

ПРОДУКЦИЯ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ ИНДУЦИРОВАННЫМИ ЭРИТРОБЛАСТАМИ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Назаров К.В.,
Перик-Заводский Р.Ю.,
Кузнецова М.С.,
Филиппова Ю.Г.,
Шевченко Ю.А.,
Денисова В.В.,
Силков А.Н.,
Сенников С.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Шевченко Юлия Александровна,
e-mail: shevcen@ngs.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Эритробласты костного мозга продуцируют широкий спектр цитокинов с противоположными биологическими эффектами. Это может быть связано с изменением спектра продукции иммунорегуляторных медиаторов в ходе дифференцировки и небольшими качественными и количественными различиями в спектре продуцируемых цитокинов на каждой стадии дифференцировки, которые могут иметь важное значение для регуляции гемо- и иммунопоэза.

Цель исследования. Изучить спектр продукции медиаторов эритробластами на разных этапах дифференцировки.

Методы. Из CD34+ клеток костного мозга здоровых доноров получали эритробласты в присутствии рекомбинантных цитокинов. Оценку фенотипа проводили с помощью проточной цитометрии по эритроидным (CD45, CD71, CD235a, CD44) и лимфоидным маркерам (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19). Блокировку дифференцировки эритробластов на разных этапах осуществляли с помощью специфических блокирующих моноклональных антител к меланокортиновым рецепторам (MCR, melanocortin receptors) 1-го, 2-го, 5-го типов. Анализ цитокинов в кондиционных средах эритробластов проводили с использованием панели Bio-Plex Pro Human Cytokine 48-Plex Screening Panel (Bio-Rad Laboratories, США). Продукцию цитокинов анализировали с помощью онлайн-инструмента CytokineExplore.

Результаты. Полученные эритробласты по маркеру CD45 делятся на позитивную и негативную популяции, несут маркеры эритроидных клеток CD71, CD235a и не экспрессируют линейные маркеры лимфоидных клеток. При блокировке MCR 1-го типа преобладают полихроматофильные эритробласты, при блокировке MCR 2-го типа – базофильные эритробласты, а при блокировке MCR 5-го типа накапливаются ортохроматофильные эритробласты. По продукции цитокинов показано, что при использовании любого из блокирующих антител мы получаем клетки, отличающиеся качественно и количественно по ряду медиаторов от исходной популяции индуцированных эритробластов.

Заключение. Таким образом, мы показали качественные и количественные различия в продукции медиаторов эритробластами в зависимости от стадии дифференцировки, что может приводить к отличающимся регуляторным эффектам.

Ключевые слова: костный мозг, эритробласты, меланокортиновые рецепторы, цитокины, дифференцировка, иммуномодулирующие функции

Для цитирования: Назаров К.В., Перик-Заводский Р.Ю., Кузнецова М.С., Филиппова Ю.Г., Шевченко Ю.А., Денисова В.В., Силков А.Н., Сенников С.В. Продукция иммунорегуляторных молекул индуцированными эритробластами на различных стадиях дифференцировки. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-1): 179-187. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-1.19

Статья поступила: 02.06.2022

Статья принята: 07.09.2022

Статья опубликована: 08.12.2022

PRODUCTION OF IMMUNOREGULATORY MOLECULES BY INDUCED ERYTHROBLASTS AT VARIOUS STAGES OF CELL DIFFERENTIATION

Nazarov K.V.,
Perik-Zavodsky R.Yu.,
Kuznetsova M.S.,
Philippova Yu.G.,
Shevchenko Yu.A.,
Denisova V.V.,
Silkov A.N.,
Sennikov S.V.

Research Institute of Fundamental
and Clinical Immunology
(Yadrintsevskaya str. 14, Novosibirsk
630099, Russian Federation)

Corresponding author:
Yulia A. Shevchenko,
e-mail: shevcen@ngs.ru

ABSTRACT

Introduction. Bone marrow erythroblasts produce a wide range of cytokines with opposite biological effects. This may be due to a change in the spectrum of production of immunoregulatory mediators during differentiation and small qualitative and quantitative differences in the spectrum of cytokines produced at each stage of differentiation, which may be important for the regulation of hemo- and immunopoiesis.

The aim. To study the spectrum of production of mediators by erythroblasts at different stages of differentiation.

Methods. Erythroblasts were obtained from CD34+ bone marrow cells of healthy donors in the presence of recombinant cytokines. Phenotype assessment was performed using flow cytometry for erythroid (CD45, CD71, CD235a, CD44) and lymphoid markers (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19). Blocking of erythroblast differentiation at different stages was carried out using specific blocking monoclonal antibodies to melanocortin receptors (MCR) of types 1, 2 and 5. Cytokine analysis in conditioned erythroblast media was performed using the Bio-Plex Pro Human Cytokine 48-Plex Screening Panel (Bio-Rad Laboratories, USA). Cytokine production was analyzed using the CytokineExplore online tool.

Results. The resulting erythroblasts are divided into positive and negative populations according to the CD45 marker, carry markers of erythroid cells CD71, CD235a and do not express linear markers of lymphoid cells. In type 1 MCR blockage, polychromatophilic erythroblasts predominate, in type 2 MCR blockage, basophilic erythroblasts predominate, and in type 5 MCR blockage, orthochromatophilic erythroblasts accumulate. According to the production of cytokines, it was shown that when using any of the blocking antibodies, we obtain cells that differ qualitatively and quantitatively in a number of mediators from the initial population of induced erythroblasts.

Conclusion. Thus, we have shown qualitative and quantitative differences in the production of mediators by erythroblasts depending on the stage of differentiation, which can lead to different regulatory effects.

