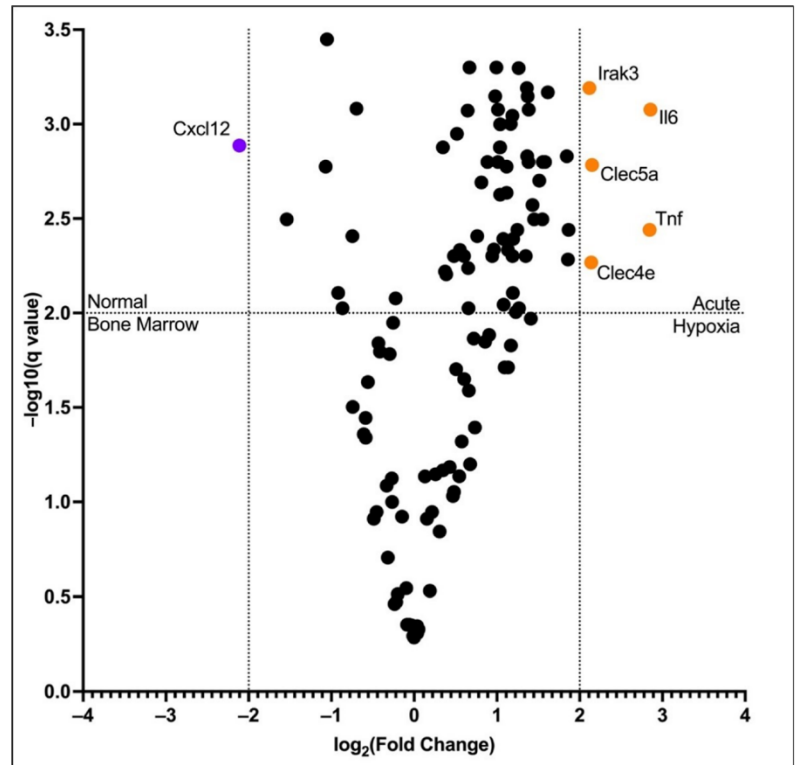
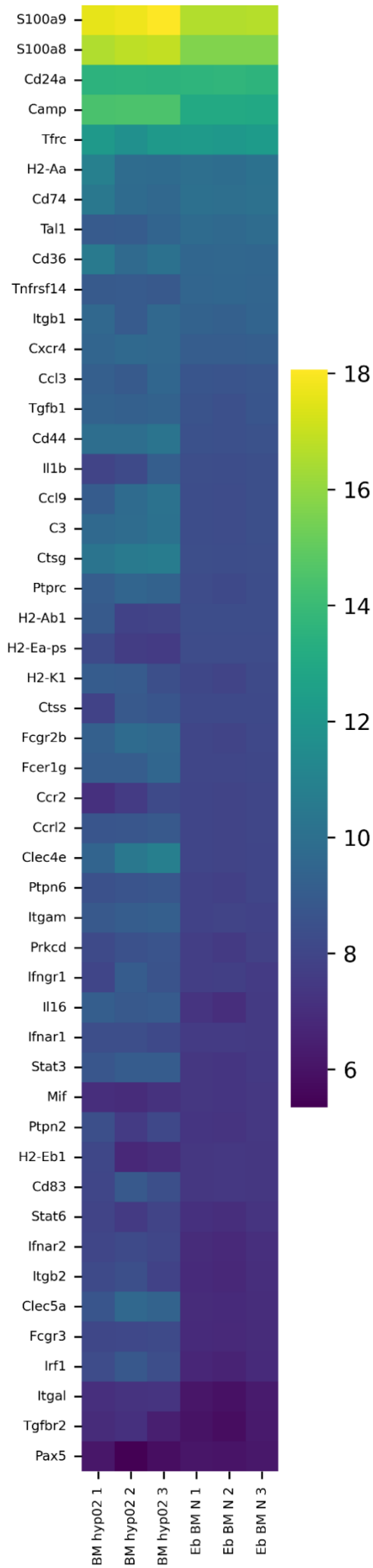


Рис. 10 Дифференциальная экспрессия генов в эритроблестах костного мозга при острой гипоксии: ↑ вулcano-плот статистически достоверно дифференциально экспрессируемых генов в эритроблестах костного мозга после острой гипоксии в сравнении с нормой (оранжевые точки справа – гены, которых достоверно экспрессируется больше при гипоксии, сиреневые точки слева – которые достоверно меньше)

Рис. 11 ← тепловая карта экспрессируемых генов в эритроблестах костного мозга при острой гипоксии (чем ближе к желтому цвету, тем выше экспрессия гена),  $n=3$

### ***3.2 Исследование секрета эритробластов***

Далее мы были нацелены установить какие иммуноактивные белки секретируют эритробласты. Для этого выделенные эритробласты всех экспериментальных групп культивировали в течение 72 часов, после этого была собрана кондиционная среда эритробластов и проанализирована на предмет содержания различных секретируемых иммуноактивных белков. Мультиплексный анализ кондиционной среды эритроидных клеток мыши, выделенных из различных органов при различных состояниях, показал, что эритробласты секретируют широкий ряд цитокинов и хемокинов.

Как можно увидеть на тепловой карте (рис.12) 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, IFN $\gamma$ , CXCL1, IL-10, G-CSF, IL-6.

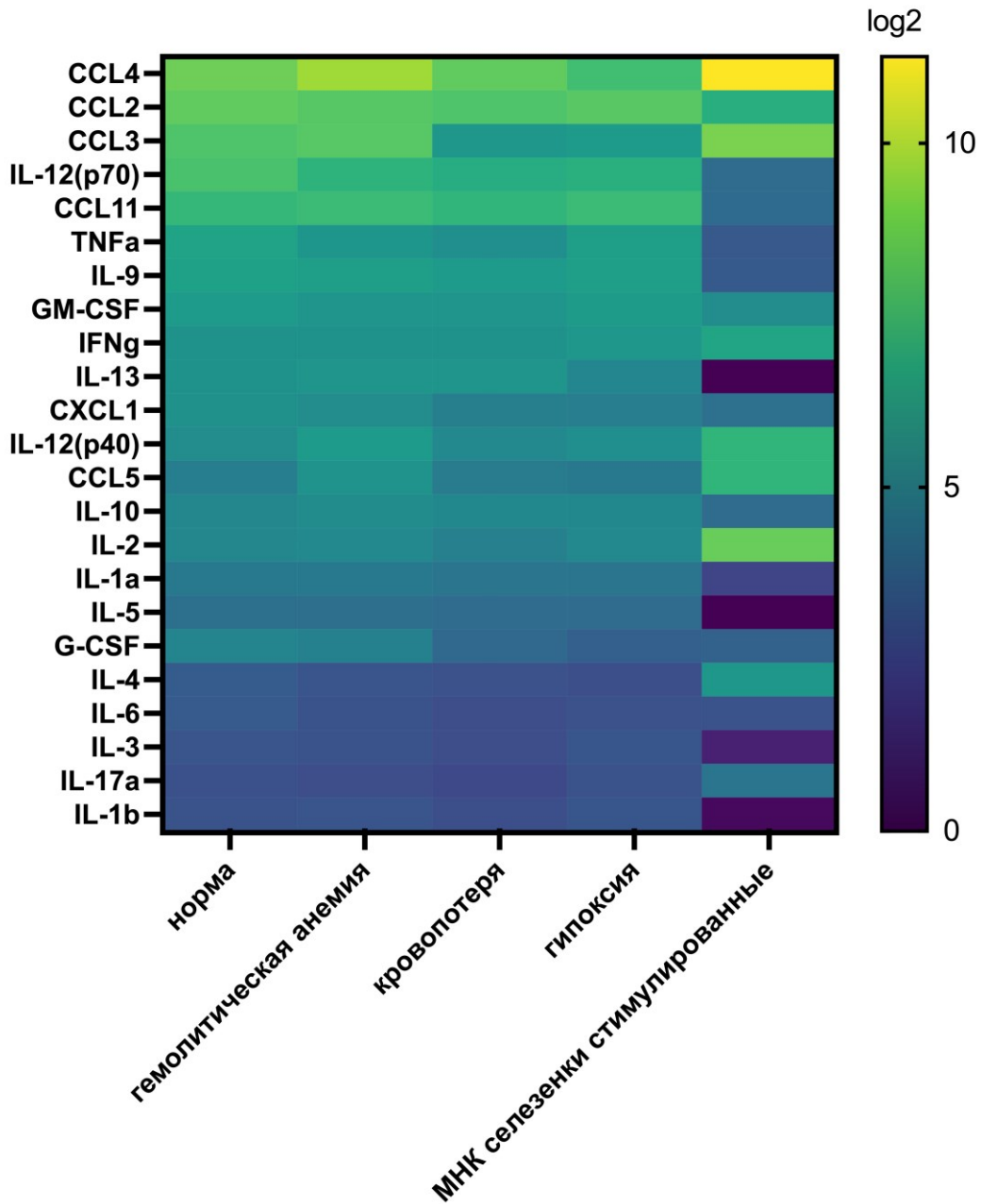


Рис. 12 Тепловая карта медианных значений содержания цитокинов и хемокинов в кондиционных средах эритробластов костного мозга мыши, представлены медианы  $\log_2$  трансформированных значений концентраций,  $n=6$

Наиболее заметными по уровню продукции были замечены хемокины CCL2, CCL3, CCL4, CCL11 и цитокин IL12p70.

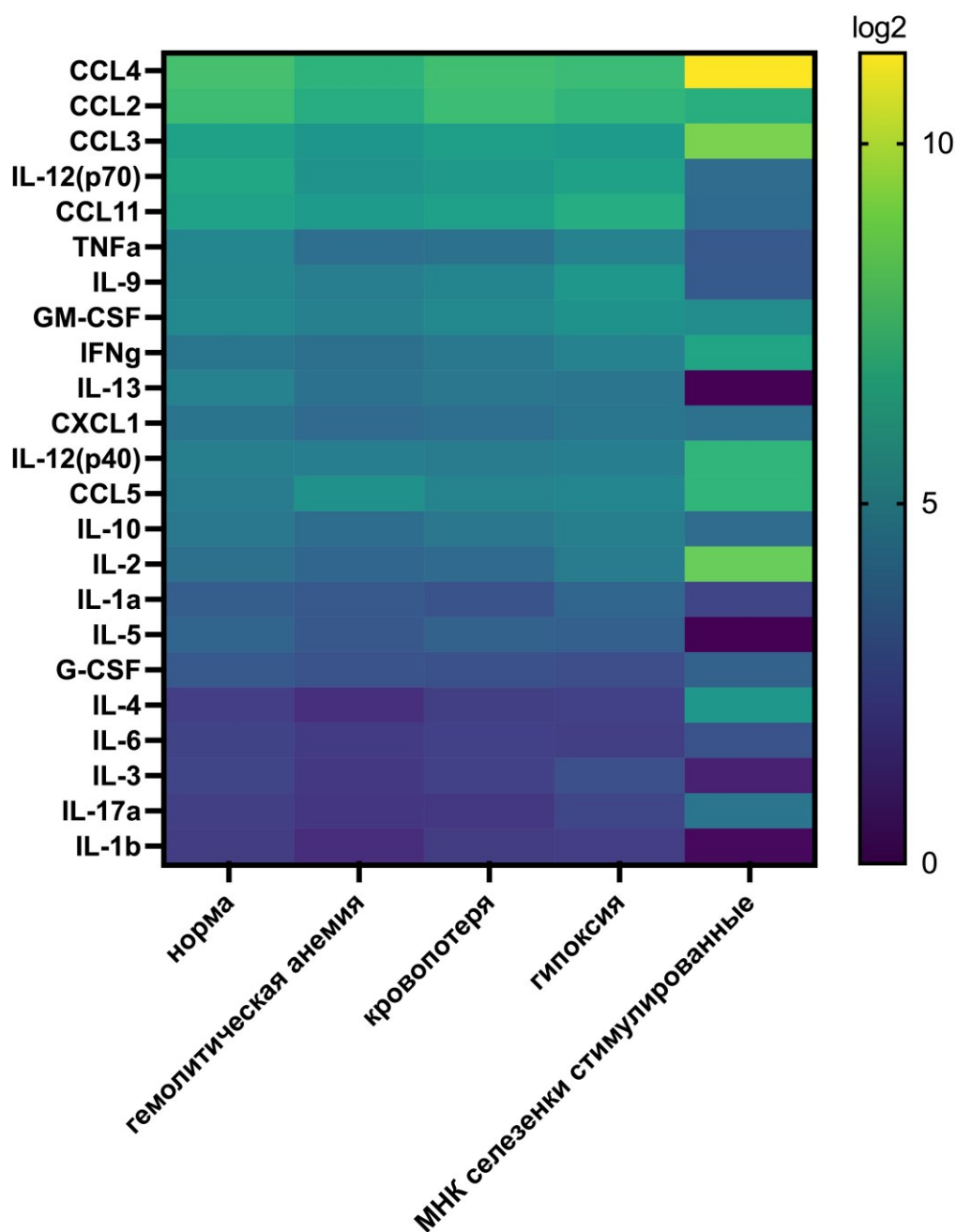


Рис. 13 Тепловая карта медианных значений содержания цитокинов и хемокинов в кондиционных средах эритробластов селезенки мыши, представлены медианы  $\log_2$  трансформированных значений концентраций,  $n=6$

Аналогичную картину можно увидеть на тепловой карте медианных значений содержания цитокинов в кондиционных средах эритробластов селезенки мыши. Здесь также видно, что эритробласты, выделенные из селезенки, продуцируют множество цито- и хемокинов, причём уровни продукции во многих

исследованных случаях сопоставимы с уровнями продукции моноклеарными клетками селезенки, стимулированных 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. Роль хемокинов описана в таких процессах как дифференцировка, миграция клеток, органогенез, толерантность, нейроиммунные взаимодействия (Ohl, 2003, Hu, 2015, Suzuki, 2016, Druzd, 2017). 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).

### ***3.3 Функциональные тесты: Влияние растворимых продуктов эритробластов на фенотип иммунокомпетентных клеток***

Далее, исходя из широкого профиля секретируемых эритробластами иммуноактивных белков, была проведена серия экспериментов, где культивировали моноклеарные клетки селезенки интактной мыши с добавлением кондиционных сред эритробластов. При этом опорой при проведении этих экспериментов были более ранние работы, где упоминалось, что эритробласты оказывают влияние на Т- и В-лимфоциты, в частности, на пролиферативную способность лимфоцитов, антителогенез и т.д (Чеглякова, 1984, Кашлакова, 1988, Самарин, 1996). Чтобы понять влияние эритробластов на моноклеарные клетки, в частности, посредством продуцируемых эритробластами растворимых продуктов, кондиционные среды эритробластов были добавлены к культурам моноклеарных клеток и через сутки инкубации исследован фенотип

мононуклеарных клеток (МНК) методом проточной цитометрии. Были найдены следующие отличия. При добавлении к мононуклеарным клеткам селезенки кондиционных сред эритробластов, полученных как от интактных мышей (норма), так и от мышей с различными гемопоз-активирующими воздействиями, наблюдается:

- ✓ Увеличение содержания CD3+ клеток среди МНК селезенки в культуре по сравнению с контролем (см.Рис.14)

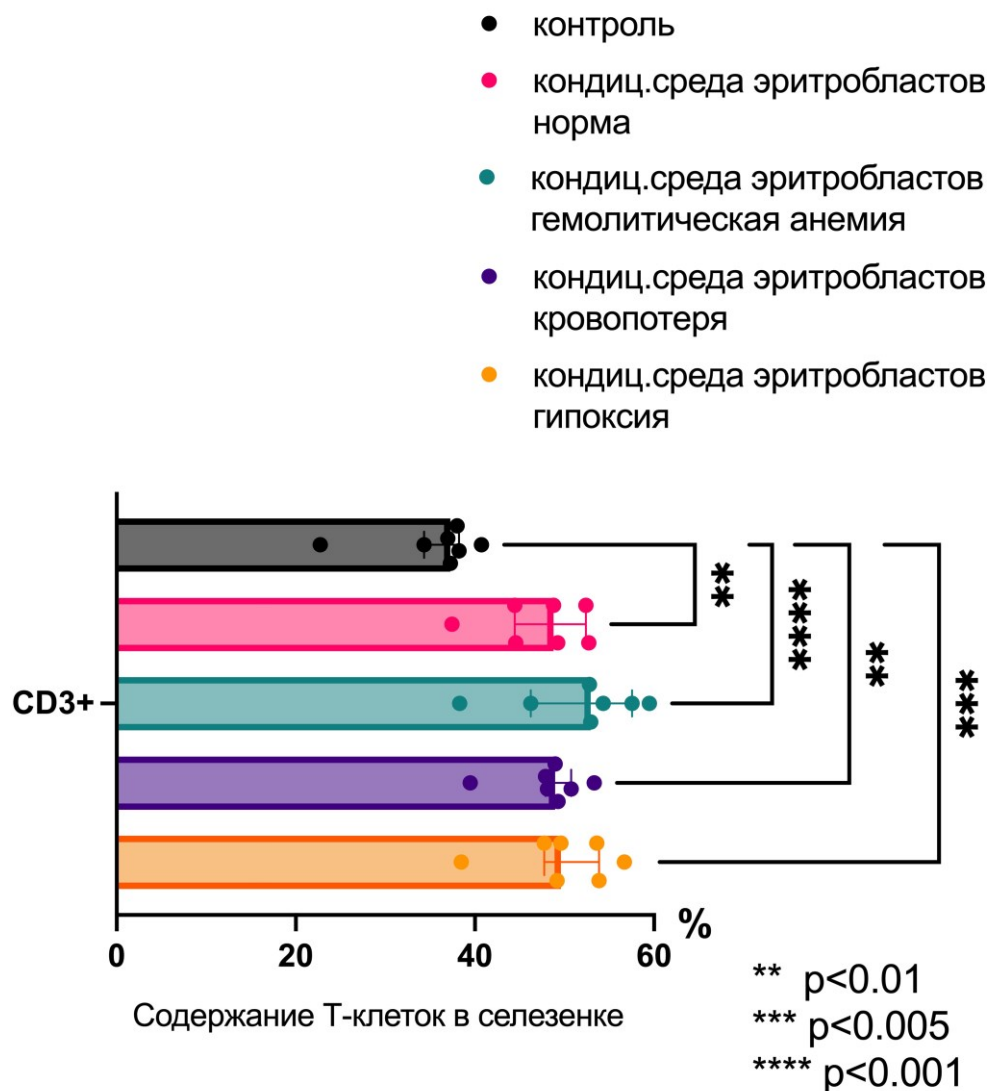


Рис. 14 Процентное содержание CD3+ клеток в культуре мононуклеарных клеток селезенки при обработке кондиционными средами эритробластов, Med, Q25-Q75, n=7