Key words: bone marrow, erythroblasts, melanocortin receptors, cytokines, differentiation, immunomodulatory functions

Received: 02.06.2022
Accepted: 07.09.2022
Published: 08.12.2022

For citation: Nazarov K.V., Perik-Zavodsky R.Yu., Kuznetsova M.S., Philippova Yu.G., Shevchenko Yu.A., Denisova V.V., Silkov A.N., Sennikov S.V. Production of immunoregulatory molecules by induced erythroblasts at various stages of cell differentiation. *Acta biomedica scientifica*. 2022; 7(5-1): 179-187. doi: 10.29413/ABS.2022-7.5-1.19

ВВЕДЕНИЕ

Основная функция эритроцитов заключается в транспорте кислорода; для незрелых ядросодержащих эритроидных клеток в последние годы описаны выраженные иммуномодулирующие функции [1]. Способность ядросодержащих эритроидных клеток ингибировать пролиферацию В-клеток и гуморальный иммунный ответ у мышей и у человека была показана в работах А.Ж. Масарго и соавт. (1981) и И.Г. Цырловой (1991) [2, 3]. Одним из возможных механизмов регуляторного воздействия, опосредованного эритроидными клетками в норме и при патологии, является секреция растворимых факторов. Эритроидные клетки костного мозга человека способны продуцировать интерлейкин (IL, interleukin) 1 β , IL-2, IL-4, IL-6, интерферон (IFN, interferon) γ , фактор некроза опухоли α (TNF- α , tumor necrosis factor α), трансформирующий фактор роста β (TGF- β , transforming growth factor β) и IL-10. Поскольку эритроидные клетки продуцируют цитокины с противоположными биологическими эффектами, то была выдвинута гипотеза, что спектр продукции цитокинов может зависеть от стадии развития эритроидной клетки [4–9]. Пропиомеланокортин и его производные (меланокортиновая система) являются регуляторами жизненно важных процессов гомеостаза и репродукции в организме человека [10]. В исследовании 2015 г. было показано наличие меланокортиновых рецепторов 1-го, 2-го и 5-го типов на эритробластах, которые запускают разные сигнальные пути в зависимости от стадии развития, что может влиять на их иммунорегуляторный потенциал. С помощью рецепторов 1-го и 2-го типов регулируется проведение сигнала от эритропоэтина, а активность рецептора 5-го типа нужна для конечных стадий дифференцировки эритробластов. Присутствие адреналокортикотропного гормона в культуральной среде во время культивирования эритробластов приводит к истощению ядросодержащих эритроидных клеток [11]. Таким образом, селективное подавление активности рецепторов к меланокортину может приводить к блоку эритроидной дифференцировки на разных этапах созревания эритроидных клеток, что позволяет изучить особенности их иммунорегуляторного потенциала на разных этапах дифференцировки. Мы предположили, что данную модель подавления активности рецепторов к меланокортинам можно применить для селекции функционально полноценных эритробластов на определенных стадиях развития и изучить особенности их иммунорегуляторного потенциала в будущем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Доноры

Забор костного мозга здоровых взрослых доноров был одобрен локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» на заседании № 129 от 17.02.2021 и проводился после подписания донором информированного согласия и сдачи общеклинических анализов (общий анализ крови, электрокардиограмма, отрицательный тест

на COVID-19). Средний возраст здоровых доноров костного мозга составлял $27,33 \pm 6,34$ года; в выборке представлены 3 мужчины и 3 женщины. Костный мозг был получен с помощью трепан-биопсии из подвздошной кости. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли стандартным методом на градиенте фикола-урографина. Для этого костный мозг разбавляли раствором Дюльбекко (Биолот, Россия) в соотношении 1:1, наслаивали на фикола-урографин (Панэко, Россия) в соотношении фикола:костный мозг, равном 1:3, и центрифугировали в течение 25 мин при 1300 об./мин. Клетки интерфазного кольца собирали и два раза отмывали раствором Дюльбекко.

Культивирование клеток

Из полученных МНК с помощью позитивной магнитной селекции выделяли с помощью набора CD34 MicroBeadkit Ultra Pure (Miltenyi Biotec, Германия) CD34+ клетки, которые далее были использованы для получения эритроидных клеток различных стадий дифференцировки. CD34+ клетки (1×10^5 кл./мл) культивировали в бессывороточной среде X-VIVO 15 (Lonza, Швейцария) с добавлением 25 нг/мл rh SCF (BioLegend, США), 50 нг/мл rh TPO (BioLegend, США), 50 нг/мл Flt3 ligand (Gibco, США), 100-кратной ростовой добавки селенит натрия-инсулин-трансферрин (Биолот, Россия) в течение 7 дней (фаза экспансии).

На следующем пассаже происходила дифференцировка клеток. Для этого клетки (2×10^5 кл./мл) культивировали с добавлением 3 МЕ/мл эритропоэтина (ФГУП «Государственный научноисследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА, Россия), 25 нг/мл SCF (BioLegend, США), 10 нг/мл rhIL-3 (BioLegend, США) и 10 нг/мл rh IL-6 (BioLegend, США) в течение 3 дней. Третий пассаж для созревания клеток проводили при культивировании 1×10^5 кл./мл в среде с добавлением эритропоэтина. Для получения эритробластов на различных стадиях дифференцировки в культуру были добавлены нейтрализующие антитела для меланокортиновых рецепторов анти-MC2R nAb (2,5 мкг/мл) (Invitrogen, США) для накопления эритробластов на базофильной стадии, анти-MC1R nAb (1,25 мкг/мл) (Abcam, Великобритания) – для накопления на полихроматофильной стадии, анти-MC5R nAb (1 мкг/мл) (Invitrogen, США) – для накопления на ортохроматофильной стадии [11].