- ✓ Среди CD3<sup>+</sup> клеток увеличение доли Foxp3<sup>+</sup> клеток в культуре по сравнению с контролем, что подтверждает также окрашивание витальным красителем CFSE, позволяющим оценить пролиферацию клеток (см.Рис.15а, 15б)

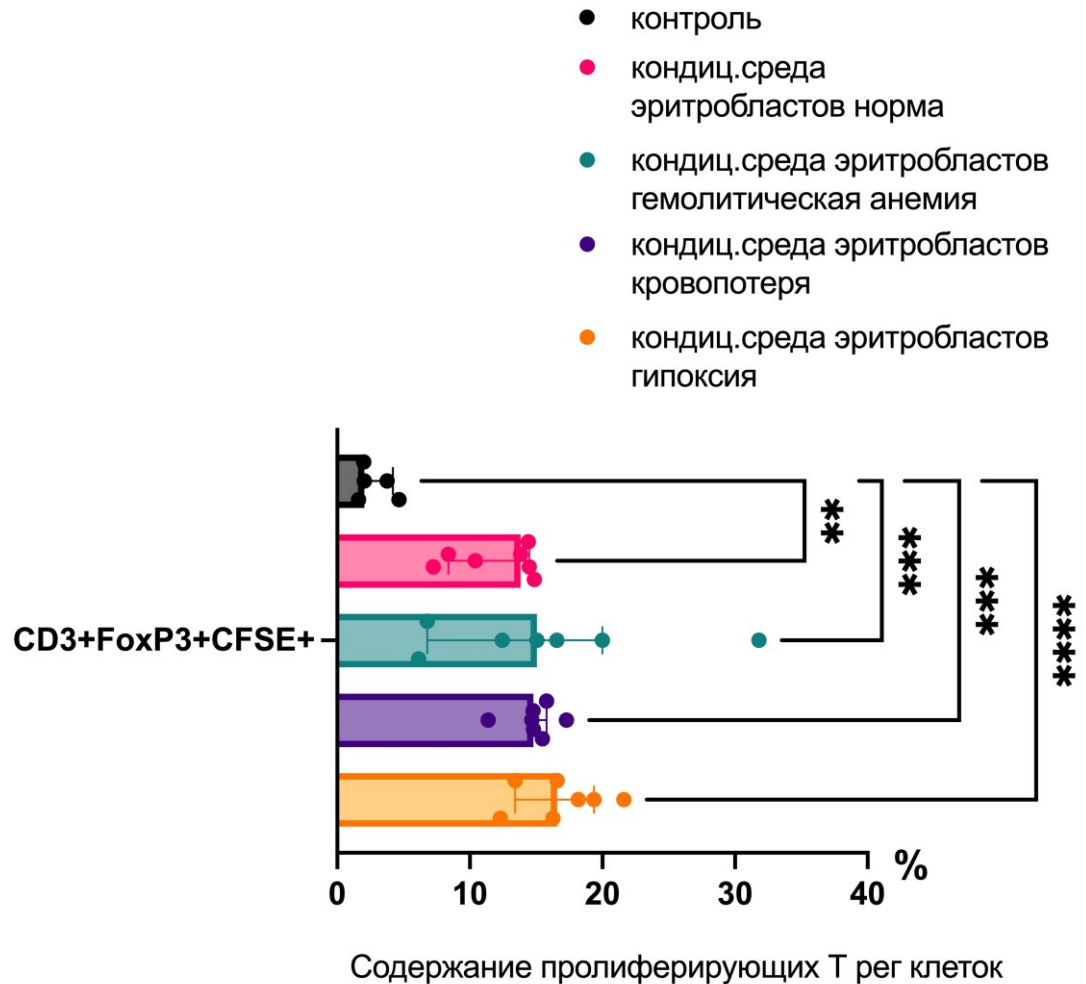


Рис. 15а Процентное содержание Foxp3<sup>+</sup> клеток среди CD3<sup>+</sup> МНК селезенки при обработке кондиционными средами эритробластов, Med, Q25-Q75, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.005 vs контроль

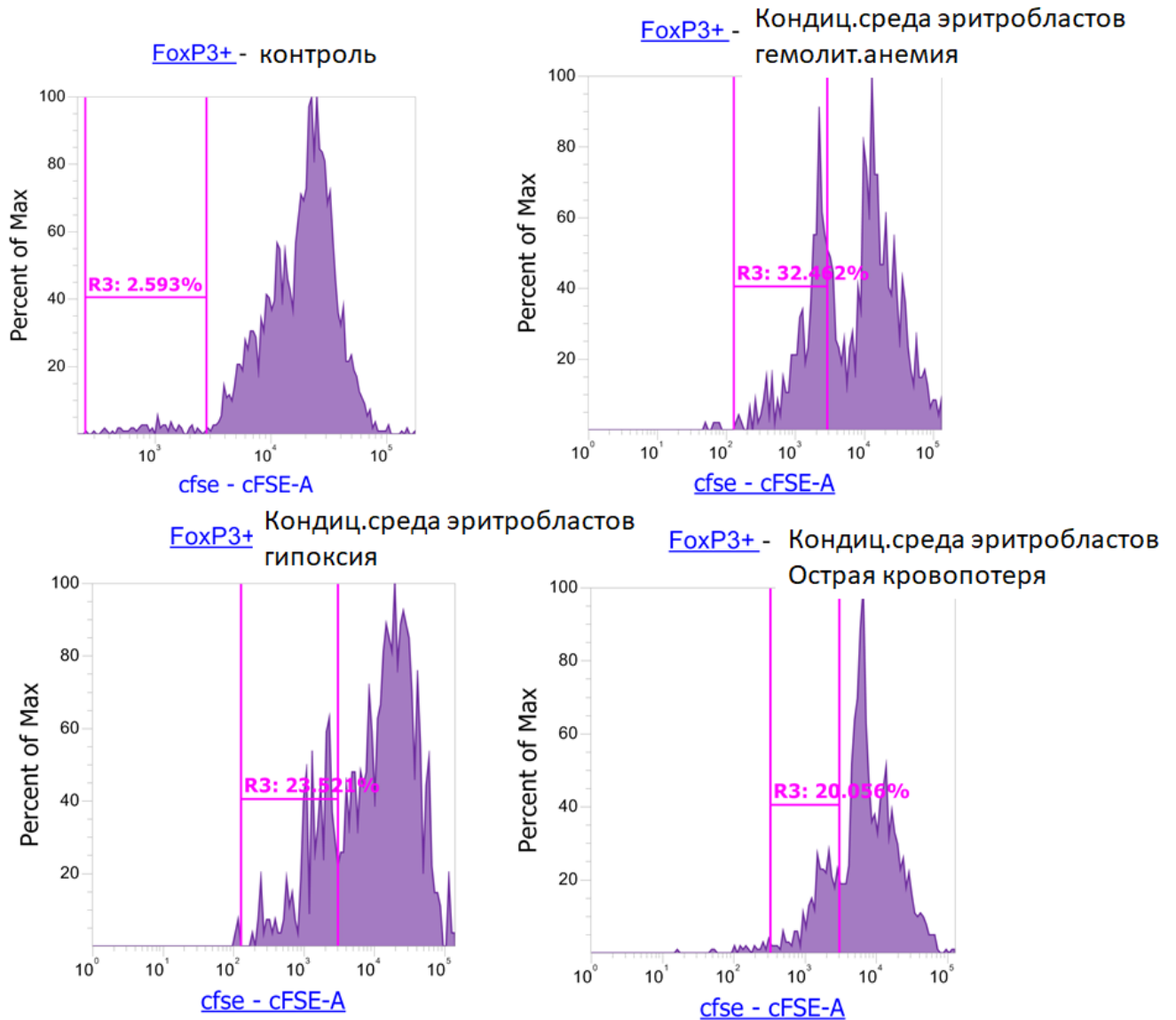


Рис.156 Гистограммы распределения флюоресценции, демонстрирующие пролиферацию CD3+Foxp3+ клеток, предварительно окрашенных витальным красителем CFSE, культивируемые в присутствии кондиционных сред эритробластов по сравнению с контролем (клетки, культивируемые без кондиционной среды эритробластов), гейтом R3 выделен спектр клеток, прошедших один митоз и указано их процентное количество от всех CD3+Foxp3+ клеток. Это указывает, что идёт деление именно Treg клеток.

Важно отметить, что, исследуя соотношение содержания CD4+ и CD8+ T-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 T-клеток, а в общем на все T-клетки, см. Рис.16

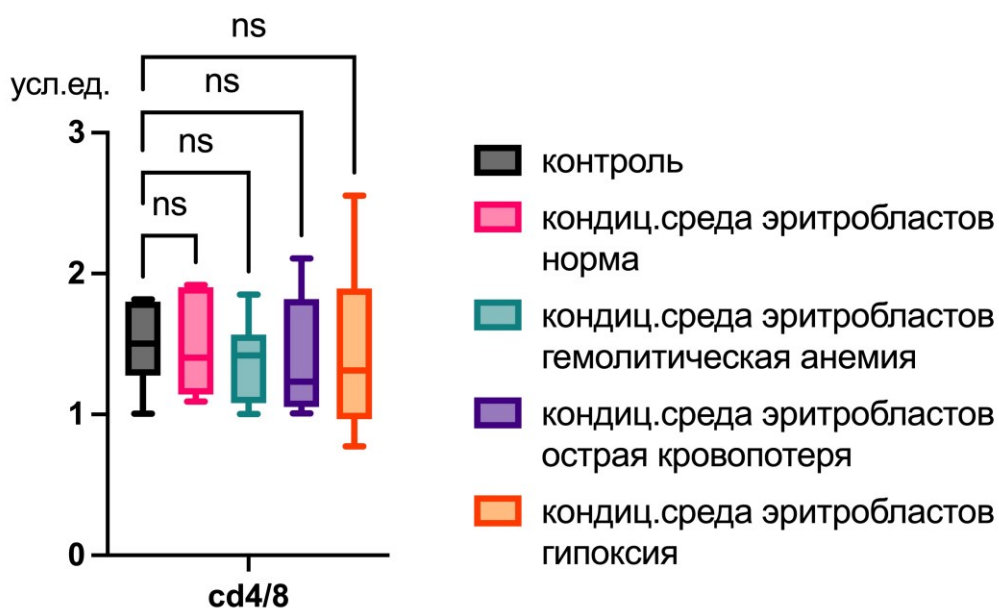


Рис. 16 Соотношение CD4+/ CD8+ Т-клеток селезенки мышей, инкубированных в присутствии различных кондиционных сред эритробластов, Med, Q25-Q75, ns = non significant не значимо, n=7

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.17), что означает, что CD19+ В-клетки начинают уходить в состояние истощения и становятся более чувствительны к проапоптотическим сигналам

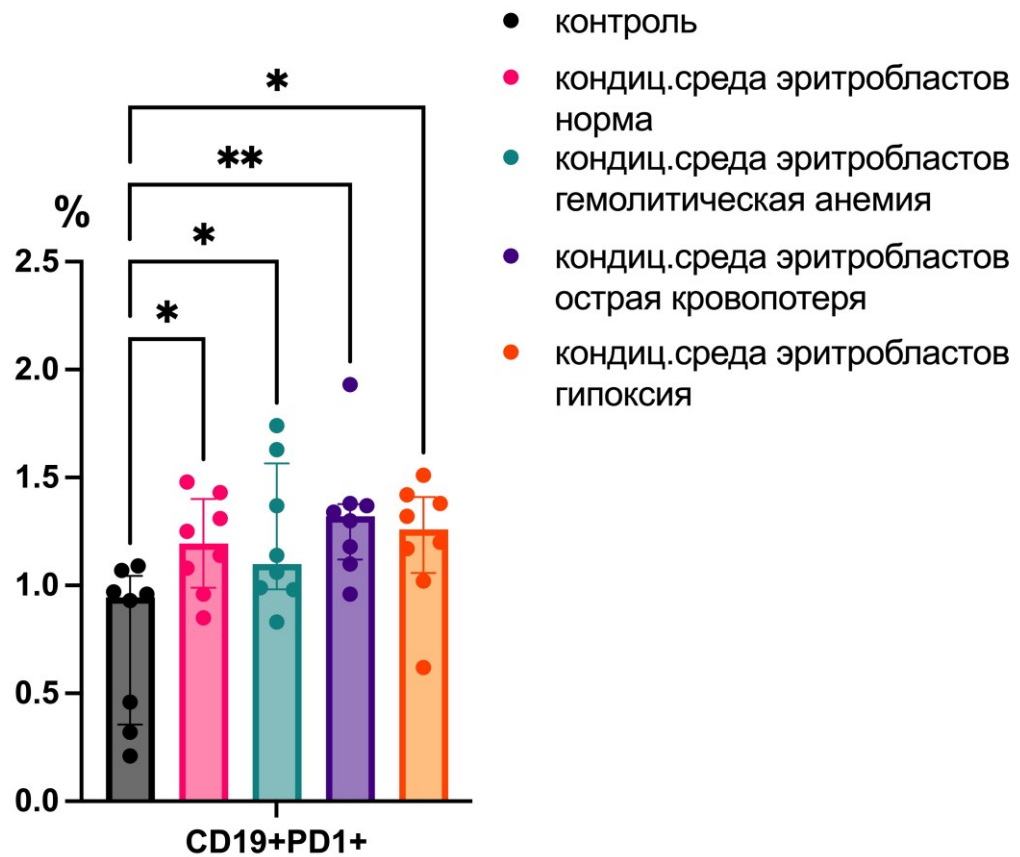


Рис. 17 Процентное содержание CD19+ PD1+ клеток среди МНК селезенки при обработке кондиционными средами эритробластов, Med, Q25-Q75, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs контроль,  $n=8$

Важно заметить, что, исследуя содержание CD19+, CD19+CD30+ В-клеток, CD16|32+ NK-клеток, CD14+ моноцитов среди клеток селезенки во всех случаях не было выявлено каких-либо значимых изменений содержания указанных клеток, см. Рис.18. Это означает, что действие растворимых факторов эритробластов выборочно, то есть они действуют на определенные популяции иммунокомпетентных клеток.

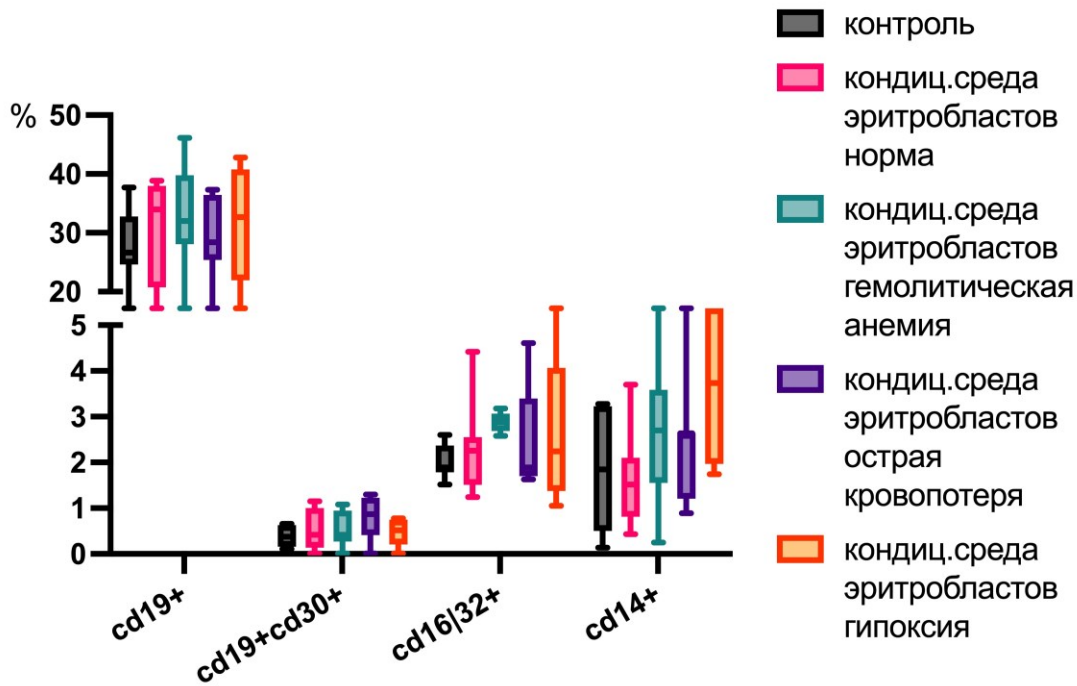


Рис. 18 Процентное содержание CD19+, CD19+CD30+ В-клеток, CD16|32+ NK-клеток, CD14+ моноцитов среди клеток селезенки, Med, Q25-Q75, не обнаружено значимых изменений в содержании во всех исследованных случаях, n=7

### 3.4 Фенотипические особенности эритробластов

Исходя из профиля продукции разнонаправленных иммунорегуляторных медиаторов, что характерно для разных фенотипических и функциональных субпопуляций иммунокомпетентных клеток (например, Th1/Th2-лимфоциты, M1/M2 макрофаги), далее было решено сосредоточиться на поверхностных иммунорегуляторных молекулах эритробластов, т.к. по данным литературы эритробласты способны оказывать эффекты на другие иммунокомпетентные клетки не только на счёт продукции и секреции во внешнюю среду растворимых медиаторов, но и за счёт экспрессии на своей поверхности иммунорегуляторных белков, в частности PDL1 (Delyea, 2018). 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.

Графическое представление кластеров можно увидеть на рисунках ниже.

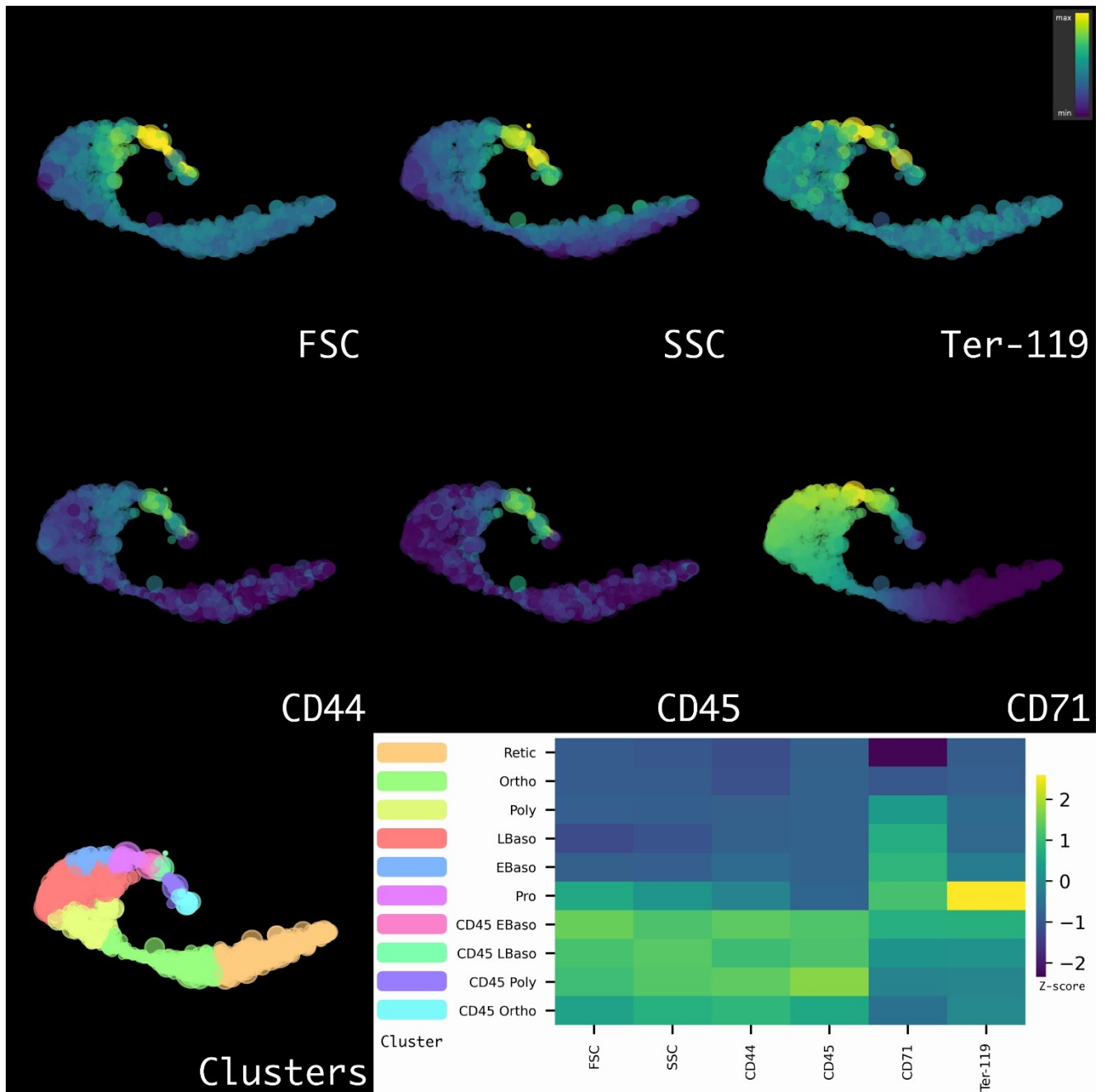


Рис. 19 Результаты кластерирования эритробластов костного мозга мыши в норме (интактные) по поверхностным маркерам, размеру и гранулярности клеток; FSC – параметр прямого светорассеяния отражает размер клеток, SSC – параметр бокового светорассеяния отражает гранулярность клеток, Ter119, CD44, CD45, CD71 – поверхностные маркёры эритробластов, Pro - проэритробласты, EBaso – ранние базофильные эритробласты, LBaso – поздние базофильные, Poly - полихроматические, Ortho – ортохроматические (оксифильные) эритробласты,

Retic – ретикулоциты. Для удобства визуализации и расчётов мы применили к условным единицам флуоресценции  $Z$ -score, стандартизованную оценку, позволяющую хотя бы примерно измерить насколько наблюдаемая величина отличается от среднего в выборке.  $Z$ -score рассчитывают по формуле:  $Z = \frac{X-\mu}{\sigma}$ , где  $X$  – наблюдаемая величина,  $\mu$  – среднее,  $\sigma$  – стандартное отклонение. Если  $Z$  принимает нулевое значение, когда наблюдаемая величина совпадает со средним по выборке,  $Z$  принимает отрицательные значения (на графике синий цвет шкалы), если наблюдаемая величина меньше среднего,  $Z$  принимает положительные значения (на графике желтый цвет шкалы) если наблюдаемая величина больше среднего.

Можно заметить, что как в кластере CD45+, так и в CD45- клеток, выявляются эритробласты всех стадий созревания, в частности, это отмечено по нисходящей поверхностной экспрессии CD44. Аналогичные тенденции прослеживаются в других исследованных случаях.

Известно, что CD45 – это рецепторная тирозин-фосфатаза, присутствующая на поверхности всех гемопоэтических клеток, за исключением эритроцитов, тромбоцитов и плазмоцитов, поэтому эту молекулу нередко называют панлейкоцитарным маркером (Волков, 2023). Функции и лиганды CD45 ещё не полностью выяснены, известно, например, что CD45 на Т-клетках регулирует силу и частоту поступающего через Т-клеточный рецептор сигнала, действуя на разные субстраты (Courtney, 2019). Функция CD45 на эритроблестах тоже пока еще не полностью ясна, имеются сообщения о том, что мыши с дефектом CD45 не страдают анемией, у них нормальное содержание эритроцитов в кровотоке, однако, у них повышено содержание эритроидных предшественников в селезенке и уменьшено время жизни эритроцитов, то есть CD45 является регулятором оборота эритроцитов (Shim, 2020).

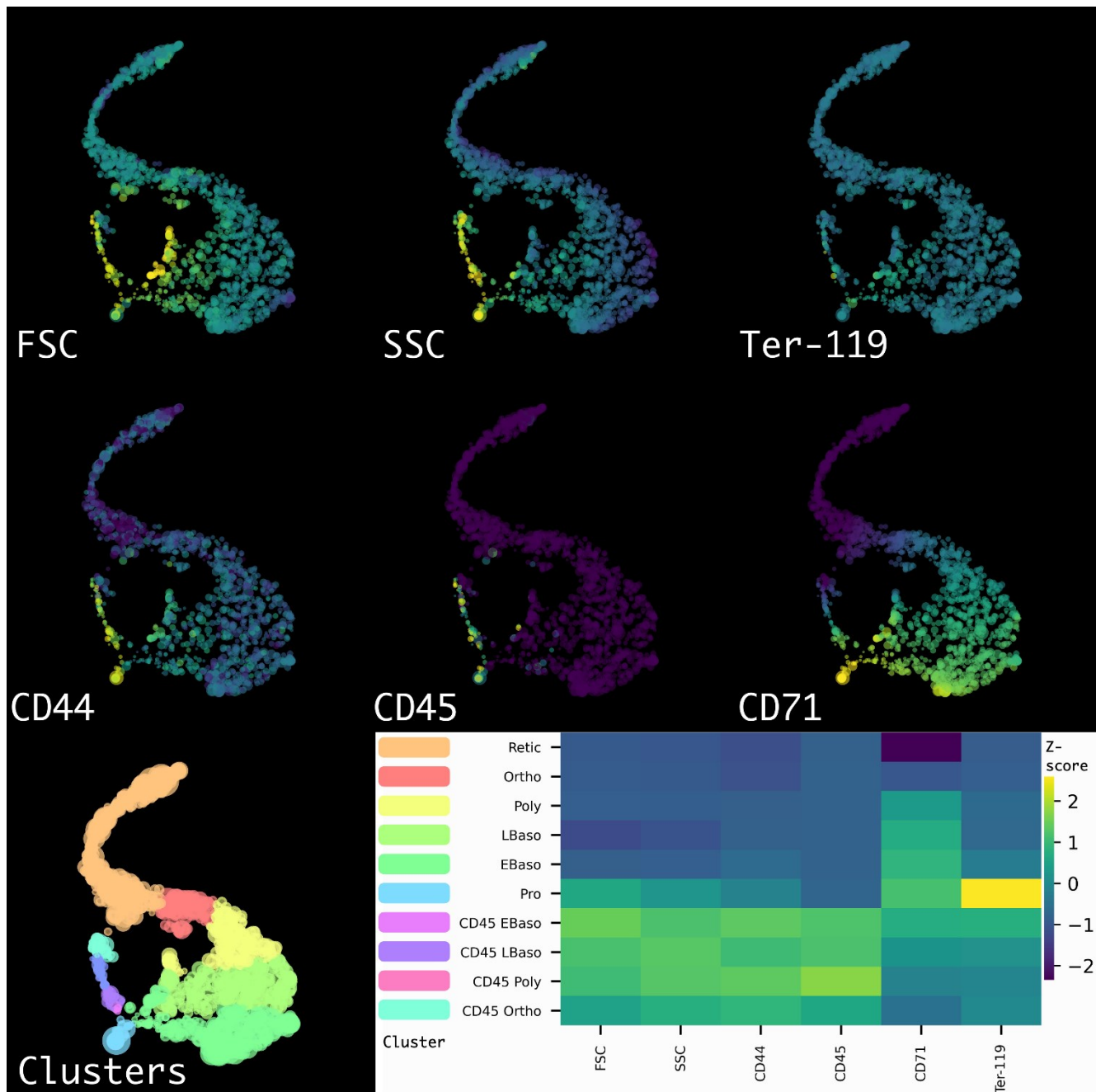


Рис. 20 Результаты кластерирования эритробластов костного мозга мыши при острой кровопотере по поверхностным маркерам, размеру и гранулярности клеток; FSC – параметр прямого светорассеяния отражает размер клеток, SSC – параметр бокового светорассеяния отражает гранулярность клеток, Ter119, CD44, CD45, CD71 – поверхностные маркёры эритробластов, Pro - проэритробласты, EBaso – ранние базофильные эритробласты, LBaso – поздние базофильные, Poly - полихроматические, Ortho – ортохроматические (оксифильные) эритробласты, Retic – ретикулоциты.

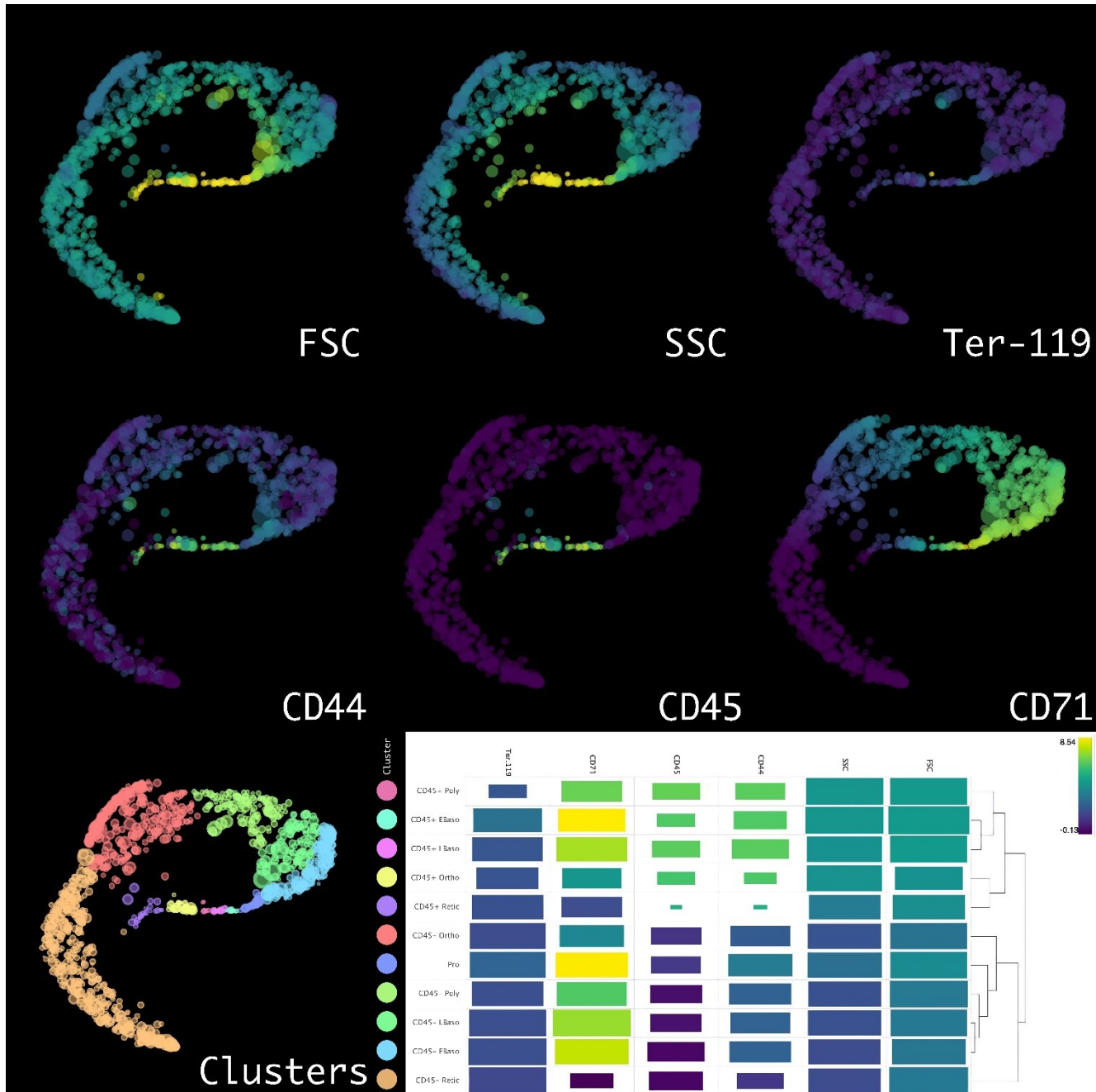


Рис. 21 Результаты кластерирования эритробластов костного мозга мыши при гипоксии по поверхностным маркерам, размеру и гранулярности клеток; FSC – параметр прямого светорассеяния отражает размер клеток, SSC – параметр бокового светорассеяния отражает гранулярность клеток, Ter119, CD44, CD45, CD71 – поверхностные маркёры эритробластов, Pro - проэритробласты, EBaso – ранние базофильные эритробласты, LBaso – поздние базофильные, Poly – полихроматические, Ortho – ортохроматические (оксифильные) эритробласты, Retic – ретикулоциты.

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 22.