Проточная цитофлуориметрия

Полученные клетки были проанализированы с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием маркеров CD45, CD71 и CD235a (BioLegend, США). Для определения маркеров лимфоидных клеток были использованы антитела к маркерам CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 (BioLegend, США). Для распределения по фазам развития эритроидных клеток был использован маркер CD44.

Анализ экспрессии цитокинов

Анализ цитокинов в кондиционных средах эритробластов после инкубации с антителами к меланокортиновым рецепторам проводили с использованием панели Bio-Plex Pro Human Cytokine 48-Plex Screening Panel (Bio-Rad Laboratories, США). 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 флу-

оресцентного сигнала. Полученные данные были окончательно обработаны с помощью программного обеспечения Bio-Plex Manager, версия 6.1 (Bio-Rad Laboratories, США) в соответствии с пятипараметрической аппроксимацией кривой и преобразованы в пикограммы на миллилитр.

Продукцию цитокинов анализировали с помощью онлайн-инструмента CytokineExplore (<http://al-saleh.cc/exabx.com/apps/cytokineexplore>). Статистическая обработка результатов для выявления различий между группами производилась при помощи программы GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., США). Для статистической проверки значимости различий между экспериментальными группами использовали критерий Фридмана с поправкой на множественные сравнения Dunn's. Статистически значимыми считаются результаты при $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и размаха квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Фенотипическая характеристика индуцированных эритроидных клеток

Фенотип полученных эритроидных клеток определяли с помощью маркеров CD45, CD71, CD235a. Показано, что полученные эритробласты по маркеру CD45 делятся на позитивную и негативную популяции (табл. 1). При этом как CD45-позитивные, так и CD45-негативные экспрессируют маркеры эритроидных клеток CD71, CD235a.

ТАБЛИЦА 1
СОДЕРЖАНИЕ CD45-ПОЗИТИВНЫХ И CD45-НЕГАТИВНЫХ ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ CD34+ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

Эритроидные клетки	Контроль	Anti-MCR-1	Anti-MCR-2	Anti-MCR-5
CD45-позитивные эритроидные клетки	24,27 ± 13,07	31,31 ± 12,08	31,31 ± 10,28	29,06 ± 15,66
CD45-негативные эритроидные клетки	52,59 ± 10,02	46,62 ± 9,99	48,31 ± 10,1	47,72 ± 7,61

Примечание. Данные представлены в виде среднего и ошибки среднего ($n = 6$). При этом как CD45-позитивные, так и CD45-негативные экспрессируют маркеры эритроидных клеток CD71, CD235a.

ТАБЛИЦА 2
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЭРИТРОБЛАСТОВ ПО СТАДИЯМ РАЗВИТИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА CD44 СРЕДИ ЕСТЕСТВЕННЫХ ЭРИТРОБЛАСТОВ И ЭРИТРОБЛАСТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ CD34+ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА, ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИМИ АНТИТЕЛАМИ К МЕЛАНКОРТИНОВЫМ РЕЦЕПТОРАМ

Эритробласты	D A				D B			
	Контроль	Anti-MCR-1	Anti-MCR-2	Anti-MCR-5	Контроль	Anti-MCR-1	Anti-MCR-2	Anti-MCR-5
Ортохроматофильные	27,391	5,510	9,096	37,4	21,841	17,346	20,045	44,876
Полихроматофильные	45,435	62,431	37,329	33,505	42,578	48,540	31,933	35,804
Базофильные	24,130	31,935	53,435	26,976	33,757	32,576	46,621	17,731

Примечание. Приведены примеры распределения эритробластов для двух доноров: D A – мужчина, 26 лет; D B – женщина, 40 лет.

Для определения возможности развития лимфоидного роста из CD34+ клеток мы определили экспрессию маркеров CD3, CD4, CD8, CD16, CD19. Показано, что полученные эритроидные клетки не экспрессируют линейные маркеры лимфоидных клеток. Для распределения по фазам развития эритроидных клеток был использован маркер CD44, который демонстрирует прогрессивное и резкое снижение от проэритробластов к ретикулоцитам [12].

Показано, что при использовании блокирующих антител к меланокортиновым рецепторам 1-го типа преобладают полихроматофильные эритробласты, при использовании блокирующих антител к меланокортиновым рецепторам 2-го типа накапливаются базофильные эритробласты, а при использовании блокирующих антител к меланокортиновым рецепторам 5-го типа – ортохроматофильные эритробласты (табл. 2).

Анализ продукции цитокинов

Продукция цитокинов в культуральных средах эритробластов была исследована с помощью панели Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Screening, 48-Plex (Bio-Rad Laboratories, США). Для выявления различий между продукцией цитокинов двумя группами эритробластов были использованы PLSD-анализ (частичный дискриминантный анализ методом наименьших квадратов) и график важности переменных при анализе двух групп, PCA (принцип главных компонент) – при анализе трёх и более групп [13]. Было показано, что точки данных, соответствующие исследуемым типам эритробластов, перекрываются, что говорит

TABLE 1
CONTENT OF CD45-POSITIVE AND CD45-NEGATIVE ERYTHROID CELLS DERIVED FROM BONE MARROW CD34+ CELLS

TABLE 2
DISTRIBUTION OF ERYTHROBLASTS BY STAGES OF DEVELOPMENT DEPENDING ON THE EXPRESSION OF THE CD44 MARKER AMONG NATURAL ERYTHROBLASTS AND ERYTHROBLASTS OBTAINED FROM BONE MARROW CD34+ CELLS AFTER TREATMENT WITH NEUTRALIZING ANTIBODIES TO MELANOCORTIN RECEPTORS