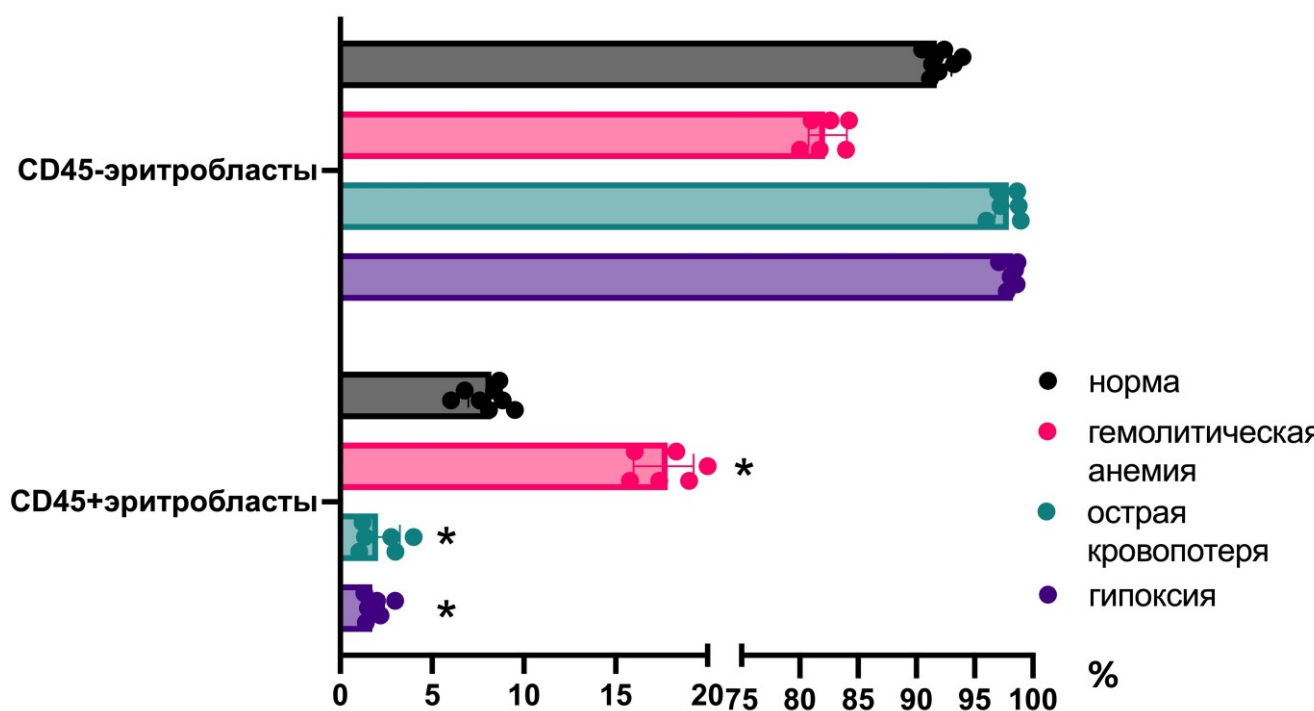


Рис. 22 Процентное содержание CD45+ и CD45- эритробластов от всех эритроидных клеток костного мозга мыши; Med, Q25-Q75, \* P<0.01 vs норма, n=6

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).

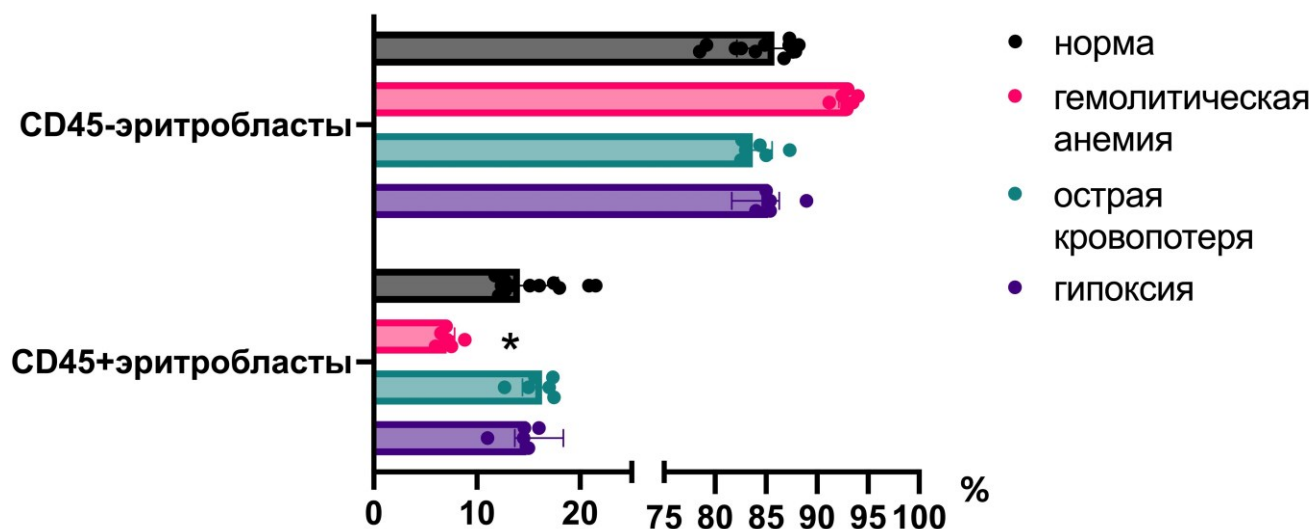


Рис. 23 Процентное содержание CD45+ эритробластов от всех эритроидных клеток селезенки мыши; Med, Q25-Q75, \* P<0.01 vs норма, n=6

### 3.5 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+ эритроблестах (в норме медиана ~80%, при гемолитической анемии медиана 39%)
- повышение содержания галектина-9 на CD45+ эритроблестах (в норме медиана ~3%, при гемолитической анемии медиана 37%) и лиганда клеточной смерти PDL1 на CD45+ эритроблестах (в норме медиана ~1%, при гемолитической анемии медиана 79%)
- снижение содержания CXCR4 на CD45- эритроблестах с одновременным повышением на CD45+ эритроблестах, см.Рис.24

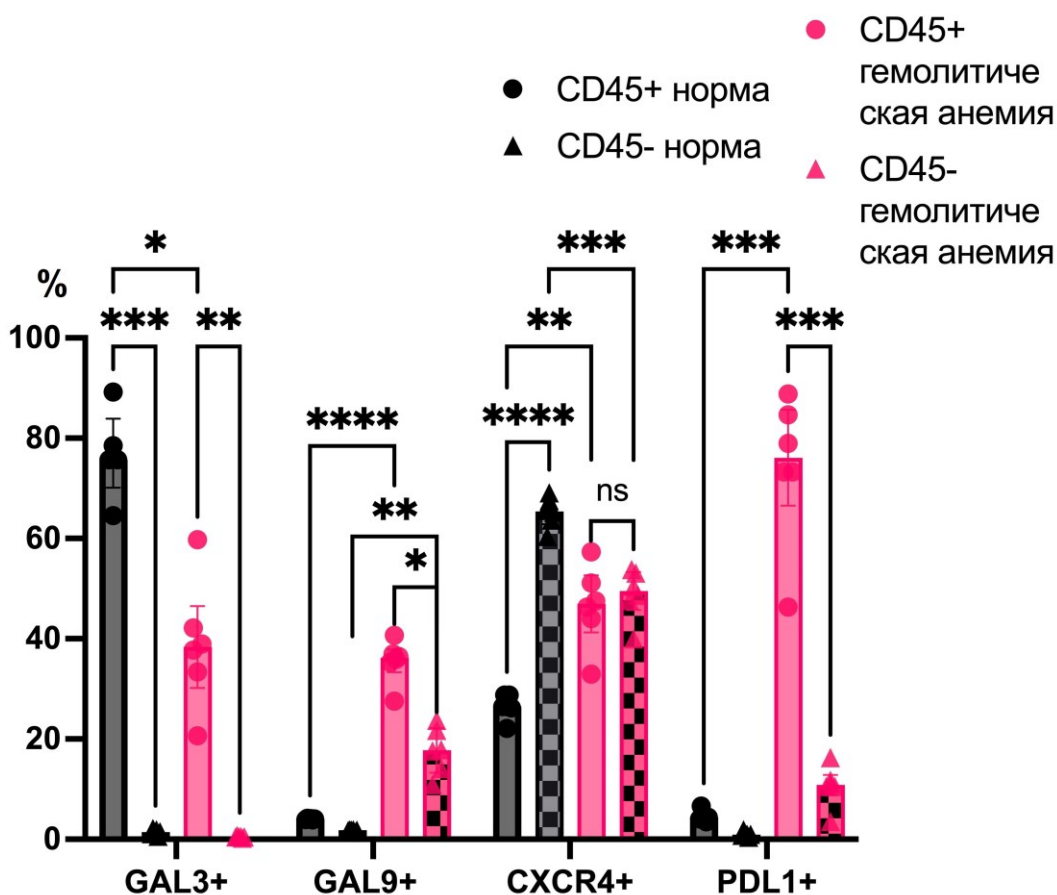


Рис. 24 Процентное содержание клеток, несущих исследуемые поверхностные маркеры (галектин 3 Gal3, галектин 9 Gal9, CXCR4, PDL1), от CD45+ и CD45- эритробластов костного мозга мыши; Med, Q25-Q75, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.005, \*\*\*\* P<0.001, ns = non significant не значимо, n=6

Исследуя содержание внутриклеточных иммунорегуляторных молекул в эритроблестах костного мозга мыши было показано, что:

- при гемолитической анемии внутриклеточное содержание TGFb увеличивается как в CD45+, так и в CD45- эритроблестах по сравнению с нормой
- при гемолитической анемии наиболее значимое увеличение внутриклеточного содержания TGFb можно наблюдать именно в CD45- эритроблестах, в 10 раз по сравнению с нормой
- при гемолитической анемии внутриклеточное содержание IL10 уменьшается в CD45- эритроблестах по сравнению с нормой, см.Рис.25

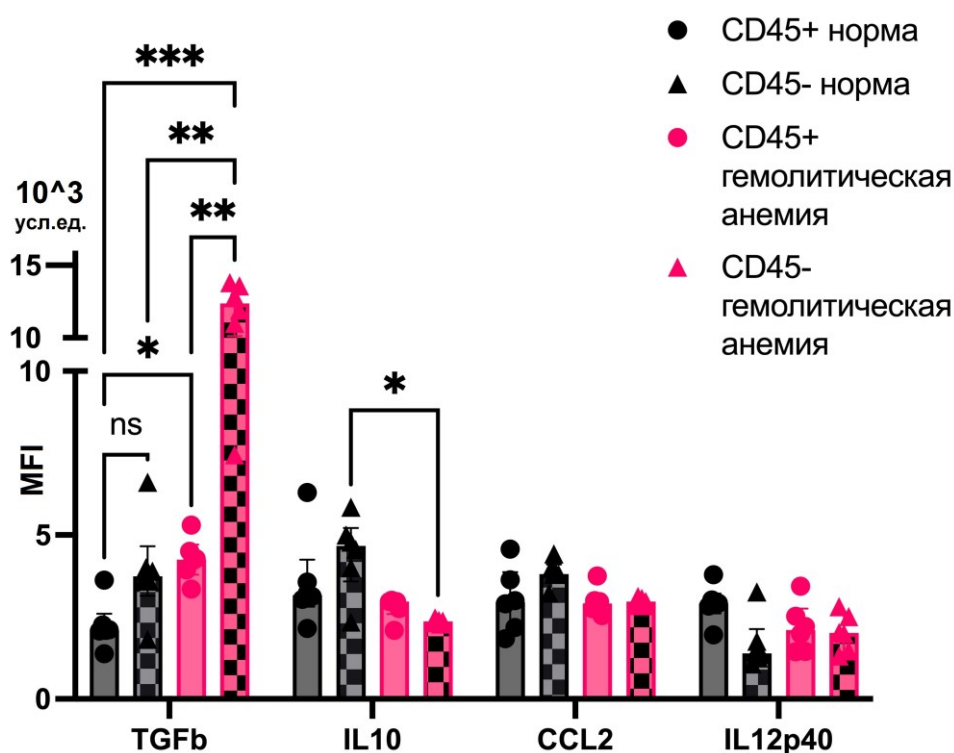


Рис. 25 Медианная интенсивность флуоресценции (Median Fluorescence Intensity – MFI) внутриклеточного содержания иммунорегуляторных медиаторов (TGFb, IL10, CCL2, IL12p40) в CD45+ и CD45- эритроблестах костного мозга мыши; Med, Q25-Q75, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.005, ns = non significant не значимо, 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- эритроблестах повышается содержание галектина-9, причем наиболее значимое повышение – на CD45+ эритроблестах (в норме медиана 8%, при гемолитической анемии 29%), см.рисунок 26

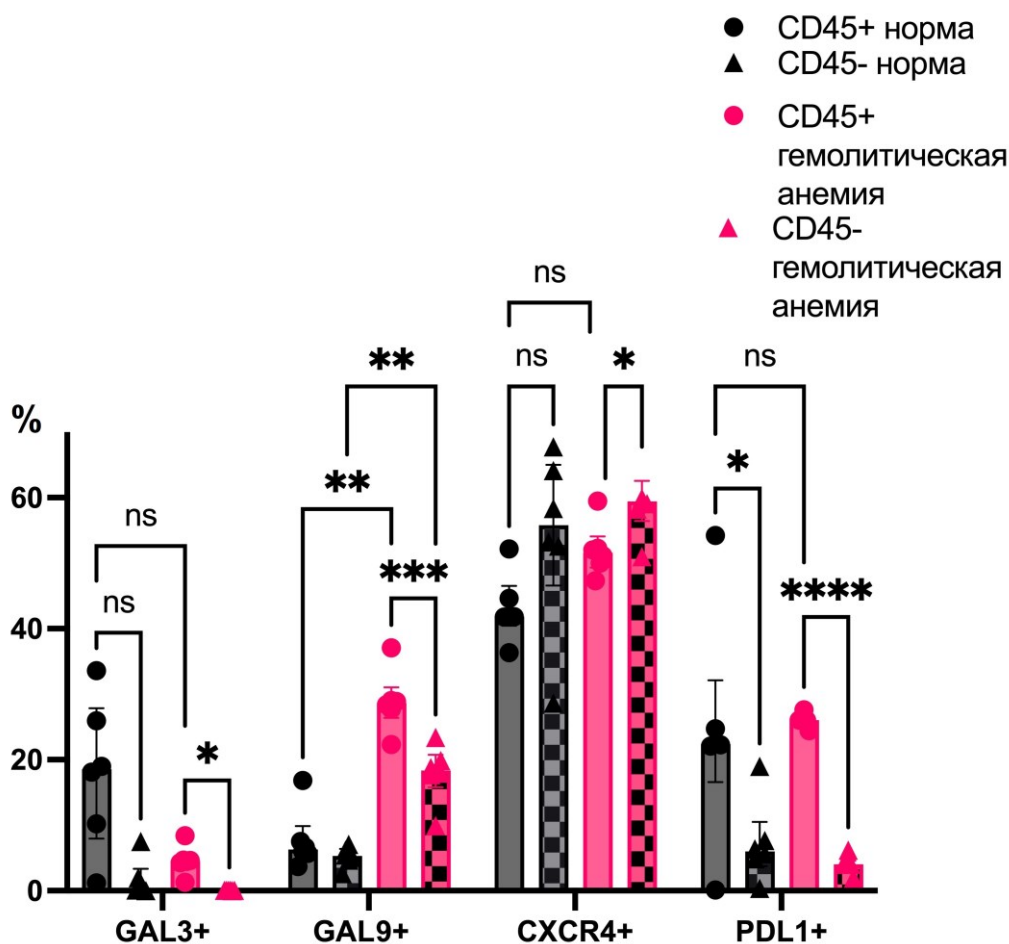


Рис. 26 Процентное содержание клеток, несущих исследуемые поверхностные маркеры (галектин 3 Gal3, галектин 9 Gal9, CXCR4, PDL1), от CD45+ и CD45- эритробластов селезенки мыши; Med, Q25-Q75, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*\*  $P < 0.001$ , ns = non significant не значимо, n=6

Исследуя содержание внутриклеточных иммунорегуляторных молекул в эритроблестах селезенки мыши было замечено, что при гемолитической анемии CD45- эритроблесты селезенки несут внутри своих клеток достоверно меньше IL10 и CCL2 по сравнению с CD45+ эритроблестами селезенки (см.рисунок 27).

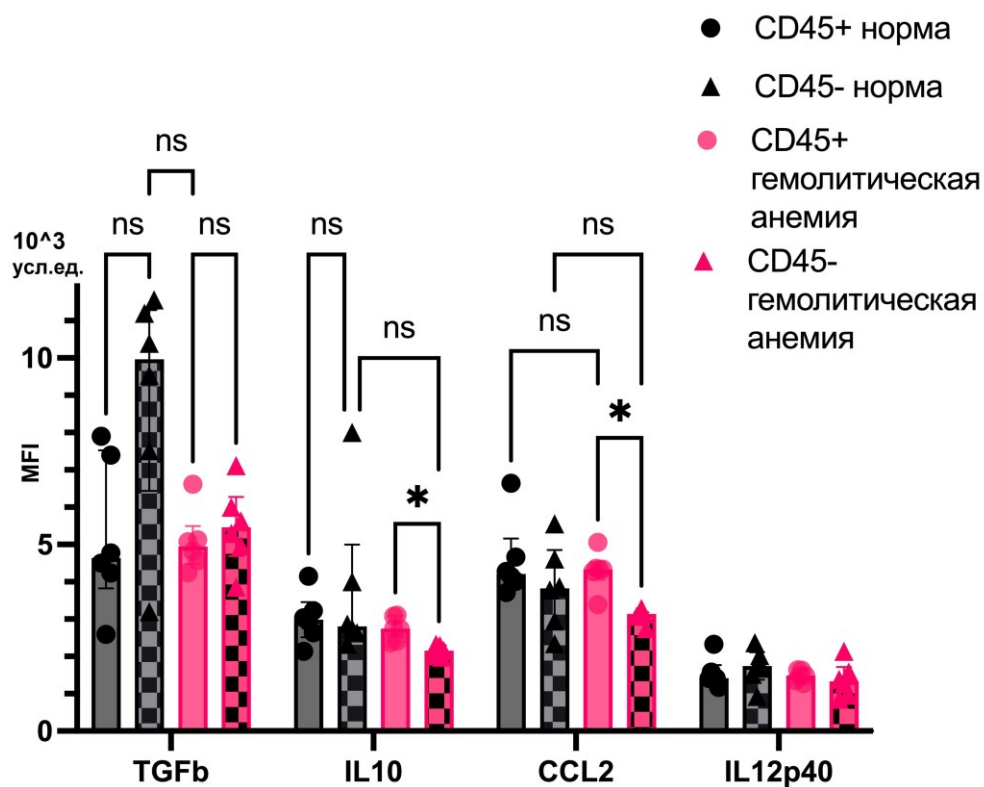


Рис. 27 Медианная интенсивность флуоресценции (Median Fluorescence Intensity – MFI) внутриклеточного содержания иммунорегуляторных медиаторов (TGFb, IL10, CCL2, IL12p40) в CD45+ и CD45- эритроблестах селезенки мыши; Med, Q25-Q75, \* P<0.05, ns = non significant не значимо, n=6

## Глава 4 Обсуждение полученных результатов

Эритробласты обладают иммунорегуляторными свойствами, а также могут регулировать процесс гемопоэза, причем разных ростков кроветворения за счёт синтеза цитокинов (Sennikov, 1996, Sennikov, Eremina, 2001, Majka, 2001, Sennikov, 2004). Исходя из данных профиля экспрессии генов иммунного ответа можно сказать, что эритробласты экспрессируют множество генов иммуноактивных как растворимых факторов - цитокинов, хемокинов, так и поверхностных белков, посредством которых эритроидные клетки могут влиять на процессы кроветворения и иммуногенеза, причем эти влияния могут носить разнонаправленный характер. Для некоторых генов показан количественный характер экспрессии, то есть изменение их экспрессии достоверно меняется (увеличивается или уменьшается) при воздействиях, но не исчезает полностью. Например, при фенилгидразин-индуцированной гемолитической анемии в эритроблестах костного мозга достоверно повышается экспрессия генов *Clec5a*, *Ctsg*, *Camp*, *S100a8*, *S100a9*, *Cd274*, *Il16* по сравнению с костномозговыми эритроблестами нормальных (интактных) животных. Например, при острой кровопотере в эритроблестах костного мозга достоверно повышается экспрессия генов *Clec5a*, *Ctsg* по сравнению с костномозговыми эритроблестами нормальных (интактных) животных. При гипоксии в эритроблестах костного мозга повышается экспрессия генов *Clec5a*, *Clec4e*, *Tnf*, *Il6* по сравнению с костномозговыми эритроблестами нормальных (интактных) животных. Также было замечено, что эритробласты селезенки нормальных (интактных) животных экспрессируют значительно больше гена *Cd274* и значительно меньше гена *Cxcl12* по сравнению с костномозговыми эритроблестами нормальных (интактных) животных. Это можно считать органоспецифическими отличиями в транскриптом эритробластов мыши. Для некоторых генов характер экспрессии носит постоянный, иначе говоря, конститутивный характер, то есть их экспрессия не меняется ни качественно, ни количественно во всех исследованных случаях, в частности, это показано для генов *HLA2*, *Camp*, *Ccr2*, *Mif*, *Ccl3*, *Tgfb1*... Вероятно, эти гены имеют жизненную

необходимость для жизнедеятельности и функционирования эритробласта. На основе этих данных, можно заключить, что при различных гемопоэз-активирующих воздействиях спектр экспрессии генов в эритробластах может качественно и количественно меняться, что указывает на изменение регуляторного потенциала этих клеток в зависимости от гемопоэз-активирующего воздействия и запроса на различные клеточные элементы крови.

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 кателецидина, в патогенезе иммуноопосредованных заболеваний (Lande, 2014, Бахлыкова, 2021). Важно заметить, что кателецидин 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 эритробластах 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 гемопоэтических ниш, предотвращая попадание патогенов в костный мозг посредством активной продукции антимикробных белков, но это требует дальнейшего экспериментального рассмотрения и уточнения. Также в эритробластах 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).

В эритроблестах достоверно можно наблюдать экспрессию генов *Mif* и *CD74*. Известно, что цитокин MIF взаимодействует со своим рецептором CD74 – гамма-цепью MHC II класса, следовательно, их взаимодействие важно для процесса презентации антигена, в частности, CD74 взаимодействует на поверхности T-клеток с CD44, усиливая тем самым T-клеточные ответы. При этом показано, что эритробласты во всех исследуемых нами случаях экспрессируют CD74. Причем при каких-либо воздействиях экспрессия CD74 в эритроидных клетках не меняется. Показано также, что MIF вместе с CD74 способствует выживанию клеток хронического лимфоцитарного лейкоза, посредством активации NFκB, увеличения экспрессии TAr63, VLA4 и увеличения секреции IL-8. Блокада CD74 вела к отсутствию хоуминга клеток хронического лимфоцитарного лейкоза в костный мозг (Shachar, 2011). При повреждении кожи было установлено, что повышенная экспрессия MIF в клетках эпидермиса, а также в культуре фибробластов кожной раны способствовала миграции и пролиферации кератиноцитов. Пик экспрессии MIF, а также его содержания в сыворотке крови при повреждении кожи приходится на 3 и 24 часа после травмы (Farr, 2020). Также установлено, что блокада или делеция CD74 ведёт к накоплению стволовых гемопоэтических клеток в костном мозге (Becker-Herman, 2021). Вероятно, что экспрессия MIF в эритроблестах при острой кровопотере при неизменном уровне экспрессии его рецептора CD74 нужна, чтобы не занимать свободные рецепторы CD74, тем самым дать им возможность активно взаимодействовать с CD44 на T-клетках, тем самым усиливая T-клеточные ответы, что в особенности необходимо при развитии воспалительного процесса, который так или иначе присутствует при травме, сопровождающей кровопотерю. Помимо всего прочего показано, что костномозговые эритробласты здоровых доноров продуцируют MIF (Perik-Zavodskii, Perik-Zavodskaya, 2022).

Для всех исследованных гемопоз-активирующих воздействий можно выделить определенный паттерн усиления экспрессии генов, относящихся к функциональному кластеру – это гены белков с антимикробной активностью. Наиболее ярко это можно наблюдать при сравнении транскриптома эритробластов костного мозга нормальных (интактных) мышей с эритробластами костного мозга мышей с гемолитической анемией. При гемолитической анемии в эритробластах костного мозга мышей повышена экспрессия генов *S100a8*, *S100a9*, *Camp*, *Ctsg*, *Clec5a*, *Cd274*, по сравнению с нормой, что говорит о повышении иммунорегуляторного потенциала эритробластов при гемолитической анемии (потенциальном участии эритробластов в процессах врожденного иммунного ответа за счёт продуктов генов *S100a8*, *S100a9*, *Camp*, *Clec5a*, ремоделировании межклеточного матрикса за счёт продукта гена *Ctsg*, и усиленной иммуносупрессивной способности за счёт продукта гена *Cd274*). При острой кровопотере и гипоксии эти изменения в транскриптоме эритробластов выражены менее ярко, при острой кровопотере в эритробластах костного мозга мыши повышена экспрессия генов *Ctsg*, *Clec5a*, *Csf3r*, а при гипоксии: *Clec5a*, *Clec4e*, *Il6*, *Tnf*, что также говорит о потенциальном участии эритробластов в процессах врожденного иммунного ответа и ремоделировании межклеточного матрикса.

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 мыши захватывать пептиды и представлять их Т-клеткам (Fan, 2024), то этот аспект нуждается в дальнейшем более подробном и тщательном изучении.

Экспрессия в эритробластах генов хемокинов является новым, ранее мало описанным явлением. 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). В данном исследовании показано, что эритробласты продуцируют некоторые цитокины, хотя и на невысоком уровне, но всё же сопоставимом с уровнем продукции иммунокомпетентными клетками мыши, что согласуется с некоторыми ранее опубликованными данными (Sennikov, Silkov, 2001). Есть сообщения о том, что продукция иммуноактивных медиаторов эритробластами костного мозга регулируется микроокружением, в частности, для эритробластов разрешающим фактором продукции *in vitro* является удаление прилипающей фракции костномозговых МНК (Denisova, 2007).

Известно, что хемокиновая сеть в организме чрезвычайно широка, а её эффекты очень разнообразны. Роль хемокинов описана в таких процессах как дифференцировка, миграция клеток, органогенез, толерантность, нейроиммунные взаимодействия (Ohl, 2003, Hu, 2015, Suzuki, 2016, Druzd, 2017). Например, хоумингом антителопродуцентов – плазмоцитов, продукцией иммуноглобулина А в кишке управляют хемокины и их рецепторы (Cyster, 2003, Hu, 2011). Хемокины являются ключевыми факторами, которые влияют на миграцию и поддержание соответствующих иммунных клеток в микроокружении опухоли. Есть мнение, что контролируемое введение определённых хемокинов в микроокружение опухоли может быть эффективной иммунотерапией против рака. Предыдущие исследования показали, что CCL3 способствует распознаванию опухоли иммунной системой путём улучшения презентации антигена дендритными клетками, активацией Т-клеток. В одном из экспериментов, описанных в литературе, наблюдали, что опухоли МС38, сверхэкспрессирующие CCL3, показали быструю регрессию по сравнению с опухолями МС38 дикого типа в условиях *in vivo*. Кроме того, эти сверхэкспрессирующие CCL3 опухоли показали увеличение

пролиферативных и функциональных инфильтрирующих опухоль Т-клеток. Кроме того, блокада иммунной контрольной точки PD-1 ускорила регрессию опухоли в микроокружении CCL3-сверхэкспрессирующей опухоли (Kang, 2021). PDGF $\beta$  является мощным стимулятором воспаления при глиоме высокой степени злокачественности у детей. На нокаутных мышях CCL3<sup>-/-</sup> была продемонстрирована возможность снижения инфильтрации опухоли опухоль-ассоциированными макрофагами и продления выживаемости (Ross, 2021). В одном исследовании показано, что метастатические опухоли сверхэкспрессируют G-CSF, который мобилизует гранулоциты Ly6G+Ly6C<sup>+</sup> и облегчает их последующее перемещение в отдаленные органы. Более того, мобилизованные G-CSF клетки Ly6G+Ly6C<sup>+</sup> продуцируют белок V $\beta$ 8, который участвует в ангиогенезе и мобилизации миелоидных клеток. Антитела анти-G-CSF или анти-V $\beta$ 8 значительно снижают метастазы в легких, а трансплантация клеток печени плода с нулевым V $\beta$ 8 летально облученным реципиентам также снижает метастазирование (Kowanetz, 2010). Известно, что почечноклеточная карцинома склонна метастазировать в легкие, хотя механизм этого процесса еще неясен. В одном из исследований сообщается о связи метастатической активности почечноклеточной карциномы и хемокинов CXCL5 и IL8, которые в основном привлекают в очаг нейтрофилы. Нейтрофилы, привлеченные в легкие хемокинами, секретируемыми опухолью, создают антиметастатический барьер, при этом потеря нейтрофильных хемокинов в опухолевых клетках выступает в качестве критического этапа, ограничивающего скорость метастазирования в легкие (López-Lago, 2013). В одной из работ было обнаружено, что эритробласты человека продуцируют хемокины CXCL5 и IL8 (Perik-Zavodskii, 2022). Надо сказать, что эритробласты тоже 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.

Экспрессия в эритроблестах генов хемокиновых рецепторов *Ccr2*, *Ccr6*, *Ccr7*, *Cxcr4*, *Cxcr5* позволяет предположить участие эритробластов в процессах миграции гемопоэтических и иммунокомпетентных клеток. Известно, что один хемокиновый рецептор может взаимодействовать с множеством хемокинов, которые, кстати, тоже экспрессируются эритроблестами, вполне вероятно, что посредством них эритроидные клетки могут оказывать аутокринные и паракринные влияния на гемопоэз и миграцию клеток. Например, по данным литературы, хемокиновый рецептор CXCR4 важен для нормального гемопоэза (Rettig, 2012), в частности, когда перенос 2 млн CXCR4  $-/-$  клеток фетальной печени летально облучённым мышам приводил к высокой смертности реципиентов, то повышение дозы переносимых клеток, а именно перенос 5 млн CXCR4  $-/-$  клеток фетальной печени летально облучённым мышам приводил к практически нормальному паттерну гемопоэза у реципиентов (Foudi, 2006).

Для CCL2/CCR2 оси описаны полярирующие влияния на функционирование макрофагов. Стимуляция человеческих CD11b<sup>+</sup> миелоидных клеток рекомбинантным CCL2 приводила к увеличению клеток CD14<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>, что предполагает поляризацию в сторону макрофагов типа M2 (Roca, 2009). Sierra-Filardi с коллегами посвятили подробную статью выяснению участия оси CCL2/CCR2 в дифференциации/поляризации макрофагов GM-CSF и M-CSF. Они обнаружили, что добавление рекомбинантного CCL2 во время поляризации мышинных и человеческих моноцитов M-CSF или GM-CSF увеличило маркеры M2 в нескольких различных условиях *in vitro*. Также показано, что этот эффект был воспроизведен у мышей с нокаутом CCR2. У CCR2  $-/-$  мышей отсутствие CCR2 изменило соотношение M1/M2 в брюшной полости таким образом, что M2 макрофаги практически отсутствовали по сравнению с мышами дикого типа (Sierra-Filardi, 2014). Эти работы показывают прямое участие CCL2 в поляризации макрофагов *in vitro* и зависимость эффекта от CCR2.

Роль хемокинов в поддержании гемопоэза несколько противоречива. Например, касаясь роли хемокина CCL3 в поддержке гемопоэза: было показано,

что CCL3 подавляет пролиферацию гемопоэтических предшественников в колониеобразовании *in vitro* (Graham, 1990), усиливает миелопоэз *in vitro* (Broxmeyer, 1990) и не является необходимым для поддержания ГСК *in vivo*, а лишь усиливает GM-колониеобразование уже стимулированных GM-CSF клеток (Broxmeyer, 1989). В одной из работ показано, что CCL3 супрессирует эритропоэз у пациентов с множественной миеломой через ось CCR1/p38, супрессируя фактор GATA1, ключевой позитивный регулятор эритропоэза (Liu, 2020). У мышей CCL3  $-/-$  наблюдали потерю зрелых миелоидных популяций, в то время как содержание миелоидных прогениторных клеток и ГСК было увеличено. Эти данные показывают, что CCL3 способствует дифференциации миелоидного ростка и размеру пула ГСК, участвует в поддержании гомеостаза кроветворения (Staversky, 2018). В одной из работ показано, что экспрессия CCL3 присутствует в популяциях клеток костного мозга с фенотипом  $lin^{low} c-kit^{low} CD16/CD32^{high}$  и  $CD49b^{+} Fc\epsilon R1^{+} CD200R3^{+}$ , которые при окрашивании по Райту демонстрируют типичную морфологию базофилов. Более того, базофилы в костном мозге конститутивно экспрессировали CCL3 без каких-либо воспалительных стимулов; следовательно, CCL3 может функционировать как гомеостатический хемокин в костном мозге в нормальных физиологических условиях (Baba, 2016). Это согласуется с данными, представленными в данной работе, мы отмечаем продукцию хемокина CCL3 эритробластами как костномозговыми, так и селезеночными, причём уровни продукции не терпят значимых изменений при гемопоэз-активирующих воздействиях. Также мы можем заметить, что хемокин CCL3 продуцируют и мононуклеарные клетки селезенки мышей при стимуляции митогеном, можно полагать тонический характер продукции этого хемокина и, следовательно, его гомеостатическую функцию.

Способность эритробластов ингибировать пролиферацию В-лимфоцитов и 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). В некоторых

работах сообщалось о стимуляторном влиянии эритробластов на пролиферацию Т-лимфоцитов (Кашлакова, 1984, Самарин, 1997). Один из молекулярных механизмов действия эритробластов на В-клетки был установлен, в частности, описана существенная роль растворимого фактора TGF $\beta$  (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. После 24-часовой инкубации с кондиционными средами эритробластов среди В-клеток происходит увеличение доли CD19+PD1+ клеток.

Другим механизмом общего супрессивного влияния эритробластов на дифференцировку лимфоидных клеток, можно рассматривать увеличение содержания Т регуляторных клеток. 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). Также известно, что TGF $\beta$ , 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.