об их сходном цитокиновом профиле и единой природе полученных в экспериментальных условиях эритробластов (рис. 1). Затем мы провели попарное сравнение групп эритробластов для выявления индивидуальных различий и построили PLSDA-графики для всех типов эритробластов. Показано, что все типы эритробластов, полученных под действием антител к меланокортиновым рецепторам, отличаются от индуцированных эритробластов контрольной группы и между собой, т. е. при использовании любого из блокирующих антител мы получаем клетки, отличающиеся от исходной популяции индуцированных эритробластов (рис. 2). Эритробласты, полученные из CD34+ клеток костного мозга, секретируют все исследуемые цитокины (CTACK (cutaneous T-cell attracting chemokine), eotaxin, основной фактор роста фибробластов (basic FGF, basic fibroblast growth factor), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF, granulocyte colony stimulating factor), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor), GRO- α , фактор роста гепатоцитов (HGF, hepatocyte growth factor), IFN- α 2, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-2R α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-12 (p40), IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IP-10, LIF, MCP (monocyte chemoattractant protein) 1, MCP-3, макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF, macrophage colony stimulating factor), MIF (macrophage migration inhibitory factor), MIG (monokine induced by interferon- γ), MIP (macrophage inflammatory protein) 1 α , фактор роста нервов β (β -NGF nerve growth factor β), PDGF-BB (platelet derived growth factor BB), RANTES (regulated upon activation,

normal T cell expressed and presumably secreted), SCF (stem cell factor), SCGF- β (stem cell growth factor β), SDF-1 α (stromal cell-derived factor 1 α), TNF- α , TNF- β , TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor)).

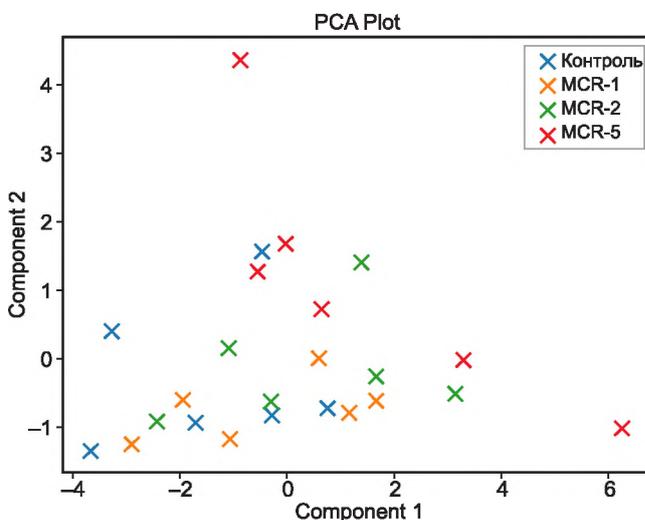


РИС. 1. График PCA данных по продукции цитокинов для индуцированных эритробластов костного мозга, полученных под действием антител к меланокортиновым рецепторам

FIG. 1. PCA plot of cytokine production data for induced bone marrow erythroblasts treated with anti-melanocortin receptor antibodies

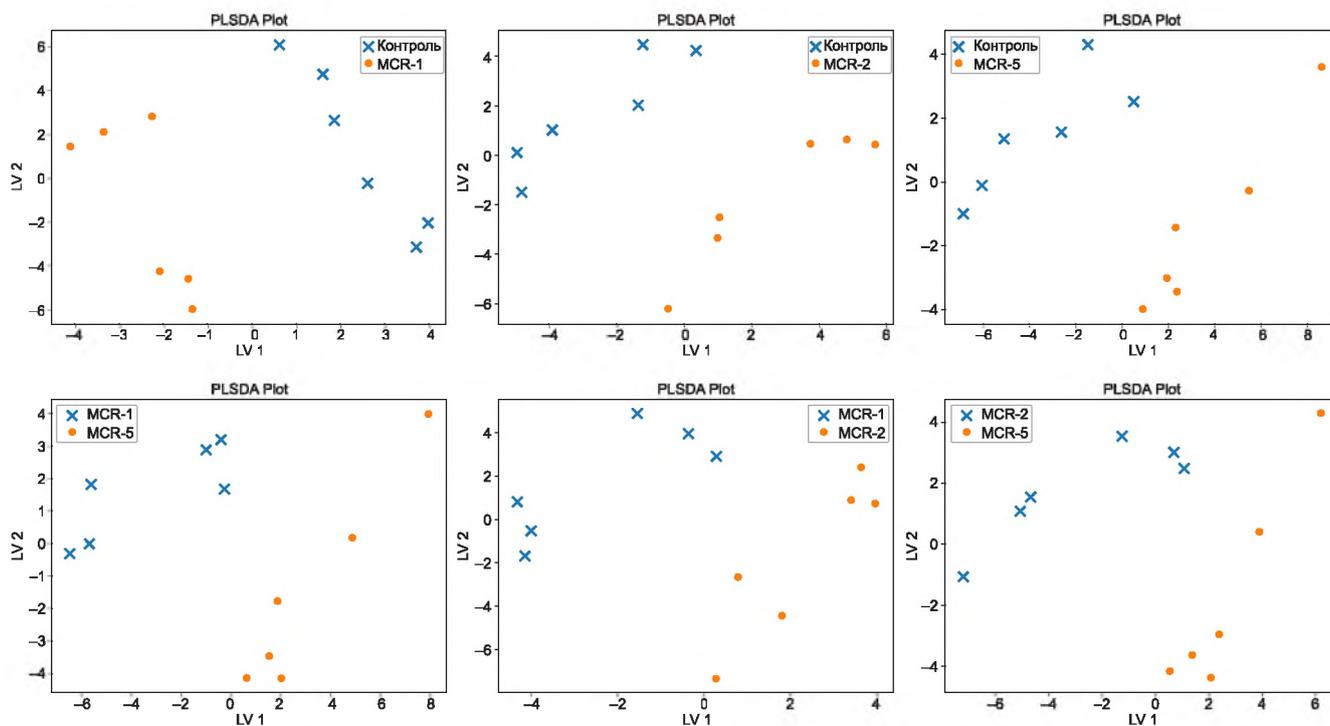


РИС. 2. График PLSD сравнения отдельных групп по продукции цитокинов для индуцированных эритробластов костного мозга, полученных под действием антител к меланокортиновым рецепторам