Рассматривая структуру эритрона были найдены две группы эритроидных клеток, различающихся по наличию поверхностного маркера CD45. Множество эритробластов CD45<sup>+</sup> представлены клетками крупного размера и высокой гранулярности, множество эритробластов CD45<sup>-</sup> 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<sup>+</sup> и CD45<sup>-</sup> эритробластов на гемопоз-активирующее воздействие неодинаков. Было найдено, что при гемолитической анемии среди костномозговых эритробластов увеличивается доля CD45<sup>+</sup> клеток по сравнению с нормой, а при других гемопоз-активирующих воздействиях (кровопотере и гипоксии) доля CD45<sup>+</sup> эритробластов падает по сравнению с нормой, из чего можно предположить, что CD45<sup>+</sup> и CD45<sup>-</sup> эритробласты могут обладать разным пролиферативным потенциалом и разным регуляторным потенциалом, причём эти различия могут быть органоспецифичны. Так как при гемолитической анемии доля CD45<sup>+</sup> эритробластов снижается по сравнению с нормой, а при других гемопоз-активирующих воздействиях (кровопотере и гипоксии) доля CD45<sup>+</sup> эритробластов в селезенке существенно не меняется.

Есть различия в поверхностной экспрессии иммунорегуляторных молекул у CD45<sup>+</sup> и CD45<sup>-</sup> эритробластов. Из полученных данных можно сказать, что CD45<sup>+</sup> костномозговые эритробласты в норме в большинстве своём несут на своей поверхности галектин-3, в отличие от CD45<sup>-</sup> эритробластов. При гемолитической анемии содержание Gal3<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> эритробластов в костном мозге снижалось, а для CD45<sup>-</sup> эритробластов также оставалось очень низким. Однако, при гемолитической анемии на костномозговых эритробластах достоверно увеличивалось поверхностное содержание галектина-9, причем как на CD45<sup>+</sup>, так и на CD45<sup>-</sup>

эритробластах. 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 79%. 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, TGFb.

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, TGFb, причём супрессивный потенциал как CD45+, так и CD45- эритробластов усиливается при гемопоз-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 эритроблестах 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 гемопоз-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 эритроблестах повышение экспрессии генов некоторых цитокинов (*Tnf*, *Il6*). При гемопоз-активирующих воздействиях продукция растворимых белков-медиаторов эритроблестами меняется незначительно. Хемокины, продуцируемые эритроблестами, позволяют рассматривать участие эритроидных предшественников в регуляции миграционных процессов гемопозитических и иммунокомпетентных клеток. За счет продукции растворимых и поверхностных белков-медиаторов эритроблесты 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 мышцы 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 мышцы 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 *Cxcl12*, *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 ядросодержащих 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-Zavodskaia 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-Zavodskaia 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-Zavodskaia 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>

**Список используемых сокращений**

АКТГ – адренкортикотропный гормон

АОК – антителообразующие клетки

АФК – активные формы кислорода

БОЕ-Э – бурстобразующая единица эритропоэза

ГМ-КОЕ – гранулоцитарно-моноцитарные колониобразующие единицы

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ГЭММ-КОЕ - гранулоцитарно-эритроидно-моноцитарно-мегакариоцитарные колониобразующие единицы

ДК – дендритные клетки

КОЕ-Э – колониобразующая единица эритропоэза

ЛПС – липополисахарид

МДС – миелодиспластический синдром

ЭБ – эритроциты барана

ЭДТА - этилендиаминтетраацетат

Bcl-xL - митохондриальный антиапоптотический белок, B-cell lymphoma-extra large

Bmp – костный морфогенетический белок

CD – кластер дифференцировки

CDK – циклин-зависимые киназы

c-Kit – тирозинкиназный рецептор стволового клеточного фактора

Epo - эритропоэтин

EpoR – эритропоэтиновый рецептор

ER – эстрогеновый рецептор

GATA – семейство транскрипционных факторов, запускающих транскрипцию эритроид-специфичных генов

GDNF – глиальный нейротрофический фактор

G-CSF - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

GM-CSF – гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор

GR – глюкокортикоидный рецептор

ICAM-4 –внутриклеточная молекула адгезии 4 (intercellular adhesion molecule 4)  
IDO - индоламиндиоксигеназа  
IFN – интерферон  
IGF/IGFR – инсулиноподобный фактор роста и его рецептор  
IL – интерлейкин  
InsR – инсулиновый рецептор  
Jak – янус-киназа  
HIF – фактор, индуцируемый гипоксией  
LCMV - вирус хронического лимфоцитарного хориоменингита  
LIF - фактор ингибирования лейкемии  
MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа  
MCR – меланокортиновый рецептор  
MHC– главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex), он же  
HLA – человеческий лейкоцитарный антиген (human leucocyte antigen)  
NFκB – ядерный фактор каппи би  
PBS – фосфатно-солевой буферный раствор (phosphate-buffered saline)  
PD-1/PD-L1 – белок программируемой клеточной смерти и его лиганд  
PDGFR - рецептор фактора роста тромбоцитов  
PGE – простагландин E  
PIGF - фактор роста плаценты  
PKC – протеинкиназа C  
PLC – фосфолипаза C  
PPAR - рецептор активируемый пролифератором пероксисом  
RCAS - рецептор-связывающий раковый антиген  
SCF – стволовой клеточный фактор  
Stat - белок, трансдуцирующий сигнал и активирующий транскрипцию (signal transducer and activator of transcription)  
TCR – T-клеточный рецептор

TGF – трансформирующий фактор роста

TLR – толл-лайн рецептор

TNF – фактор некроза опухоли

TNFRSF – суперсемейство рецепторов фактора некроза опухоли

Th – Т хелперные лимфоциты

Treg – Т регуляторные лимфоциты

TRAIL– лиганд индукции апоптоза семейства фактора некроза опухоли (TNF-related apoptosis-inducing ligand)

VEGF - фактор роста эндотелия

### **Список использованной литературы**

1. Бахлыкова Е.А., Филимонкова Н.Н., Матусевич С.Л., Кармацких О.Г., Жвавый П.Н. Содержание антимикробного пептида кателицидина LL-37 и бактериальный профиль кожи при бляшечном, экссудативном и пустулезном псориазе. Клиническая дерматология и венерология. 2021;20(1):33-39
2. Ватутин Н.Т., Смирнова А.С., Калинин Н.В., Шевелек А.Н. Анемия у больных ревматоидным артритом: особенности патогенеза, диагностики и лечения, РМЖ, 2013; 21:1069
3. Волков Д.В., Степанова В.М., Рубцов Ю.П., Степанов А.В., Габибов АГ. Тирозинфосфатаза CD45 – регулятор иммунитета и потенциальный эффектор CAR Т-терапии, Acta Naturae, 2023, 15(3), 17-26. doi: 10.32607/actanaturae.25438
4. Журавкин И.Н. Антителогенез в условиях подавленного и стимулированного эритропоэза: дисс. канд. биол. наук, Новосибирск, 1979, стр. 174
5. Инжелевская Т.В. Продукция гемо- и иммунорегуляторных цитокинов клетками эритроидного ряда мыши и человека: дисс.канд.биол.наук, Новосибирск, 2001

6. Кашлакова Н.В. Иммунодепрессивное действие бластных клеток эритроидной природы *in vitro*: дисс. канд. биол. наук, Томск, 1987, стр. 121.
7. Кашлакова Н.В., Лисуков И.А., Цырлова И.Г., Васильев Н.В., Козлов В.А. Супрессивный эффект бластных клеток мышей линии АКР на антителообразование *in vivo* и пролиферацию *in vitro*, Бюлл. эксп. биол. и мед., 1988, 2, 184-186
8. Козлов В.А., Лозовой В.П., Журавкин И.Н. Антителогенез и миграция В-клеток из костного мозга в селезенку у мышей в условиях стимулированного и подавленного эритропоэза, Бюл.эксп.биол. и мед., 1977, 3, с. 303-305
9. Козлов В.А., Журавкин И.Н., Цырлова И.Г. Стволовая кроветворная клетка и иммунный ответ, Новосибирск: Наука, 1982, стр.222
10. Меерсон Ф.З., Сухих Г.Т. Влияние адаптации к периодическому действию гипоксии на некоторые показатели иммунологической реактивности, Иммунология, 1981, 3, 34-38
11. Орловская И.А. Пролиферативная активность ранних гемопоэтических предшественников: регуляторная роль в гемо- и иммунопоэзе в норме и при иммунопатологии: дисс.докт.мед.наук, Новосибирск, 1997
12. Самарин Д.М. Характеристика естественной супрессорной активности незрелых эритроидных клеток: дисс.канд.мед.наук, Новосибирск, 1996
13. Свидетельство на открытие №385 Явление регуляции гуморального иммунного ответа клетками эритроидного ряда, авторы открытия Козлов В.А., Цырлова И.Г., Чеглякова В.В., Государственный комитет по изобретениям и открытиям при Государственном комитете СССР по науке и технике, открытие зарегистрировано 14.06.1990
14. Сенников С.В., Кашлакова Н.В., Санин А.В., Цырлова И.Г., Козлов В.А. Исследование роли Т-лимфоцитов в иммуносупрессии, осуществляемой клетками эритроидного ряда, Иммунология, 1987, 8 (3), 36-8
15. Сенников С.В. Влияние эритробластов на реакции клеточного и гуморального иммунитета: дисс.канд.мед.наук, Новосибирск, 1988, стр. 124

16. Сенников С.В. Цитокин-синтезирующая активность эритроидных ядродержащих клеток: дисс.докт.мед.наук, Новосибирск, 2001, стр. 250
17. Сизиков А.Э., Сеньюков В.В., Кожевников В.С., Коненкова Л.П. и др. Клинико-иммунологическая характеристика больных ревматоидным артритом с анемией, Медицинская иммунология, 2005, 7 (5-6), 593-600
18. Сизиков А.Э. Клинико-иммунологическая характеристика больных ревматоидным артритом с анемией: дисс.канд.мед.наук, Новосибирск, 2006, стр.171
19. Тарабан В.Я. Роль лимфоидных и эритроидных клеток в регуляции противоопухолевой активности костномозговых цитостатических клеток-эффекторов: дисс.канд.мед.наук, Новосибирск, 1997
20. Цырлова И.Г. Иммуносупрессорные клетки эритроидного ряда Эр-супрессоры и их роль в регуляции иммунитета, Вестник АМН СССР, 1991, 12, 34-39
21. Чеглякова В.В. Клетки-регуляторы гуморального иммунного ответа эритроидной природы: дисс.канд.мед.наук, Новосибирск, 1984, стр. 140
22. Alamo I. G., Kannan K. B., Loftus T. J., Ramos H. et al. Severe trauma and chronic stress activates extramedullary erythropoiesis, J Trauma Acute Care Surg, 2017, 83(1), 144–150 doi:10.1097/TA.0000000000001537
23. Anderl I., Vesala, L., Ihalainen, T.O., Vanha-aho, L.M. et al. Transdifferentiation and proliferation in two distinct hemocyte lineages in *Drosophila Melanogaster* larvae after wasp infection, PLoS Pathogens, 2016, 12, e1005746. doi.org/10.1371/journal.ppat.1005746
24. Angelin-Duclos C., Domenget C. et al. Thyroid hormone T3 acting through the thyroid hormone alpha receptor is necessary for implementation of erythropoiesis in the neonatal spleen environment in the mouse, Development, 2005, 132:925-934
25. Angelillo-Scherrer A., Burnier L. et al. Role of Gas6 in erythropoiesis and anemia in mice, J Clin Invest, 2008, 118, 583–596

26. Arcasoy M.O. Erythropoiesis-stimulating agent use in cancer: preclinical and clinical perspectives, *Clin Cancer Res*, 2008; 14(15):4685-4690.  
doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0264
27. Arlet J.B., Ribeil J.A., Guillem F. et al. HSP70 sequestration by free  $\alpha$ -globin promotes ineffective erythropoiesis in  $\beta$ -thalassaemia, *Nature*, 2014; 514(7521): 242-246. doi:10.1038/nature13614
28. Baba T, Tanabe Y, Yoshikawa S, et al. MIP-1 $\alpha$ /CCL3-expressing basophil-lineage cells drive the leukemic hematopoiesis of chronic myeloid leukemia in mice. *Blood*. 2016;127(21):2607-2617. doi:10.1182/blood-2015-10-673087
29. Bao Y., Liu Z., Guo M., Li B., Sun X., Wang L. Extramedullary hematopoiesis secondary to malignant solid tumors: a case report and literature review, *Cancer Manag Res*, 2018; 10:1461-1470 doi:10.2147/CMAR.S161746
30. Bataller A, Montalban-Bravo G, Soltysiak KA, Garcia-Manero G. The role of TGF $\beta$  in hematopoiesis and myeloid disorders. *Leukemia*. 2019;33(5):1076-1089. doi:10.1038/s41375-019-0420-1
31. Batard P., Monier M.N., Fortunel N. et al. TGF-beta1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation, *J Cell Sci*, 2000, 113(Pt 3), 383-390.  
doi:10.1242/jcs.113.3.383
32. Becker-Herman S., Rozenberg M. CD74 is a regulator of hematopoietic stem cell maintenance, *PLoS Biol*, 2021, 19(3):e3001121
33. Benner M., Feyaerts D. et al. Tolerogenic B cells feature in the dynamic immunological landscape of the pregnant uterus, *Cell Rep*, 2020, 32, no.13, pp. 108204
34. Bibikova E., Min-Young Y. et al. TNF-mediated inflammation represses GATA1 and activates p38 MAP kinase in RPS19-deficient hematopoietic progenitors, *Blood*, 2014, 124(25), 3791-8
35. Bozorgmehr N., Okoye I., Mashhour S., et al. CD71<sup>+</sup> erythroid cells suppress T-cell effector functions and predict immunotherapy outcomes in patients with

- virus-associated solid tumors, *J Immunother Cancer*, 2023; 11(5):e006595  
doi:10.1136/jitc-2022-006595
36. Bouchnita A., Eymard N. et al. Bone marrow infiltration by multiple myeloma causes anemia by reversible disruption of erythropoiesis, *Am J Hematol*, 2016, 91(4), 371-8
37. Bronte V., Brandau S., Chen S.H. et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards, *Nat Commun*, 2016; 7:12150. doi:10.1038/ncomms12150
38. Broxmeyer H.E., Sherry B., Lu L., et al. Myelopoietic enhancing effects of murine macrophage inflammatory proteins 1 and 2 on colony formation in vitro by murine and human bone marrow granulocyte/macrophage progenitor cells, *J Exp Med*, 1989; 170(5): 1583-1594 doi:10.1084/jem.170.5.1583
39. Broxmeyer H.E., Sherry B., Lu L., et al. Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells, *Blood*, 1990; 76(6):1110-1116
40. Buesche G., Teoman H., Giagounidis A. et al. Impaired formation of erythroblastic islands is associated with erythroid failure and poor prognosis in a significant proportion of patients with myelodysplastic syndromes, *Haematologica*, 2016; 101(5):e177-e181. doi:10.3324/haematol.2015.129015
41. Bühring H.J., Müller T., Herbst R. et al. The adhesion molecule E-cadherin and a surface antigen recognized by the antibody 9C4 are selectively expressed on erythroid cells of defined maturational stages, *Leukemia*, 1996; 10(1): 106-116
42. Burrows P.D., Kearney J.F. et al. Pre-B cells: bone marrow persistence in anti- $\mu$ -suppressed mice, conversion to B lymphocytes, and recovery after destruction by cyclophosphamide, *J Immunol*, 1978, 120 (5), 1526-31
43. Catania A., Rajora N. et al. The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro, *Peptides*, 1996, 17,675–79
44. Cavezzi A., Troiani E., Corrao S. COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review, *Clin Pract*, 2020, 10(2), 1271

45. Chasis J.A., Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis, *Blood*, 2008; 112(3):470-478. doi:10.1182/blood-2008-03-077883
46. Chen Ke, Jing L. et al. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(41), 17413-8
47. Chen J., Qiao Y.-D. et al. Intratumoral CD45+CD71+ erythroid cells induce immune tolerance and predict tumor recurrence in hepatocellular carcinoma, *Cancer Letters*, 2021, 499, 85-98
48. Choukrani G, Visser N, Ustyanyovska Avtenyuk N, et al. Galectin-9 has non-apoptotic cytotoxic activity toward acute myeloid leukemia independent of cytarabine resistance. *Cell Death Discov.* 2023;9(1):228. doi:10.1038/s41420-023-01515-w
49. Clements RL, Kennedy EA, Song D, et al. Human erythroid progenitors express antigen presentation machinery. Preprint. bioRxiv. 2024;2024.06.27.601047. Published 2024 Jul 1. doi:10.1101/2024.06.27.601047
50. Colonne Ch. K., Yao J. H., Pilgrim Ch., Williams H., Fraser S. Surface CD45 expression levels distinguish normal erythroblasts from stress erythroblasts during haemolytic anaemia and pregnancy-induced anaemia, *Experimental Hematology*, 2015, 43(9), Supplement S58, DOI: 10.1016/j.exphem.2015.06.104
51. Coulon S., Dussiot M., Grapton D., et al. Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia, *Nat Med*, 2011; 17(11): 1456-1465. doi:10.1038/nm.2462
52. Courtney A.H. et al. CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells, *Sci Signal*, 2019, 12, eaaw8151 doi:10.1126/scisignal.aaw8151
53. Cui L., Takada H. et al. Immunoregulatory function of neonatal nucleated red blood cells in humans, *Immunobiology*, 2016, 221, 853-61
54. Cyster JG. Homing of antibody secreting cells, *Immunol Rev*, 2003, 194, 48-60
55. Czystowska-Kuzmicz M., Sosnowska A. et al. Small extracellular vesicles containing arginase-1 suppress T-cell responses and promote tumor growth in ovarian carcinoma, *Nature Communications*, 2019, 10, p.3000