FIG. 2. PLSD plot of comparison of individual groups by cytokine production for induced bone marrow erythroblasts produced by anti-melanocortin receptor antibodies

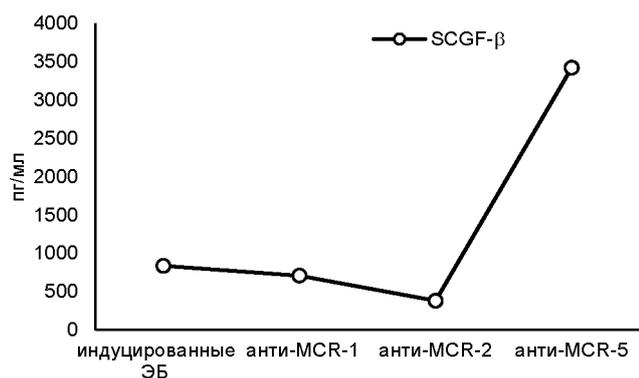
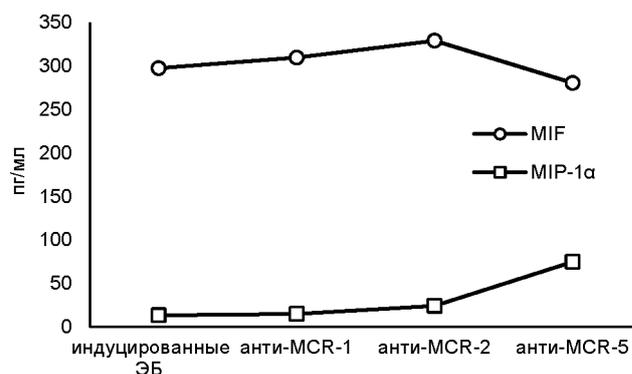
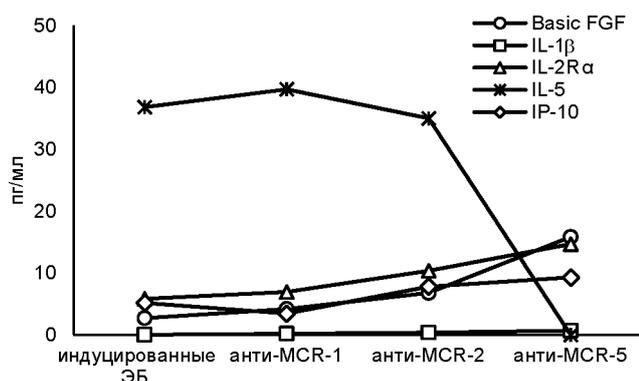


РИС. 3.

Динамика изменения продукции цитокинов разными типами индуцированных эритробластов костного мозга, полученных под действием антител к меланокортиновым рецепторам

FIG. 3.

Dynamics of changes in the production of cytokines by different types of induced bone marrow erythroblasts obtained under the action of antibodies to melanocortin receptors

ТАБЛИЦА 3

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР ЭРИТРОБЛАСТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ CD34+ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ОБРАБОТАННЫХ АНТИТЕЛАМИ К МЕЛАНКОРТИНОВЫМ РЕЦЕПТОРАМ (n = 6)

TABLE 3

THE CONTENT OF CYTOKINES IN THE SUPERNATANTS OF CULTURES OF ERYTHROBLASTS OBTAINED FROM BONE MARROW CD34+ CELLS AND TREATED WITH ANTIBODIES TO MELANOCORTIN RECEPTORS (n = 6)

Цитокины	Контроль	Anti-MCR-1	Anti-MCR-2	Anti-MCR-5
Basic FGF	0 [0; 7,128]	0 [0; 11,76]	0,915 [0; 19,24]	13,36 [8,528; 26,79]*
IL-1β	0 [0; 0,05]	0 [0; 0,4875]	0 [0; 1,145]	0,495 [0,2925; 1,188]*
IL-2Rα	5,55 [4,105; 6,92]	7,08 [4,75; 8,93]	9,705 [7,425; 13,36]	13,58 [10,46; 19,78]*
IL-5	39,48 [18,47; 53,12]	40,86 [26,63; 47,65]	36,7 [26,3; 41,52]	0 [0; 0]*;#
IP-10	5,7 [2,64; 8,05]	3,87 [0; 6,045]	7,18 [5,493; 10,68]	8,79 [7,638; 10,95]#
MIG	5,205 [0,6075; 8,928]	8,37 [5,658; 12,57]	10,49 [4,193; 14,07]	15,17 [13,24; 18,73]*
MIP-1α	8,51 [5,658; 22,61]	8,675 [4,35; 31,37]	14,35 [9,188; 47,21]	34,28 [28,15; 125,4]*;#
SCGF-β	553,5 [0; 1579]	318,3 [0; 1523]	3,91 [0; 830,9]	2346 [1660; 4672]§

Примечание. Различия статистически значимы: * – по сравнению с контрольной группой; # – по сравнению с группой Anti-MCR-1; § – по сравнению с группой Anti-MCR-2.

Мы сравнили продукцию цитокинов всеми типами эритробластов после обработки антителами к меланокортиновым рецепторам. Статистически значимые различия по продукции цитокинов были получены для basic FGF, IL-1β, IL-2Rα, IL-5, IP-10, MIG, MIP-1α, SCGF-β (табл. 3, рис. 3).

Таким образом, по продукции цитокинов большинство статистически значимых различий обнаружено между контрольной группой эритробластов и эритробластами после блокировки меланокортиновых рецепторов 5-го типа.

ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс дифференцировки эритроидных предшественников сопровождается уменьшением размеров клеток, усилением конденсации хроматина, прогрессирующей гемоглобинизацией и заметными изменениями в мембранной организации [12]. Каждое клеточное деление при эритропоэзе сопровождается дифференцировкой, поэтому дочерние клетки структурно и функционально отличаются от материнской клетки, производными ко-

торой они являются. Таким образом, для детального понимания эритропоэза крайне важно получить клетки на всех стадиях развития [14]. Культивирование из CD34+ предшественников *in vitro* является процессом, который позволяет получить различные стадии дифференцировки эритробластов под действием эритропоэтина (EPO), SCF и IL-3 [15]. Для получения и характеристики эритробластов различных стадий развития мы применили метод подавления активности рецепторов к меланокортину с целью изучения особенностей продукции иммунорегуляторных медиаторов на разных этапах дифференцировки. Для дифференцировки эритроидных клеток по стадиям развития мы использовали маркер CD44, который является молекулой адгезии с максимально высоким содержанием в про-эритробластах и снижением во время эритроидной дифференцировки до очень низкого уровня в ортохроматофильных эритробластах [12]. Для примера показано распределение клеток по стадиям развития у двух доноров костного мозга. Добавление блокирующих антител к меланокортиновым рецепторам изменяет картину распределения эритробластов по сравнению с необработанными клетками. Антитела к MCR-1 приводят к накоплению полихроматофильных эритробластов, добавление антител к MCR-2 приводит к преобладанию базофильных эритробластов, а добавление антител к MCR-5 – к преобладанию ортохроматофильных эритробластов. Анализ фенотипа и продукции цитокинов после применения антител к меланокортиновым рецепторам показал, что данное воздействие не влияет на линейную дифференцировку эритробластов, однако каждая блокировка приводит к появлению популяции, которая отличается по продукции иммунорегуляторных факторов от других индуцированных популяций. При оценке профиля экспрессии цитокинов эритроидными клетками мы выявили ряд цитокинов, продукция которых статистически значимо отличается между группами эритробластов полученных после применения нейтрализующих антител к меланокортиновым рецепторам. Эти факторы оказывают различное влияние на другие типы клеток. Basic FGF вовлечён в различные биологические процессы, включая клеточную пролиферацию, выживание, метаболизм, морфогенез, дифференцировку, эмбриональное развитие, ангиогенез, репарацию тканей и регенерацию [16]. IL-1 функционирует как ключевой провоспалительный «аварийный» сигнал, который непосредственно ускоряет клеточное деление и миелоидную дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток [17], действует как усилитель иммунных реакций [18]. IP-10 (хемокин CXCL10) участвует в хемоаттракции макрофагов, моноцитов и активированных Т-клеток и естественных клеток-киллеров (NK, natural killer cells), модуляции развития и функций Т-клеток, ингибировании образования колоний *in vitro* с помощью ранних клеток-предшественников костного мозга человека [19]. Хемокин MIG (CXCL9) регулирует миграцию, дифференцировку и активацию цитотоксических лимфоцитов, NK-клеток, NKT-клеток и макрофагов [20]. MIP-1 α был идентифицирован как ингибитор стволовых клеток (SCI, stem cells inhibitor), который может ингибировать пролиферацию гемопоэтических клеток-предшественников как *in vitro*, так и *in vivo* [21]. SCGF- β поддер-

живает рост примитивных гемопоэтических клеток-предшественников и присутствует в циркулирующих опухолевых клетках [22]. При этом эритробласты, обработанные антителами к MCR-5, не продуцируют IL-5, который стимулирует образование колоний мегакариоцитов, нейтрофилов и макрофагов из культур костного мозга и рост незрелых гемопоэтических предшественников BFU-E [23]. Максимальные различия по продукции цитокинов показаны для эритробластов после обработки антителами к MCR-5. Фенотипически эта популяция клеток представлена более зрелыми формами – ортохроматофильными эритробластами. Предположительно более зрелые формы эритробластов, возможно, оказывают меньшее влияние на развитие гемопоэтических колоний и даже могут ингибировать их рост, но в то же время стимулируют привлечение лимфоидных негемопоэтических клеток. Возможно, более зрелые эритробласты больше ориентированы на формирование и поддержание микроокружения, т. е. играют гомеостатическую роль, помимо иммунорегуляторной.

Таким образом, мы показали качественные и количественные различия эритробластов в зависимости от стадии дифференцировки, что может приводить к отличающимся регуляторным эффектам. Возможность получения эритробластов человека на разных стадиях развития *in vivo* позволяет развивать детальное понимание нормального процесса эритроидной дифференцировки, определять стадий-специфические изменения нарушений эритропоэза при различных заболеваниях, проводить скрининг лекарств, которые способны специфически воздействовать на определённую эритроидную стадию, что в свою очередь может привести к новым терапевтическим подходам для пациентов с изменённым эритропоэзом.

Финансирование

Фенотипирование эритроидных клеток проведено за счёт средств Государственного задания № 122011800108-0.

Определение продукции цитокинов проведено за счёт средств гранта Российского научного фонда № 21-15-00087 (<https://rscf.ru/project/21-15-00087/>).