56. Dang E., Man G., Zhang J. Inducible nitric oxide synthase is required for epidermal permeability barrier homeostasis in mice, *Exp Dermatol*, 2020, 29(10):1027-1032
57. de Kruijf E.-J. F. M., Fibbe W.E., van Pel M. Cytokine-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization: unraveling interactions between stem cells and their niche, *Ann N Y Acad Sci*, 2020, 1466(1), 24-38
58. de Wolf J.T., Beentjes J.A. et al. Interleukin-4 suppresses the interleukin-3 dependent erythroid colony formation from normal human bone marrow cells, *Br J Haematol*, 1990, 74(3), 246-50
59. Delyea C., Bozorgmehr N., Koleva P. et al. CD71(+) Erythroid suppressor cells promote fetomaternal tolerance through arginase-2 and PDL-1, *Journal of Immunology*, 2018, 200, 4044-4058 doi: 10.4049/jimmunol.1800113
60. Denisova V.V., Kulagin A.D., Lisukov I.A., et al. Cytokine-producing activity of bone marrow erythrokaryocytes and its regulation under normal conditions. *Bull Exp Biol Med*. 2007;143(2):218-221. doi:10.1007/s10517-007-0055-5
61. Dong R., Zhang M., Hu Q. et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy, *Int J Mol Med*, 2018;41:599–614. doi: 10.3892/ijmm.2017.3311.
62. Dong S, Shah NK, He J, et al. The abnormal expression of Tim-3 is involved in the regulation of myeloid-derived suppressor cells and its correlation with preeclampsia. *Placenta*. 2021; 114: 108-114.
63. Dulay A.T., Buhimschi I.A. et al. Nucleated red blood cells are a direct response to mediators of inflammation in newborn, *Gynecology*, 2008, 198, 421-26
64. Dunsmore G., Bozorgmehr N. et al. Erythroid suppressor cells compromise neonatal immune response against bordetella pertussis, *J Immunol*, 2017, 199, 2081-95
65. Dunsmore G., Koleva P. et al. Lower abundance and impaired function of CD71+ erythroid cells in inflammatory bowel disease patients during pregnancy, *Journal of Crohn's & Colitis*, 2019, 13, 230-244 doi:10.1093/ecco-jcc/jjy147

66. Dussouchaud A, Jacob J, Secq C, et al. Transmission Electron Microscopy to Follow Ultrastructural Modifications of Erythroblasts Upon ex vivo Human Erythropoiesis. *Front Physiol.* 2022;12:791691. doi:10.3389/fphys.2021.791691
67. Druzd D, Matveeva O, Ince L, et al. Lymphocyte circadian clocks control lymph node trafficking and adaptive immune responses, *Immunity*, 2017, 46(1), 120-132
68. Dybedal I., Larsen S., Jacobsen S.E. IL-12 directly enhances in vitro murine erythropoiesis in combination with IL-4 and stem cell factor, *J Immunol*, 1995, 154(10):4950-5
69. Eidenschink Brodersen L., Menssen A.J., Wangen J.R. et al. Assessment of erythroid dysplasia by "difference from normal" in routine clinical flow cytometry workup, *Cytometry B Clin Cytom*, 2015; 88(2):125-135. doi:10.1002/cyto.b.21199
70. Elahi S., Ertelt J.M. et al. Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection, *Nature*, 2013, 504, 158–162
71. Fan X., Peng H., Wang X., Sun Y. et al. Tumor-associated CD8+T cell tolerance induced by erythroid progenitor cells, *Front. Immunol*, 2024, 15:1381919 doi:10.3389/fimmu.2024.1381919
72. Farr L., Ghosh S. Role of MIF Cytokine/CD74 receptor pathway in protecting against injury and promoting repair, *Front Immunol*, 2020, 11: 1273
73. Foudi A, Jarrier P, Zhang Y, et al. Reduced retention of radioprotective hematopoietic cells within the bone marrow microenvironment in CXCR4<sup>-/-</sup> chimeric mice, *Blood*, 2006, 107(6), 2243-2251
74. Fournié J.-J., Poupot M. et al. The pro-tumorigenic il-33 involved in antitumor immunity: a yin and yang cytokine, *Front Immunol*, 2018, 9, 2506
75. Fu Y, Li Z, Lin W, et al. Extramedullary hematopoiesis contributes to enhanced erythropoiesis during pregnancy via TGF- $\beta$  signaling. *Front Immunol.* 2023;14:1295717 doi:10.3389/fimmu.2023.1295717
76. Fujiwara Y., Browne C.P. et al. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(22), 12355-8

77. Gautam D.K., Chimata A.V., Gutti R.K., Paddibhatla I. Comparative hematopoiesis and signal transduction in model organisms. *J Cell Physiol.* 2021, 236: 5592–5619. doi.org/10.1002/jcp.30287
78. Gomez-Lopez N., Romero R., Arenas-Hernandez M. et al. In vivo T-cell activation by a monoclonal  $\alpha$ CD3 $\epsilon$  antibody induces preterm labor and birth, *Am J Reprod Immunol*, 2016, 76(5), 386-390 doi.org/10.1111/aji.12562
79. Goswami R., Kaplan M. et al. A brief history of IL-9, *J Immunol*, 2011, 186(6), 3283-8
80. Görgülügil GZ, Uğur Kurtoğlu A, Uğur S, Kurtoğlu E. Importance of CD71+ Erythrocyte Cell Levels in Prognosis in Patients With  $\beta$ -Thalassemia. *J Clin Lab Anal*, 2024, 38(11-12):e25084. doi:10.1002/jcla.25084
81. Gorman, J.V., Colgan, J.D. Regulation of T cell responses by the receptor molecule Tim-3, *Immunol Res*, 2014, 59, 56–65 doi.org/10.1007/s12026-014-8524-1
82. Graham G.J., Wright E.G., Hewick R., et al. Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation, *Nature*, 1990; 344(6265): 442-444 doi:10.1038/344442a0
83. Greenwald A., Licht T., Grunewald M. et al. VEGF expands erythropoiesis via hypoxia-independent induction of erythropoietin in noncanonical perivascular stromal cells, *J Exp Med*, 2019, 216(1), 215-230 doi: 10.1084/jem.20180752
84. Grzywa T.M., Sosnowska A. et al. Myeloid cell-derived arginase in cancer immune response, *Frontiers in Immunology*, 2020, p. 11
85. Grzywa T.M., Nowis D., Golab J. The role of CD71+ erythroid cells in the regulation of the immune response, *Pharmacology & Therapeutics*, 2021, 228, pp. 107927
86. Gutiérrez L., Lindeboom F. et al. Homotypic signalling regulates Gata1 activity in the erythroblastic island, *Development*, 2004, 131(13), 3183-93
87. Han Y., Liu Q. et al. Tumor-induced generation of splenic erythroblast-like ter-cells promotes tumor progression, *Cell*, 2018, 173, 634-48

- 88.Hara A, Niwa M, Noguchi K, et al. Galectin-3 as a Next-Generation Biomarker for Detecting Early Stage of Various Diseases. *Biomolecules*. 2020;10(3):389. doi:10.3390/biom10030389
- 89.Hatzfeld J., Li M.L., Brown E.L., Sookdeo H. et al. Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor beta 1 or Rb oligonucleotides, *J Exp Med* 1991, 174 (4): 925–929 doi.org/10.1084/jem.174.4.925
- 90.Hedley B.D., Allan A.L., Xenocostas A. The role of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents in tumor progression, *Clin Cancer Res*, 2011; 17(20):6373-6380. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2577
- 91.Hermine O., Arlet J.B., Ribeil J.A., Guillerme F., Vandekerckhove J., Courtois G. HSP70 un régulateur de l'érythropoïèse qui détermine le destin des érythroblastes entre mort et différenciation, *Transfus Clin Biol*, 2013; 20(2):144-147. doi:10.1016/j.tracli.2013.03.005
- 92.Hu Z, Lancaster JN, Sasiponganan C, Ehrlich LI. CCR4 promotes medullary entry and thymocyte-dendritic cell interactions required for central tolerance, *J Exp Med*. 2015, 212(11), 1947-1965
- 93.Hu S, Yang K, Yang J, Li M, Xiong N. Critical roles of chemokine receptor CCR10 in regulating memory IgA responses in intestines, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(45), E1035-E1044
- 94.Jacobsen R.N. et al. Mobilization with granulocyte colony-stimulating factor blocks medullar erythropoiesis by depleting F4/80(+)VCAM1(+)CD169(+)ER-HR3(+)Ly6G(+) erythroid island macrophages in the mouse. *Exp. Hematol*, 2014, 42, 547–61
- 95.Jingping Hu, Jing L. et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo, *Blood*, 2013, 121(16), 3246-53
- 96.Justyniarska M., Grzywa T.M., Nowis, D., Golab, J. Tumor immune evasion induced by dysregulation of erythroid progenitor cells development, *Cancers*, 2021, 13(4), 870

97. Kanemasa H, Ishimura M, Eguchi K, et al. The immunoregulatory function of peripheral blood CD71<sup>+</sup> erythroid cells in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Sci Rep.* 2021;11(1):14396. Published 2021 Jul 13. doi:10.1038/s41598-021-93831-3
98. Kang TG, Park HJ, Moon J, Lee JH, Ha SJ. Enriching CCL3 in the Tumor Microenvironment Facilitates T cell Responses and Improves the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy, *Immune Netw*, 2021, 21(3), e23
99. Karsten E., Breen E., Herbert B.R. Red blood cells are dynamic reservoirs of cytokines, *Scientific Reports*, 2018, 8, p. 3101
100. Kedia-Mehta N., Finlay D.K. Competition for nutrients and its role in controlling immune responses, *Nature Communications*, 2019, 10, p. 2123
101. Kojima S, Yoshida T, Sasaki J, et al. Induction of hyperchromic microcytic anaemia by repeated oral administration of methotrexate in rats. *J Toxicol Sci.* 2012; 37(5):957-968. doi:10.2131/jts.37.957
102. Kolbus A., Blazquez-Domingo M. et al. Cooperative signaling between cytokine receptors and the glucocorticoid receptor in the expansion of erythroid progenitors: Molecular analysis by expression profiling, *Blood*, 2003, 102, 3136-3146
103. Kolinsky M., Zhu X., Chua N., et al. Combined histone deacetylase and PD-L1 inhibition is safe and efficacious for the treatment of virus-associated cancers: results of a phase II clinical trial, *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2024, 12 doi: 10.1136/jitc-2024-SITC2024.0617
104. Kościuczuk, E.M., Lisowski, P., Jarczak, J. et al. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep* 39, 10957–10970 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1997-x>
105. Kowanetz M, Wu X, Lee J, et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> granulocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107(50), 21248-21255
106. Krop J., Heidt S. et al. Regulatory T cells in pregnancy: it is not all about FoxP3, *Front Immunol*, 2020, 11, 1182

107. Kut C., Gabhann F.M., Popel A.S. Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer, *Br J Cancer*, 2007, 97(7), 978-85
108. Lande, R., Botti, E., Jandus, C. et al. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nat Commun* 5, 5621 (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms6621>
109. Lanot R., Zachary, D., Holder, F., & Meister, M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*, *Developmental Biology*, 2001, 230, 243–257 [doi.org/10.1006/dbio.2000.0123](https://doi.org/10.1006/dbio.2000.0123)
110. Leberbauer C., Boulme F. et al. Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors, *Blood*, 2005, 105, 85-94
111. Lenard A, Alghisi E, Daff H, Donzelli M, McGinnis C, Lengerke C. Using zebrafish to model erythroid lineage toxicity and regeneration. *Haematologica*. 2016;101(5):e164-e167. doi:10.3324/haematol.2016.142562
112. Libregts S., Gutiérrez L. et al. Chronic IFN- $\gamma$  production in mice induces anemia by reducing erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis, *Blood*, 2011, 118(9), 2578-88
113. Lifshitz L., Prutchi-Sagiv S. et al. Non-erythroid activities of erythropoietin: Functional effects on murine dendritic cells, *Mol Immunol*, 2009, 46(4), 713-21
114. Liu L, Yu Z, Cheng H, et al. Multiple myeloma hinders erythropoiesis and causes anaemia owing to high levels of CCL3 in the bone marrow microenvironment, *Sci Rep*, 2020; 10(1):20508. doi:10.1038/s41598-020-77450-y
115. Long H., Jia Q., Wang L. et al. Tumor-induced erythroid precursor-differentiated myeloid cells mediate immunosuppression and curtail anti-PD-1/PD-L1 treatment efficacy, *Cancer Cell*, 2022; 40(6):674-693.e7. doi:10.1016/j.ccell.2022.04.018
116. López-Lago MA, Posner S, Thodima VJ, Molina AM, Motzer RJ, Chaganti RS. Neutrophil chemokines secreted by tumor cells mount a lung antimetastatic

- response during renal cell carcinoma progression, *Oncogene*, 2013, 32(14), 1752-60
117. Macario E.C., Macario A.J. A new kind of immunosuppression associated with erythropoiesis. *Immunol. Lett.* 1979; 1 (1): 23-6
118. Macario A.J., Conway de Macario E, Dugan C.B. Erythroblasts can generate immunosuppression in vivo, *Medicina (B Aires)*, 1981, 41, Suppl:83-90
119. Machado C.M.L., Andrade L.N.S., Teixeira V.R., Costa F.F., Melo C.M., dos Santos S.N., Nonogaki S., Liu F.T., Bernardes E.S., Camargo A.A., et al. Galectin-3 disruption impaired tumoral angiogenesis by reducing VEGF secretion from TGF $\beta$ 1-induced macrophages. *Cancer Med.* 2014;3:201–214. doi: 10.1002/cam4.173
120. McKim D.B., Yin W., Wang Y. et al. Social stress mobilizes hematopoietic stem cells to establish persistent splenic myelopoiesis, *Cell Rep*, 2018, 25(9), 2552–2562.e3
121. Malik J., Kim A.R., Tyre K.A., Cherukuri A.R., Palis J. Erythropoietin critically regulates the terminal maturation of murine and human primitive erythroblasts, *Haematologica*, 2013; 98(11):1778-1787. doi:10.3324/haematol.2013.087361
122. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*. 2001;97(10):3075-3085. doi:10.1182/blood.v97.10.3075
123. Mashhour S., Koleva P., Huynh M. et al. Sex matters: physiological abundance of immuno-regulatory CD71+ erythroid cells impair immunity in females, *Front Immunol*, 2021, 12: 705197
124. Manso B., Krull J. et al. Chronic lymphocytic leukemia B-cell-derived TNF $\alpha$  impairs bone marrow myelopoiesis, *iScience*, 2020, 24(1), 1019-94

125. Matsushima T., Nakashima M., Oshima K. et al. Receptor binding cancer antigen expressed on SiSo cells, a novel regulator of apoptosis of erythroid progenitor cells, *Blood*, 2001, 98, 313–321
126. Mayer B., Németh K., Krepuska M. et al. Vasopressin stimulates the proliferation and differentiation of red blood cell precursors and improves recovery from anemia, *Sci Transl Med*, 2017, 9(418)
127. Miller D., Romero R., Unkel R. et al. CD71+ erythroid cells from neonates born to women with preterm labor regulate cytokine and cellular responses, *J Leukoc Biol*, 2018, 103(4), 761–775 doi.org/10.1002/JLB.5A0717-291RRR
128. Monette F..C, LoBue J., Gordon A.S., Alexander P.Jr, Chan P.C. Erythropoiesis in the rat: differential rates of DNA synthesis and cell proliferation, *Science*, 1968; 162(3858):1132-1134.  
doi:10.1126/science.162.3858.1132
129. Montel-Hagen A., Sitbon M., Taylor N. Erythroid glucose transporters, *Current Opinion in Hematology*, 2009, 16, 165-172
130. Muta K., Krantz S.B., Bondurant M.C, Dai C.H. Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation, *Blood*, 1995, 86, 572-580
131. Nazarov K., Perik-Zavodskii R., Perik-Zavodskaia O. et al. Murine placental erythroid cells are mainly represented by CD45+ immunosuppressive erythroid cells and secrete CXCL1, CCL2, CCL3 and CCL4 Chemokines, *Int J Mol Sci*, 2023; 24(9):8130 doi:10.3390/ijms24098130
132. Nemeth E., Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin, *Annu Rev Nutr*, 2006, 26, 323–342
133. Niho Y., Asano Y. Fas/Fas ligand and hematopoietic progenitor cells, *Curr Opin Hematol*, 1998, 5(3), 163-5
134. Niedbala W., Wei X.Q. et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells, *Europ Jour of Immunology*, 2007, 37(11), 3021–29

135. Niu C, Zhang J. Immunoregulation role of the erythroid cells. *Front Immunol.* 2024;15:1466669. doi:10.3389/fimmu.2024.1466669
136. Norton M. T., Fortner K.A. et al. Pregnancy alters the proliferation and apoptosis of mouse splenic erythroid lineage cells and leukocytes, *Biol Reprod*, 2009, 81(3), 457-64
137. Oguro H., McDonald J.G. et al. 27-Hydroxycholesterol induces hematopoietic stem cell mobilization and extramedullary hematopoiesis during pregnancy, *J Clin Invest*, 2017, 127(9), 3392-3401
138. Ohl L, Henning G, Krautwald S, et al. Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J Exp Med.* 2003;197(9):1199-1204. doi:10.1084/jem.20030169
139. Palis J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front Physiol*, 2014, 5:3
140. Papadaki HA, Kritikos HD, Valatas V, Boumpas DT, Eliopoulos GD. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Blood.* 2002;100(2):474-482. doi:10.1182/blood-2002-01-0136
141. Paulson R., Baiye R. et al. Stress erythropoiesis is a key inflammatory response, *Cells*, 2020, 9(3), 634 doi:10.3390/cells9030634
142. Peng L., Shan-jun Z. et al. Th2 lymphocytes migrating to the bone marrow under high-altitude hypoxia promote erythropoiesis via activin A and interleukin-9, *Exp Hematol*, 2014, 42(9):804-15
143. Perik-Zavodskii R., Perik-Zavodskaya O., Shevchenko Y., Denisova V., Nazarov K., Obleuhova I., Zaitsev K., Sennikov S. Immune Transcriptome and Secretome Differ between Human CD71+ Erythroid Cells from Adult Bone Marrow and Fetal Liver Parenchyma, *Genes (Basel)*, 2022, 13(8):1333. doi: 10.3390/genes13081333.
144. Perik-Zavodskii R., Perik-Zavodskaya O., Shevchenko J., Denisova V., Alrhoun S., Volynets M., Tereshchenko V., Zaitsev K., Sennikov S. Immune

- transcriptome study of human nucleated erythroid cells from different tissues by single-cell RNA-sequencing, *Cells*, 2022, 11(22):3537
145. Perik-Zavodskii R., Perik-Zavodskaia O., Alrhoun S., et al. Single-cell multi-omics reveal stage of differentiation and trajectory-dependent immunity-related gene expression patterns in human erythroid cells, *Front Immunol*, 2024; 15:1431303 doi:10.3389/fimmu.2024.1431303
146. Perik-Zavodskii R, Perik-Zavodskaia O, Shevchenko J, et al. A subpopulation of human bone marrow erythroid cells displays a myeloid gene expression signature similar to that of classic monocytes, *PLoS One*. 2024; 19(7):e0305816 doi:10.1371/journal.pone.0305816
147. Perik-Zavodskii R, Perik-Zavodskaia O, Shevchenko J, Nazarov K et al. Human and mouse bone marrow CD45<sup>+</sup> erythroid cells have a constitutive expression of antibacterial immune response signature genes, *Biomedicines*. 2025; 13(5):1218. doi.org/10.3390/biomedicines13051218
148. Perry J.M, Harandi O.F., Paulson R.F. BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors, *Blood*, 2007, 109(10), 4494-502
149. Pingel S., Baker M., Turner M., Holmes N., Alexander D.R. The CD45 tyrosine phosphatase regulates CD3-induced signal transduction and T cell development in recombinase-deficient mice: restoration of pre-TCR function by active p56(lck), *Eur J Immunol*, 1999, 29(8): 2376-2384. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199908)29:08<2376::AID-IMMU2376>3.0.CO;2-7
150. Proietto A.I., O'Keeffe M., Gartlan K., et al. Differential production of inflammatory chemokines by murine dendritic cell subsets. *Immunobiology*. 2004;209(1-2):163-172. doi:10.1016/j.imbio.2004.03.002
151. Qin W., Hu L. et al. The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer *Frontiers in Immunology*, 2019, 10, 2298

152. Rahmati A, Bigam S, Elahi S. Galectin-9 promotes natural killer cells activity via interaction with CD44. *Front Immunol.* 2023;14:1131379. doi:10.3389/fimmu.2023.1131379
153. Rettig MP, Ansstas G, DiPersio JF. Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells using inhibitors of CXCR4 and VLA-4. *Leukemia.* 2012;26(1):34-53
154. Rincon M.R., Oppenheimer K., Bonney E.A. Selective accumulation of Th2-skewing immature erythroid cells in developing neonatal mouse spleen, *International Journal of Biological Sciences*, 2012, 8, 719-730
155. Roca H, Varsos ZS, Sud S, Craig MJ, Ying C, Pienta KJ. CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization. *J Biol Chem.* (2009) 284:34342–54. doi: 10.1074/jbc.M109.042671
156. Rodriguez P.C., Zea A.H. et al. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine, *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277, 21123-21129
157. Rodriguez P.C., Quiceno D.G. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression, *Blood*, 2007, 109, 1568-1573
158. Roseblatt M., Vuilett-Gaugler M.H. et al.. Coexpression of two fibronectin receptors, VLA-4 and VLA-5 by immature human erythroblastic precursor cells, *J Clin Invest*, 1991, 87, 6–11
159. Ross JL, Chen Z, Herting CJ, et al. Platelet-derived growth factor beta is a potent inflammatory driver in paediatric high-grade glioma. *Brain.* 2021;144(1):53-69
160. Sano Y., Yoshida T. et al. Multi-organ signaling mobilizes tumor-associated erythroid cells expressing immune checkpoint molecules, *Molecular Cancer Research*, 2021, 19, 507-15
161. Sawada K., Krantz S.B. et al. Human colony-forming units-erythroid do not require accessory cells, but do require direct interaction with insulin-like growth factor I and/or insulin for erythroid development, *J Clin Invest*, 1989, 83, 1701–1709

- 162.Scandura J.M., Boccuni P., Massagué J., Nimer S.D. Transforming growth factor  $\beta$ -induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 42, 15231-15236, doi.org/10.1073/pnas.0406771101
- 163.Schanz O., Cornez I. et al. Tumor rejection in Cblb  $-/-$  mice depends on IL-9 and Th9 cells, *J Immunother Cancer*, 2021, 9(7):e002889
- 164.Seki M, Oomizu S, Sakata KM, et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis. *Clin Immunol*. 2008; 127(1): 78-88.
- 165.Sehrawat S, Reddy PB, Rajasagi N, Suryawanshi A, Hirashima M, Rouse BT. Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8 T cell response. *PLoS Pathog*. 2010; 6(5):e1000882.
- 166.Sennikov S.V., Eremina L.V. et al. Cytokine gene expression in erythroid cells, *European Cytokine Network*, 1996, 7, 771-774
- 167.Sennikov SV, Krysov SV, Silkov AN, Injelevskaya TV, Kozlov VA. Production of IL-10, TNF-alpha, IFN-gamma, TGF-beta1 by different populations of erythroid cells derived from human embryonal liver, *Cytokine*, 2002, 17(4), 221-225 doi:10.1006/cyto.2001.0975
- 168.Sennikov S.V., Injelevskaya T.V. et al. Production of hemo- and immunoregulatory cytokines by erythroblast antigen<sup>+</sup> and glycoporin A<sup>+</sup> cells from human bone marrow, *BMC Cell Biology*, 2004, 5, p.39
- 169.Sennikov S.V., Krysov S.V. et al. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver, *European Cytokine Network*, 2001, 12, 274-279
- 170.Sennikov SV, Eremina LV, Injelevskaya TV, Krysov SV, Silkov AN, Kozlov VA. Cytokine-Synthesizing Activity of Erythroid Cells. *Russ J Immunol*. 2001;6(2):193-202.
- 171.Serikov V., Kuypers F. Human placenta as a source of hematopoietic stem cells, *Genes & Cells*, 2008, 3(2), 51-56 doi: 10.23868/gc158689

172. Shachar I., Haran M. The secret second life of an innocent chaperone: the story of CD74 and B cell/chronic lymphocytic leukemia cell survival, *Leuk Lymphoma*, 2011, 52(8):1446-54
173. Shahbaz S., Bozorgmehr N., Koleva P. et al. CD71+VISTA+ erythroid cells promote the development and function of regulatory T cells through TGF- $\beta$ , *PLoS Biol*, 2018, 16(12): e2006649 doi:10.1371/journal.pbio.2006649
174. Shahbaz S, Dunsmore G, Koleva P, Xu L, Houston S, Elahi S. Galectin-9 and VISTA expression define terminally exhausted T cells in HIV-1 infection. *J Immunol*. 2020; 204(9): 2474-2491.
175. Shahbaz S., L.Xu, M.Osman et al. Erythroid precursors and progenitors suppress adaptive immunity and get invaded by SARS-CoV-2, *Stem Cell Reports*, 2021, 16(5), 1165–1181
176. Shen Y., Wang D., Zhao J., Chen X. Fish red blood cells express immune genes and responses, *Aquaculture and fisheries*, 2018, 3(1), 14-21
177. Shevach E.M., Tran D.Q., Davidson T.S., Andersson J. The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. *Eur J Immunol*. 2008;38(4):915-917. doi:10.1002/eji.200738111
178. Shevchenko JA, Nazarov KV, Alshevskaya AA, Sennikov SV. Erythroid cells as full participants in the tumor microenvironment, *Int J Mol Sci*, 2023;24(20):15141. doi:10.3390/ijms242015141
179. Shevchenko J.A., Perik-Zavodskii R.Y., Nazarov K.V., et al. Immunoregulatory properties of erythroid nucleated cells induced from CD34+ progenitors from bone marrow, *PLoS One*, 2023; 18(6):e0287793 doi:10.1371/journal.pone.0287793
180. Shi Z.R., Tan G.Z., Meng Z. et al. Association of anti-acidic ribosomal protein P0 and anti-galectin 3 antibodies with the development of skin lesions in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67:193–203. doi: 10.1002/art.38891.
181. Shim Y.A., Campbell T, Weliwitigoda A, Dosanjh M, Johnson P. Regulation of CD71+TER119+ erythroid progenitor cells by CD45, *Exp Hematol*, 2020; 86:53-66.e1. doi:10.1016/j.exphem.2020.05.005

182. Shim Y.A., Weliwitigoda A. et al. Splenic erythroid progenitors decrease TNF $\alpha$  production by macrophages and reduce systemic inflammation in a mouse model of T cell-induced colitis, *European Journal of Immunology*, 2021, 51, 567-79
183. Sibon D., Coman T. et al. Enhanced renewal of erythroid progenitors in myelodysplastic anemia by peripheral serotonin, *Cell Reports*, 2019, 26,
184. Sierra-Filardi E, Nieto C, Dominguez-Soto A, Barroso R, Sanchez-Mateos P, Puig-Kroger A, et al. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J Immunol*, 2014, 192:3858–67. doi: 10.4049/jimmunol.1302821
185. Simamura E., Arikawa T. et al. Melanocortins contribute to sequential differentiation and enucleation of human erythroblasts via melanocortin receptors 1, 2 and 5, *PLoS ONE*, 2015, 10(4)
186. Socolovsky M. Molecular insights into stress erythropoiesis, *Curr Opin Hematol*, 2007,14(3), 215-24
187. Sonoda Y., Kimura T. et al. Actions of human interleukin-4/B-cell stimulatory factor-1 on proliferation and differentiation of enriched hematopoietic progenitor cells in culture, *Blood*, 1997, 96 (4), 781-9
188. Sosnowska A., Grzywa T.M., Rydzynska Z., Lazniewski M. et al. Potent but transient immunosuppression of T-cells is a general feature of CD71+ erythroid cells, *Commun Biol*, 2021, 4: 1384
189. Star R.A., Rajora N. et al. Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by alpha-melanocyte-stimulating hormone, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92, 8016–20
190. Stavarsky R.J., Byun D.K., Georger M.A., et al. The Chemokine CCL3 regulates myeloid differentiation and hematopoietic stem cell numbers, *Sci Rep*, 2018; 8(1):14691 doi:10.1038/s41598-018-32978-y
191. Suzuki K, Hayano Y, Nakai A, Furuta F, Noda M. Adrenergic control of the adaptive immune response by diurnal lymphocyte recirculation through lymph nodes. *J Exp Med*. 2016;213(12):2567-2574. doi:10.1084/jem.20160723

192. Tatsuo K., Koichi I. et al. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage, *British Journal of Hematology*, 2000, 109(2), 280-87
193. Temchura VV, Sennikov SV, Trufakin VA, Kozlov VA. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor produced by intestinal epithelial cells on functional activity of hemopoietic stem cells. *Bull Exp Biol Med*. 2002;134(6):548-550. doi:10.1023/a:1022952810245
194. Thijssen V.L., Heusschen R., Caers J., Griffioen A.W. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. 2015;1855:235–247. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.03.003.
195. Tordjman R., Delaire S., Lemarchandel V. Erythroblasts are a source of angiogenic factors, *Blood*, 2001, 97
196. Tsuda S., Nakashima A., Shima T., Saito S. New paradigm in the role of regulatory t cells during pregnancy, *Front Immunol*, 2019, 10, pp.573
197. Tsukamoto T. The expression of Galectin-9 correlates with mTOR and AMPK in murine colony-forming erythroid progenitors. *Eur J Haematol*. 2024;113(4):416-425. doi:10.1111/ejh.14249
198. Valent P., Büsche G., Theurl I., et al. Normal and pathological erythropoiesis in adults: from gene regulation to targeted treatment concepts, *Haematologica*, 2018; 103(10):1593-1603. doi:10.3324/haematol.2018.192518
199. Varga E., Hansen M. et al. Erythropoiesis and megakaryopoiesis in a dish, *Cell Culture*, 2019
200. Vlisidou I. and Wood W. *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. *FEBS J*, 2015, 282: 1368-1382. doi.org/10.1111/febs.13235
201. von Lindern M., Zauner W. et al. The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro, *Blood*, 1999, 94, 550-559
202. von Lindern M, Schmidt U, Beug H. Control of erythropoiesis by erythropoietin and stem cell factor: a novel role for Bruton's tyrosine kinase. *Cell Cycle*. 2004;3(7):876-879.

203. Wang T.F., Lin G.L., Chu, S.C. et al. AQP0 is a novel surface marker for deciphering abnormal erythropoiesis, *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12, 274
204. Wang Y., Gao A. et al. Leukemia cell infiltration causes defective erythropoiesis partially through MIP-1 $\alpha$ /CCL3, *Leukemia*, 2016, 30(9), 1897-908
205. Wang F, Wan L, Zhang C, Zheng X, Li J, Chen ZK. Tim-3-Galectin-9 pathway involves the suppression induced by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Immunobiology*. 2009; 214(5): 342-349.
206. Weber M.D., McKim D.B., Niraula A., et al. Microglial recruitment of IL-1 $\beta$ -producing monocytes to brain endothelium causes stress-induced anxiety, *Mol Psychiatry*, 2018, 23, 1421–1431
207. Weiqiang J., Xing G. et al. G-CSF shifts erythropoiesis from bone marrow into spleen in the setting of systemic inflammation, *Life Sci Alliance*, 2020, 4(1):e202000737
208. Wen JY, Li X, Chen JN, et al. CD45<sup>-</sup> erythroid progenitor cells promote lymph node metastasis in gastric cancer by inducing a hybrid epithelial/mesenchymal state in lymphatic endothelial cells. *Gastric Cancer*. 2023;26(6):918-933. doi:10.1007/s10120-023-01425-x
209. Whyatt D., Lindeboom F. et al. An intrinsic but cell-nonautonomous defect in GATA-1-overexpressing mouse erythroid cells, *Nature*, 2000, 406(6795), 519-24
210. Wolf Y, Anderson AC, Kuchroo VK. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nat Rev Immunol*. 2020; 20(3): 173-185. doi:10.1038/s41577-019-0224-6
211. Wu C, Thalhamer T, Franca RF, et al. Galectin-9-CD44 interaction enhances stability and function of adaptive regulatory T cells. *Immunity*. 2014; 41(2): 270-282.
212. Xiuli An, Schulz V.P. et al. Human and murine erythropoiesis *Curr Opin Hematol*, 2015, 22(3), 206–211
213. Xu C, He J, Wang H, et al. Single-cell transcriptomic analysis identifies an immune-prone population in erythroid precursors during human ontogenesis. *Nat Immunol*. 2022;23(7):1109-1120. doi:10.1038/s41590-022-01245-8

214. Yang R, Sun L, Li CF, et al. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nat Commun.* 2021; 12(1): 832.
215. Yang Z, Wang Z, Wu L, et al. B lymphocytes transdifferentiate into immunosuppressive erythroblast-like cells. *Front Immunol.* 2023;14:1202943. doi:10.3389/fimmu.2023.1202943
216. Ying L., Pop R., Sadegh C. et al. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo, *Blood*, 2006, 108 (1), 123–133
217. Youn J.I., Kumar V., Collazo M. et al. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer, *Nat Immunol*, 2013; 14(3):211-220. doi:10.1038/ni.2526
218. Zamai L., Secchiero P., Pierpaoli S. et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis, *Blood*, 2000, 95(12), 3716-24
219. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity, *Journal of Leukocyte Biology*, 2004, 75(1), 39–48, <https://doi.org/10.1189/jlb.0403147>
220. Zhang, N., Wu, HS., Pang, XQ. et al. CD45+ erythroid progenitor cells as potential biomarkers for disease progression in hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure, *BMC Gastroenterol*, 2025, 25, 405. <https://doi.org/10.1186/s12876-025-03995-9>
221. Zhang Y, Chen M, Chen C. Using the Zebrafish as a Genetic Model to Study Erythropoiesis. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19):10475. doi:10.3390/ijms221910475
222. Zhao L., He R. et al. Late-stage tumors induce anemia and immunosuppressive extramedullary erythroid progenitor cells, *Nat Med*, 2018, 24(10), 1536-1544 doi:10.1038/s41591-018-0205-5
223. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1245-1252. doi:10.1038/ni1271