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА

1. Elahi S. Neglected cells: Immunomodulatory roles of CD71+ erythroid cells. *Trends Immunol.* 2019; 40(3): 181-185. doi: 10.1016/j.it.2019.01.003
2. Macario AJ, Conway de Macario E, Dugan CB. Erythroblasts can generate immunosuppression *in vivo*. *Medicina (B Aires).* 1981; 41(Suppl): 83-90.
3. Цырлова И.Г. Иммуносупрессорные клетки эритроидного ряда эр-супрессоры и их роль в регуляции иммунитета. *Вестник Академии медицинских наук СССР.* 1991; 12: 34-38.
4. Sennikov SV, Eremina LV, Samarin DM, Avdeev IV, Kozlov VA. Cytokine gene expression in erythroid cells. *Eur Cytokine Netw.* 1996; 7(4): 771-774.

5. Seledtsov VI, Seledtsova GV, Samarin DM, Taraban VY, Sennikov SV, Kozlov VA. Characterization of erythroid cell-derived natural suppressor activity. *Immunobiology*. 1998; 198(4): 361-374. doi: 10.1016/S0171-2985(98)80045-4
6. Sennikov SV, Inzhelevskaya TV, Eremina LV, Kozlov VA. Regulation of functional activity of bone marrow hemopoietic stem cells by erythroid cells in mice. *Bull Exp Biol Med*. 2000; 130(12): 1159-1161.
7. Sennikov SV, Krysov SV, Injelevskaya TV, Silkov AN, Kozlov VA. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver. *Eur Cytokine Netw*. 2001; 12(2): 274-279.
8. Sennikov SV, Injelevskaya TV, Krysov SV, Silkov AN, Kovinev IB, Dyachkova NJ, et al. Production of hemo- and immunoregulatory cytokines by erythroblast antigen+ and glycophorin A+ cells from human bone marrow. *BMC Cell Biol*. 2004; 5(1): 39. doi: 10.1186/1471-2121-5-39
9. Denisova VV, Kulagin AD, Lisukov IA, Kryuchkova IV, Sizikova SA, Sennikov SV, 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
10. Simamura E, Arikawa T, Ikeda T, Shimada H, Shoji H, Masuta H, et al. Melanocortins contribute to sequential differentiation and enucleation of human erythroblasts via melanocortin receptors 1, 2 and 5. *PLoS One*. 2015; 10(4): e0123232. doi: 10.1371/journal.pone.0123232
11. Toda C, Santoro A, Kim JD, Diano S. POMC neurons: From birth to death. *Annu Rev Physiol*. 2017; 79: 209-236. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034110
12. Chen K, Liu J, Heck S, Chasis JA, An X, Mohandas N. 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): 17413-17418. doi: 10.1073/pnas.0909296106
13. Kassem O, Al-Saleh A, Azizieh F, Dingle K. CytokineExplore: An online tool for statistical analysis of cytokine concentration datasets. *J Inflamm Res*. 2020; 13: 401-410. doi: 10.2147/JIR.S253255
14. Hu J, Liu J, Xue F, Halverson G, Reid M, Guo A, 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): 3246-3253. doi: 10.1182/blood-2013-01-476390
15. Chen J, Qiao YD, Li X, Xu JL, Ye QJ, Jiang N, et al. Intratumoral CD45+CD71+ erythroid cells induce immune tolerance and predict tumor recurrence in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2021; 499: 85-98. doi: 10.1016/j.canlet.2020.12.003
16. Gadaleta RM, Moschetta A. Metabolic messengers: fibroblast growth factor 15/19. *Nat Metab*. 2019; 1(6): 588-594. doi: 10.1038/s42255-019-0074-3
17. Pietras EM, Mirantes-Barbeito C, Fong S, Loeffler D, Kovtonyuk LV, Zhang S, et al. Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat Cell Biol*. 2016; 18(6): 607-618. doi: 10.1038/ncb3346
18. Dinarello CA. An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. *Mol Med*. 2014; 20(1): S43-S58. doi: 10.2119/molmed.2014.00232
19. Vazirinejad R, Ahmadi Z, Kazemi Arababadi M, Hassan-shahi G, Kennedy D. The biological functions, structure and sources of CXCL10 and its outstanding part in the pathophysiology of multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation*. 2014; 21(6): 322-330. doi: 10.1159/000357780
20. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev*. 2018; 63: 40-47. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.11.007
21. Staversky RJ, Byun DK, Georger MA, Zaffuto BJ, Goodman A, Becker MW, 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
22. Sukowati CHC, Patti R, Pascut D, Ladju RB, Tarchi P, et al. Serum stem cell growth factor beta for the prediction of therapy response in hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int*. 2018; 2018: 6435482. doi: 10.1155/2018/6435482
23. Dougan M, Dranoff G, Dougan SK. GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of cytokines: regulators of inflammation. *Immunity*. 2019; 50(4): 796-811. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.022

REFERENCES

1. Elahi S. Neglected cells: Immunomodulatory roles of CD71+ erythroid cells. *Trends Immunol*. 2019; 40(3): 181-185. doi: 10.1016/j.it.2019.01.003
2. Macario AJ, Conway de Macario E, Dugan CB. Erythroblasts can generate immunosuppression in vivo. *Medicina (B Aires)*. 1981; 41(Suppl): 83-90.
3. Tsyrova IG. Immunosuppressive cells of the erythroid series ER-suppressors and their role in the regulation of immunity. *Vestnik Akademii meditsinskikh nauk SSSR*. 1991; 12: 34-38. (In Russ.).
4. Sennikov SV, Eremina LV, Samarin DM, Avdeev IV, Kozlov VA. Cytokine gene expression in erythroid cells. *Eur Cytokine Netw*. 1996; 7(4): 771-774.
5. Seledtsov VI, Seledtsova GV, Samarin DM, Taraban VY, Sennikov SV, Kozlov VA. Characterization of erythroid cell-derived natural suppressor activity. *Immunobiology*. 1998; 198(4): 361-374. doi: 10.1016/S0171-2985(98)80045-4
6. Sennikov SV, Inzhelevskaya TV, Eremina LV, Kozlov VA. Regulation of functional activity of bone marrow hemopoietic stem cells by erythroid cells in mice. *Bull Exp Biol Med*. 2000; 130(12): 1159-1161.
7. Sennikov SV, Krysov SV, Injelevskaya TV, Silkov AN, Kozlov VA. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver. *Eur Cytokine Netw*. 2001; 12(2): 274-279.
8. Sennikov SV, Injelevskaya TV, Krysov SV, Silkov AN, Kovinev IB, Dyachkova NJ, et al. Production of hemo- and immunoregulatory cytokines by erythroblast antigen+ and glycophorin A+ cells from human bone marrow. *BMC Cell Biol*. 2004; 5(1): 39. doi: 10.1186/1471-2121-5-39
9. Denisova VV, Kulagin AD, Lisukov IA, Kryuchkova IV, Sizikova SA, Sennikov SV, 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
10. Simamura E, Arikawa T, Ikeda T, Shimada H, Shoji H, Masuta H, et al. Melanocortins contribute to sequential differentiation and enucleation of human erythroblasts via melanocortin receptors 1, 2 and 5. *PLoS One*. 2015; 10(4): e0123232. doi: 10.1371/journal.pone.0123232
11. Toda C, Santoro A, Kim JD, Diano S. POMC neurons: From birth to death. *Annu Rev Physiol*. 2017; 79: 209-236. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034110

12. Chen K, Liu J, Heck S, Chasis JA, An X, Mohandas N. 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): 17413-17418. doi: 10.1073/pnas.0909296106
13. Kassem O, Al-Saleh A, Azizieh F, Dingle K. CytokineExplore: An online tool for statistical analysis of cytokine concentration datasets. *J Inflamm Res*. 2020; 13: 401-410. doi: 10.2147/JIR.S253255
14. Hu J, Liu J, Xue F, Halverson G, Reid M, Guo A, 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): 3246-3253. doi: 10.1182/blood-2013-01-476390
15. Chen J, Qiao YD, Li X, Xu JL, Ye QJ, Jiang N, et al. Intratumoral CD45+CD71+ erythroid cells induce immune tolerance and predict tumor recurrence in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2021; 499: 85-98. doi: 10.1016/j.canlet.2020.12.003
16. Gadaleta RM, Moschetta A. Metabolic messengers: fibroblast growth factor 15/19. *Nat Metab*. 2019; 1(6): 588-594. doi: 10.1038/s42255-019-0074-3
17. Pietras EM, Mirantes-Barbeito C, Fong S, Loeffler D, Kovtonyuk LV, Zhang S, et al. Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nat Cell Biol*. 2016; 18(6): 607-618. doi: 10.1038/ncb3346
18. Dinarello CA. An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. *Mol Med*. 2014; 20(1): S43-S58. doi: 10.2119/molmed.2014.00232
19. Vazirinejad R, Ahmadi Z, Kazemi Arababadi M, Hassanshahi G, Kennedy D. The biological functions, structure and sources of CXCL10 and its outstanding part in the pathophysiology of multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation*. 2014; 21(6): 322-330. doi: 10.1159/000357780
20. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation – A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev*. 2018; 63: 40-47. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.11.007
21. Stavsky RJ, Byun DK, Georger MA, Zaffuto BJ, Goodman A, Becker MW, 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
22. Sukowati CHC, Patti R, Pascut D, Ladju RB, Tarchi P, et al. Serum stem cell growth factor beta for the prediction of therapy response in hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int*. 2018; 2018: 6435482. doi: 10.1155/2018/6435482
23. Dougan M, Dranoff G, Dougan SK. GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of cytokines: regulators of inflammation. *Immunity*. 2019; 50(4): 796-811. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.022

Сведения об авторах

Назаров Кирилл Вячеславович – аспирант, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», e-mail: kirill.lacrimator@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7175-4051>

Перик-Заводский Роман Юрьевич – аспирант, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», e-mail: zavodskii@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5055-4859>

Кузнецова Мария Сергеевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», e-mail: maria.kuz17.03@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9834-9328>

Филиппова Юлия Григорьевна – аспирант, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», e-mail: airyuka@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5229-6814>

Шевченко Юлия Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», e-mail: shevcen@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8773-0599>

Денисова Вера Васильевна – кандидат медицинских наук, заведующая гематологическим отделением с блоком трансплантации костного мозга клиники иммунопатологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», e-mail: verden@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1951-2260>

Силков Александр Николаевич – доктор биологических наук, директор, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», e-mail: exon@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1897-8675>

Сенников Сергей Витальевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», e-mail: sennikovsv@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7366-7768>

Information about the authors

Kirill V. Nazarov – Postgraduate, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, e-mail: kirill.lacrimator@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7175-4051>

Roman Yu. Perik-Zavodskiy – Postgraduate, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, e-mail: zavodskii@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-5055-4859>

Maria S. Kuznetsova – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, e-mail: maria.kuz17.03@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9834-9328>

Yuliya G. Philippova – Postgraduate, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, e-mail: airyuka@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5229-6814>

Yulia A. Shevchenko – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, e-mail: shevcen@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8773-0599>

Vera V. Denisova – Cand. Sc. (Med.), Head of the Hematology Department with a Bone Marrow Transplantation Unit, Clinic of Immune-Associated Diseases, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, e-mail: verden@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1951-2260>

Alexander N. Silkov – Dr. Sc. (Biol.), Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, e-mail: exon@ngs.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1897-8675>

Sergey V. Sennikov – Dr. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, e-mail: sennikovsv@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-7366-7768>

Статья опубликована в рамках V Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии».