

МИЕЛОИДНЫЕ СУПРЕССОРНЫЕ КЛЕТКИ (MDSC) РЕГУЛИРУЮТ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ У СТАРЫХ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ЦЕЛЬНОВИРИОННОЙ ВАКЦИНОЙ SARS-COV-2

Ю.В. Перфильева^{1,2}, Н. Абдолла^{1,2}, А. Кали¹, Р.Т. Тлеулиева¹, Д. С. Эбен¹, Ю. Р. Абдусаттарова^{1*}, А.В. Лушова^{1,2}, Е.О. Остапчук^{1,2}, Б.В. Каральник³, Н.Н. Беляев⁴

¹РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» КН МОН РК,

г. Алматы, Казахстан

²Филиал ТОО «Национальный центр биотехнологии» в городе Алматы, г. Алматы, Казахстан

³Казахстанско-Российский Медицинский Университет, г. Алматы, Казахстан

⁴ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г. Санкт-Петербург, Россия

*yulduz2000a@gmail.com

АБСТРАКТ

Супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) - иммуносупрессорная популяция, вовлеченная в патологические процессы, ассоциированные с хроническим воспалением. В последние годы активно обсуждается роль данных клеток в регуляции ряда непатологических процессов, в частности, в развитии вакцин-индуцированного иммунного ответа. Данная работа была направлена на исследование роли MDSC в формировании иммунного ответа у старых мышей, вакцинированных инактивированным цельновирioнным препаратом коронавируса SARS-CoV-2. Иммунизация старых животных индуцировала повышение относительного содержания В-клеток и продукцию специфических антител к S1- и N- протеинам SARS-CoV-2 в титрах, сравнимых с таковыми у молодых животных. В то же время, повышенный уровень MDSC у старых животных негативно коррелировал с уровнем цитотоксических CD8⁺ Т-клеток. Селезеночные MDSC у старых животных характеризовались повышенной продукцией активных форм кислорода по сравнению с молодыми животными. Эксперименты *in vitro* показали, что деплеция MDSC повышала антиген-специфическую продукцию IFN γ CD4⁺ Т-клетками. Полученные данные предполагают негативную роль MDSC в регуляции Т-клеточного вакцин-индуцированного ответа на цельноклеточный препарат SARS-CoV-2 и о необходимости дальнейших исследований в данном направлении, что может дать ключ к пониманию того, как повысить эффективность вакцин против SARS-CoV-2 в группах риска.

Ключевые слова: миелоидные супрессорные клетки, старение, вакцинация, SARS-CoV-2, иммунный ответ, мышечные клетки

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение функций адаптивной и врожденной иммунных систем, наблюдаемое в процессе старения и называемое иммуностарением, сопровождается различными изменениями в иммунной системе, которые делают организм более уязвимым к инфекциям [1] и онкологическим патологиям [2]. Ряд инфекционных заболеваний, включая вирусные инфекции, пневмонию, туберкулез, инфекции мочевыделительной системы и другие инфекции, встречаются более часто и имеют более тяжелое течение у людей пожилого возраста. Более того, показатель смертности от большинства из этих инфекций среди пожилых пациентов значительно превышает таковой показатель у молодых людей [3]. Другим значительным следствием процесса иммуностарения является снижение эффективности вакцинации [4]. Большинство вакцин, используемых в настоящее время, менее иммуногенны и эффективны у лиц пожилого возраста. Например, эффективность противогриппозной вакцины составляет от 70 до 90 % у детей и взрослых, и снижается до 30–50 % у лиц старше 65 лет [5]. Вакцинация против пневмонии эффективна только у 37,7% пожилых людей по сравнению с 75,8% у молодых [6]. Такое снижение эффективности вакцинации связано, в первую очередь, с инволюцией первичных лимфатических органов при иммуностарении, которое приводит к снижению уровней наивных лимфоцитов, способных распознавать новые антигены.

Неотъемлемой частью иммуностарения является си-

стемное хроническое воспаление, называемое инфлам-мэйджингом («inflammaging») и характеризующееся повышением уровней ряда провоспалительных медиаторов (интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-1 бета (IL-1 β) С-реактивного белка, фактора некроза опухоли альфа (TNF α) и др.) в организме [7]. Длительная циркуляция низких концентраций провоспалительных медиаторов приводит к индукции пролиферации и активации так называемых миелоидных супрессорных клеток (Myeloid-Derived Suppressor Cells, MDSC) [8]. Повышенные уровни MDSC были обнаружены рядом экспериментальных работ в крови, селезенке и костном мозге старых животных. Повышенное количество MDSC было обнаружено у пожилых людей с повышенным уровнем провоспалительных цитокинов, включая TNF- α , IL-6 и IL-1 β [9]. Принимая во внимание, что MDSC обладают способностью эффективно ингибировать функции клеток адаптивного иммунного ответа [10], логично предположить, что данная популяция является одним из факторов дисфункции эффекторных клеток и связанной с этим недостаточности вакцин-индуцированного иммунного ответа, наблюдаемых при иммуностарении. Участие MDSC в регуляции иммунного ответа на вакцины продемонстрировано рядом экспериментальных работ. Так, Heithoff D.M. и соавт. показали, низкая эффективность вакцинации штаммом *dam Salmonella* у старых мышей была ассоциирована с высоким уровнем MDSC в селезенке [11]. Пониженные титры специфических антител и недостаточный Т-клеточный ответ на введение вакцины к гепатиту В наблюдались

у мышей с ожирением, в печени и селезенке которых показаны высокие уровни CD11b⁺Gr1⁺ MDSC, способных подавлять пролиферацию лимфоцитов в ответ на антиген вируса гепатита В [12].

Кроме того, показано, что сам процесс вакцинации способен индуцировать MDSC. ДНК-вакцина против вируса иммунодефицита симиан индуцировала аккумуляцию HLA-DR⁺CD14⁺ MDSC в периферической крови обезьян, что было ассоциировано с повышенным риском приобретения инфекции и недостаточным CD8⁺ T-клеточным ответом [13]. Вакцинация мышей БЦЖ стимулировала аккумуляцию MDSC с фенотипом CD11b⁺Ly-6C^{int}Ly-6G⁻ в месте инъекции вакцины и в крови через MyD88/IL-1R-опосредованный сигнальный путь [14].

Таким образом, опубликованные данные предполагают, что MDSC участвуют в комплексной регуляции вакцин-индуцированного иммунного ответа. В данной работе оценили различные параметры антиген-специфического иммунного ответа в связи с уровнем и активностью MDSC у вакцинированных старых и молодых мышей.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Объекты исследования

Молодые (2-3 мес.) и старые (от 1 года и старше) мыши инбредной линии BALB/c (самки) были предоставлены Национальным научным центром особо опасных инфекций им. М. Айкимбаева. Во время проведения исследования животных содержали в поликарбонатных клетках (до 5 мышей в клетке) при температуре 23 ± 3 °C и естественном освещении в помещении вивария Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина. Иммунизацию животных проводили не менее чем через 10 дней акклиматизации. Мышей кормили стандартным полнорационным лабораторным кормом (3,8% жир, 18,5% белки; SSNIFF, Германия). Протокол исследования на животных был одобрен локальным этическим комитетом (ЛЭК) Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина (выписка из протокола № 1 от 24.11.2021).

Исследование включало молодых мышей (МЖ, вес 18,9 ± 2,1 г); старых мышей (СЖ, вес 23,4 ± 2,2 г, p = 0,002); вакцинированных молодых мышей (ВМЖ, вес 20,6 ± 0,1 г) и старых вакцинированных животных (СВЖ, вес 23,1 ± 1,5). В качестве иммуногена использовали коммерчески доступный цельновирионный препарат SARS-CoV-2, инактивированный нагреванием (штамм 2019-n-CoV/USA-WA1/2020; ATCC, США). Антиген вводили в дозе 0,5 мкг/мышь. Иммунизацию проводили внутримышечно двукратно, вторую дозу иммуногена вводили через 21 день после первой иммунизации. Взятие крови из глазного орбитального синуса проводилось после локальной анестезии оксипрокаином (Инокаин, Sentiss) [15]. Эвтаназию мышей цервикальной дислокацией проводили через 7-14 дней после введения второй дозы. Для получения сыворотки кровь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин. Каждая из групп животных включала не менее 7 мышей. Селезенки извлекали хирургическим путем после эвтаназии мышей и взвешивали на электронных весах.

Получение мышинных спленоцитов

Для получения спленоцитов селезенку мышей гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора тканей в фосфатно-буферном солевом растворе (PBS). Эритроциты лизировали с помощью лизирующего буферного раствора (ЛБР), содержащего 10 мМ бикарбоната калия, 150 мМ хлорида аммония и 0,1 мМ ЭДТА (pH 7,2 – 7,4). Для этого к клеточной суспензии спленоцитов добавляли 4 мл ЛБР и инкубировали в течение 3 мин при комнатной температуре. Далее реакцию останавливали добавлением двукратного объема среды RPMI, содержащей 3% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Sigma-Aldrich, США), и отмывали клетки центрифугированием при 300 g в течение 7 мин. Для избавления от клеточных агрегатов спленоциты фильтровали через фильтры с диаметром пор 30 мкм (Miltenyi Biotec, Германия), после чего ресуспендировали в PBS.

Проточная цитофлуориметрия

Фенотипический анализ клеток проводили с использованием метода проточной цитофлуориметрии. Для блокирования неспецифического связывания АТ использовали реагент для блокирования Fc-рецепторов (CD16 и CD32) мыши (Miltenyi Biotec, Германия). При внутриклеточном окрашивании клетки метили АТ, специфичными к поверхностным маркерам, затем проводили их пермеабиллизацию и фиксацию с использованием реагента Fixation/Permeabilization (BD Biosciences, США) согласно протоколу производителя. Клетки отмывали буферным раствором Perm/Wash (BD Biosciences, США) и окрашивали АТ, специфичными к внутриклеточным молекулам. Далее клетки отмывали PBS, ресуспендировали в буфере для проведения проточной цитометрии и анализировали на проточном цитофлуориметре BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences, США) с использованием программы BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences, США).

Для поверхностного мечения использовали следующие АТ, меченные флуорохромами: PE anti-MHCII, FITC anti-CD11b, PerCP anti-CD11c, FITC anti-CD11c, PerCP anti-CD4, APC anti-CD3, FITC anti-CD3 (Biolegend, США), FITC anti-CD62L, PerCP anti-CD8a, APC anti-CD4, PE anti-CD62L (Miltenyi Biotec, Германия), PerCP-Cy5.5 anti-Ly6G (Life technologies, США), APC anti-CD11b, PerCP eFluor 710 anti-Ly6G (Invitrogen, США), PE anti-Ly6C, AF 488 anti-Ly6C, (eBioscience, США). Антитела PE anti-IFNγ (Invitrogen, США) или FITC anti-IFNγ (Miltenyi Biotec, Германия) применяли для внутриклеточного окрашивания.

Изоляция MDSC методом магнитной сепарации

Для получения фракции MDSC спленоциты старых животных последовательно метили антителами (АТ) Anti-Gr-1-Biotin (Miltenyi Biotec, Германия) и анти-биотиновыми магнитными микробусами (Miltenyi Biotec, Германия) согласно инструкциям производителей и далее проводили сепарацию Gr-1⁺-фракции на магнитном сепараторе Vario MACS. Чистоту полученной популяции клеток оценивали на проточном цитофлуориметре после мечения клеток до сепарации и полученной фракции Gr-1⁺ АТ к CD11b и Gr-1.

Оценка продукции активных форм кислорода

(АФК)

При оценке продукции активных форм кислорода (АФК) популяцией MDSC спленоциты инкубировали с 2 мкМ диацетата 2'-7'-дихлорфлуоресцеина (DCFDA) (Sigma-Aldrich, США) в бессывороточной среде RPMI-1640 (Sigma Life-science, США) при 37 °C в течение 30 мин. Реакцию останавливали культуральной средой на основе RPMI-1640, содержащей 10% ФБС. Далее клетки отмывали холодным PBS и метили АТ специфичными к маркерам MDSC (APC anti-CD11b и PerCP-Cy5.5 anti-Ly6G). После инкубации при 2-8 °C в течение 20 мин клетки отмывали, фиксировали и немедленно анализировали на проточном цитофлуориметре BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences, США). Сток-раствор DCFDA (5 мМ) готовили в DMSO и хранили в аликвотах при -20 °C.

Твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА) антител к S1 и N протеинам SARS-CoV-2

Для проведения ИФА использовали 96 луночные полистироловые планшеты со средней адсорбционной способностью Medium Sorb (Nunc, ThermoFisher Scientific, США). На планшеты наслаивали антиген (100 мкл/лунка), растворенный в 10 мМ карбонатбикарбонатном буферном растворе (КББ) (pH 9,0-9,6) в конечной концентрации 5 мкг/мл, и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч или при 4 °C в течение 18 ч. В качестве антигенов использовали коммерческие рекомбинантные протеины S1 и N SARS-CoV-2 (ThermoFisher Scientific, США). После окончания инкубации планшеты промывали КББ от несвязавшегося с пластиком антигена. Для устранения неспецифического связывания планшеты далее обрабатывали 0,5% раствором желатина в КББ (200 мкл/лунка). После 2-х часовой инкубации при 4 °C планшеты отмывали и вносили в ячейки сыворотку крови мышей в различном разведении. Планшеты инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После 3-х разовой отмывки раствором PBS с твином-20 (PBS-T) планшеты выдерживали 2 ч при комнатной температуре с конъюгатом (антивидовое антитело, меченное пероксидазой хрена) rabbit anti-mouse IgG-HRP (Sigma, США). В качестве субстрата реакции использовали тетраметилбензидин (ТМБ) (Sigma, США). Реакцию останавливали через 30 мин добавлением Stop solution for TMB (Sigma, США). Оптическую плотность раствора в каждой лунке измеряли при 450 нм на иммуоферментном анализаторе StatFax 2100 Microplate Reader (Awareness Technology).

Оценка антиген-специфической продукции IFNγ Т-клетками

Спленоциты (4 × 10⁵/200 мкл) культивировали в круглом 96-луночном планшете в полной культуральной среде, содержащей 10% ФБС, в присутствии или без SARS-CoV-2 (2 мкг/мл) при 37°C, 5% CO₂ в течение 18 ч, с добавлением брэфелдина А (в конечном разведении 1:1000, Sigma-Aldrich) через час после внесения антигена. В положительный контроль к культуре добавляли конканавалин А (10 мкг/мл). После инкубации клетки осаждали при 300 g и 4°C в течение 5 минут, окрашивали антителами к поверхностным маркерам (APC anti-CD4 и PerCP anti-CD8), фиксировали и подвергали пермеабиллизации и дальнейшему окрашиванию антителами к IFNγ. Далее проводили анализ на проточном цитофлуориметре. Анти-

ген-специфическую продукцию IFNγ Т-клетками также оценивали после удаления магнитной сепарацией MDSC из культуры спленоцитов, а также при добавлении изолированной популяции MDSC к Gr1⁺-фракции в соотношении 1:5.

Статистическая обработка данных

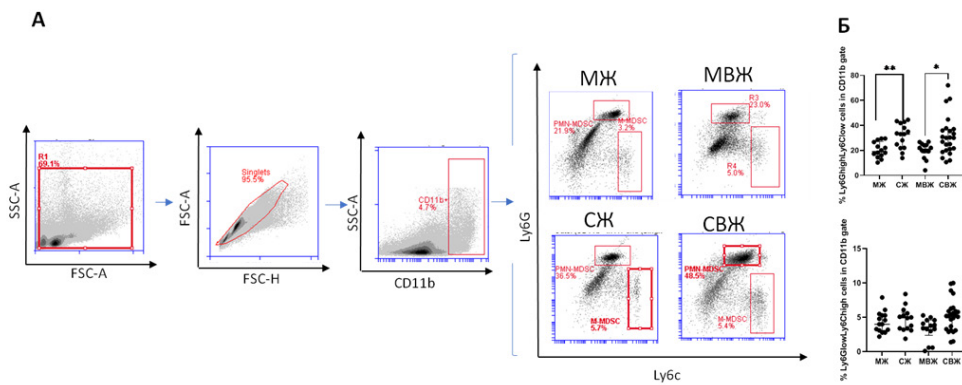
Прикладную программу Prism 9 software (Graph Pad) использовали при проведении статистической обработки полученных результатов. Результаты представлены в виде медианы (М) и интерквартильного интервала между 25-м и 75-процентиями или среднего значения и стандартного отклонения. Результаты проточной цитофлуориметрии анализировали с использованием программного обеспечения BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences, США). Для оценки достоверности различий между двумя выборками использовали критерий Манна-Уитни в случае ненормального распределения данных и критерий Стьюдента в случае нормального распределения данных. Различия считали существенными, если вероятность нуль-гипотезы не превышала 5% (p < 0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ содержания и функциональных характеристик MDSC у старых и молодых животных до и после проведения иммунизации

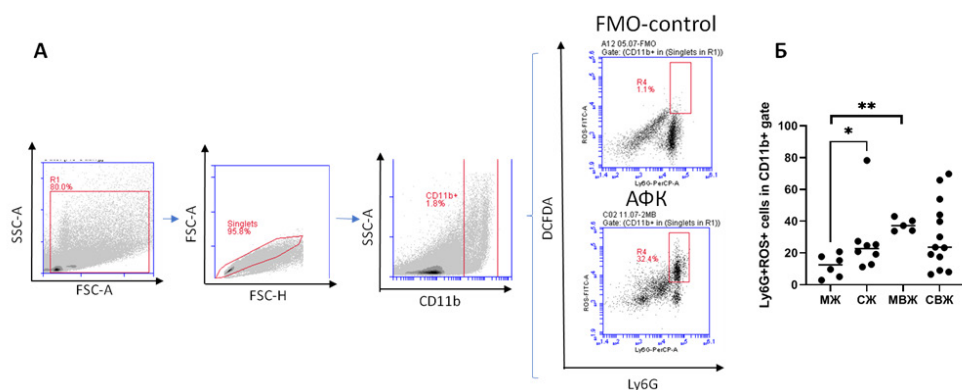
На начальном этапе работы мы провели сравнительный анализ содержания и функциональной активности MDSC в селезенке молодых и старых животных. Для идентификации полиморфонуклеарной (PMN-MDSC) и моноцитарной (M-MDSC) миелоидных субпопуляций MDSC использовали антитела к Ly6G и Ly6C, соответственно. Стратегия гейтирования субпопуляций MDSC и результаты проведенного анализа содержания MDSC у старых и молодых животных представлены на рисунке 1. Проведенный анализ продемонстрировал аккумуляцию клеток с фенотипом CD11b⁺Ly6G^{high}Ly6C^{low} у старых животных, относительное содержание которых было увеличено примерно в 1,5 раза у старых невакцинированных и вакцинированных животных по сравнению с молодыми невакцинированными и вакцинированными животными. Уровень M-MDSC, рассчитанный как процент Ly6G⁺Ly6C^{high}-клеток в гейте CD11b⁺, не различался между группами мышей.

Один из основных механизмов подавления иммунитета MDSC опосредован продукцией АФК. Предполагается, что именно АФК, продуцируемые MDSC, вовлечены в подавление антиген-специфических Т-клеточных ответов через модификацию CD8 и Т-клеточного рецептора [16]. Более того, показано, что АФК необходимы для поддержания MDSC в недифференцированном состоянии [17]. В связи с этим, супрессорную активность MDSC оценивали по уровню продукции АФК, используя DCFDA, предназначенный для количественной оценки АФК в образцах живых клеток. Протокол анализа АФК с применением DCFDA основан на диффузии данного соединения в клетки. В клетках DCFDA деацетируется клеточными эстеразами до нефлуоресцентного соединения, которое позже окисляется АФК до 2', 7'-дихлорфлуоресцеина. 2', 7'-дихлорфлуоресцеин обладает высокой флуоресценцией и может быть детектирован с помощью



Примечание – представлены репрезентативные точечные графики цитофлуориметрии (А) и обобщенные данные с медианными значениями \pm интерквартильные значения (Б), достоверность различий между группами представлена как * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (по критерию Манна-Уитни).

Рисунок 1 – Уровень MDSC у старых и молодых мышей линии BALB/c до вакцинации и через 9 дней после введения повторной дозы инактивированного цельновирионного препарата SARS-CoV-2



Примечание – представлена стратегия гейтирования продукции АФК MDSC с помощью цитофлуориметрии (А) и обобщенные данные с медианными значениями (Б).

Рисунок 2 – Продукция АФК MDSC, полученными из селезенки молодых и старых мышей до вакцинации и через 9 дней после введения второй дозы инактивированного цельновирионного препарата SARS-CoV-2

проточной цитофлуориметрии. Стратегия идентификации продукции АФК MDSC с помощью цитофлуориметрического анализа и полученные результаты представлены на рисунке 2А. В качестве контроля продукции АФК использовали контроль флуоресценции-минус-один (FMO), при этом образец клеток окрашивали всеми флуорохромами кроме DCFDA.

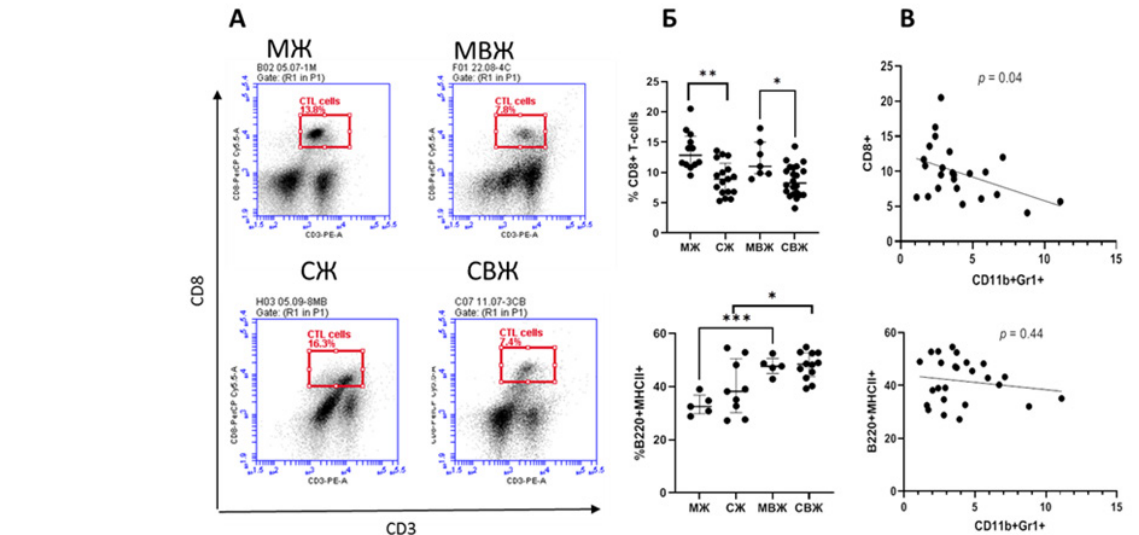
Из рисунка видно, что большая доля $CD11b^+Ly6G^+$ -клеток у старых мышей продуцировала АФК по сравнению с молодыми мышами, при этом вакцинация приводила к статистически значимому повышению продукции АФК в группе МВЖ.

Таким образом, на данном этапе работы мы показали, что у молодых невакцинированных животных клетки с фенотипом MDSC составляли небольшой процент от общего числа $CD11b^+$ спленоцитов. Уровень PMN-MDSC значительно возрастал у старых животных. Результаты согласуются с ранее опубликованными исследованиями [18]. Иммуносупрессорный потенциал PMN-MDSC, оцененный по продукции АФК, был значительно выше у старых животных по сравнению с молодыми. Интересно, что иммунизация инактивированным цельновирионным препаратом SARS-CoV-2 приводила к увеличению продукции АФК PMN-MDSC у молодых мышей. В то время как панель антител, которую мы использовали, применяется

для обнаружения PMN-MDSC, мы не можем исключить возможность того, что некоторые из гейтированных клеток в популяции $CD11b^+Ly6G^{high}ROS^+$ на самом деле являются нейтрофилами, которые имеют такой же фенотип и также характеризуются активной продукцией АФК. Повышение продукции АФК $CD11b^+Ly6G^{high}$ – клетками после бустерной иммунизации у молодых мышей может указывать на нормальный воспалительный процесс в ответ на введение антигена. В то время как у старых мышей уровень $CD11b^+Ly6G^{high}$, продуцирующих АФК, был повышен до иммунизации, указывая на персистентную продукцию АФК.

Оценка антиген-специфического ответа у вакцинированных старых мышей в сравнении с молодыми мышами

Для оценки вакцин-индуцированного иммунного ответа мы провели анализ содержания основных популяций иммунокомпетентных клеток у молодых и старых животных, иммунизированных инактивированным цельновирионным SARS-CoV-2. Уровень В-клеток оценивали как процент $B220^+$, экспрессирующих главный комплекс гистосовместимости 2-го класса МНСII. Исследовали содержание общей популяции Т-лимфоцитов как процент $CD3^+$ -клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов как процент $CD3^+CD8^+$ -клеток в лимфоцитарном гейте сплено-



Примечание – представлены репрезентативные точечные графики цитофлуориметрии (А), обобщенные данные с медианными значениями \pm интерквартильные значения (Б) и результаты корреляционного анализа между уровнем эффекторных клеток (цитотоксические Т-клетки и В-клетки) и MDSC (В); достоверность различий между группами представлена как * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (по критерию Манна-Уитни).

Рисунок 3 – Содержание цитотоксических Т-клеток ($CD3^+CD8^+$) и В-клеток ($B220^+MHCII^+$) среди спленоцитов, полученных от старых и молодых мышей BALB/c до вакцинации и через 9 дней после введения повторной дозы инактивированного цельновирионного препарата SARS-CoV-2

цитов с помощью проточной цитофлуориметрии. Уровень дендритных клеток (ДК) оценивали как процент $CD11c^+MHCII^+$ -клеток в гейте $CD11b^+$.

Проведенный анализ продемонстрировал значительное снижение относительного содержания $CD3^+$ Т-лимфоцитов (данные не показаны) и цитотоксических Т-лимфоцитов у СЖ по сравнению с МЖ, а также у СВЖ по сравнению с МВЖ (рисунок 3). Вакцинация инактивированным SARS-CoV-2 не изменяла уровень $CD3^+CD8^+$ у молодых или старых мышей. Поскольку во время проведения исследования не было отмечено значительных изменений в весе ($0,09 \pm 0,01$ г в группе МЖ, и $0,10 \pm 0,06$ г в группе СЖ, $p = 0,54$; $0,19 \pm 0,15$ г в группе МВЖ, и $0,12 \pm 0,02$ г в группе СВЖ, $p = 0,30$) и «клеточности» селезенки, рассчитываемой как отношение числа клеток к весу селезенки, у экспериментальных животных, изменения в относительном содержании клеточных популяций соответствовали изменениям в их абсолютном содержании. Проведенный анализ также показал статистически значимую обратную корреляцию между уровнем $CD3^+CD8^+$ и уровнем общей популяции MDSC, оцененной как $CD11b^+Gr1^+$ (Spearman $r = -0,42$, 95% confidence interval (CI): $-0,709 - -0,006$; $p = 0,04$).

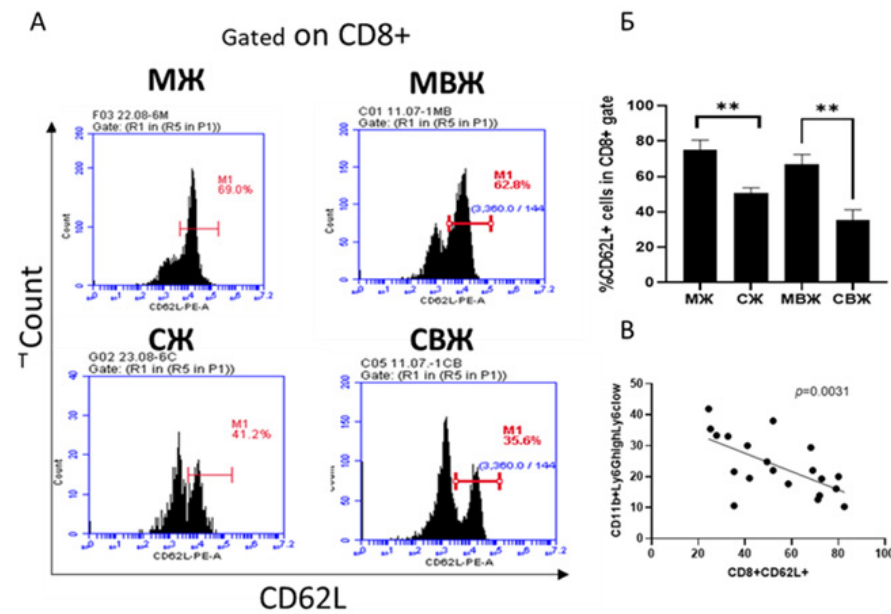
Содержание $B220^+MHCII^+$ -клеток не различалось между группами СЖ и МЖ. Вакцинация инактивированным цельновирионным SARS-CoV-2 приводило к статистически значимому повышению уровней В-клеток как у МВЖ, так и в группе СВЖ (рисунок 3). Корреляции между уровнями В-клеток и MDSC не обнаружено (Spearman $r = -0,16$, 95% CI: $-0,521 - 0,252$; $p = 0,45$) Популяция ДК составляла порядка 1 % от всей популяции спленоцитов и ее уровни не различались между группами мышей (данные не показаны).

Миграция Т-клеток из периферической крови в окружающие ткани имеет ключевое значение при развитии

воспалительных реакций и регулируется молекулами клеточной адгезии. L-селектин, также известный как $CD62L$, представляет собой молекулу клеточной адгезии, опосредующую миграцию $CD62L^+$ наивных Т-клеток в лимфатические узлы, где они активируются антиген-презентирующими клетками [19]. Процесс презентации антигена – важный этап формирования вакцин-индуцированного иммунного ответа. Hanson и соавторы показали, что MDSC способны понижать экспрессию $CD62L$ на $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитах путем протеолитического отщепления данной молекулы. Данный процесс опосредован металлопротеазой ADAM17, которая экспрессируется на клеточной мембране и в цитоплазме MDSC [20].

Мы оценили уровень $CD8^+CD62L^+$ Т-клеток у экспериментальных мышей, а также ассоциацию между уровнем MDSC и экспрессией $CD62L$ на цитотоксических Т-лимфоцитах. Цитофлуориметрический анализ показал статистически значимое снижение уровня $CD8^+CD62L^+$ у молодых животных по сравнению со старыми. Также, согласно исследованию Hanson и соавторов, мы обнаружили негативную корреляцию между уровнями MDSC и $CD8^+CD62L^+$ Т-клеток (Spearman $r = -0,63$, 95% confidence interval (CI): $-0,84 - -0,26$; $p = 0,003$).

Для контроля иммунизации, а также для оценки антиген-специфического В-клеточного иммунитета у животных, иммунизированных инактивированным цельновирионным SARS-CoV-2, нами были отработаны условия проведения твердофазного ИФА с использованием коммерчески доступных рекомбинантных белков S1 и N SARS-CoV-2 (ThermoFisher Scientific). Протокол разработанного ИФА представлен в разделе Материалы и методы. Антитела как к домену S1, так и к протенину N были обнаружены в сыворотках всех иммунизированных мышей (в качестве негативного контроля использованы сыворотки неиммунизированных мышей), при этом у неко-



Примечание – представлены репрезентативные гистограммы цитофлуориметрии (А), обобщенные данные со средними значениями \pm стандартное отклонение (Б) и результаты корреляционного анализа (В); достоверность различий между группами представлена как ** $p \leq 0,005$ (согласно критерию Стьюдента).

Рисунок 4 – Экспрессия CD62L на цитотоксических Т-клетках, полученных от старых и молодых мышей линии BALB/c до вакцинации и через 9 дней после введения повторной дозы инактивированного цельновирионного препарата SARs-CoV-2, результаты корреляционного анализа между уровнем наивных Т-клеток и MDSC

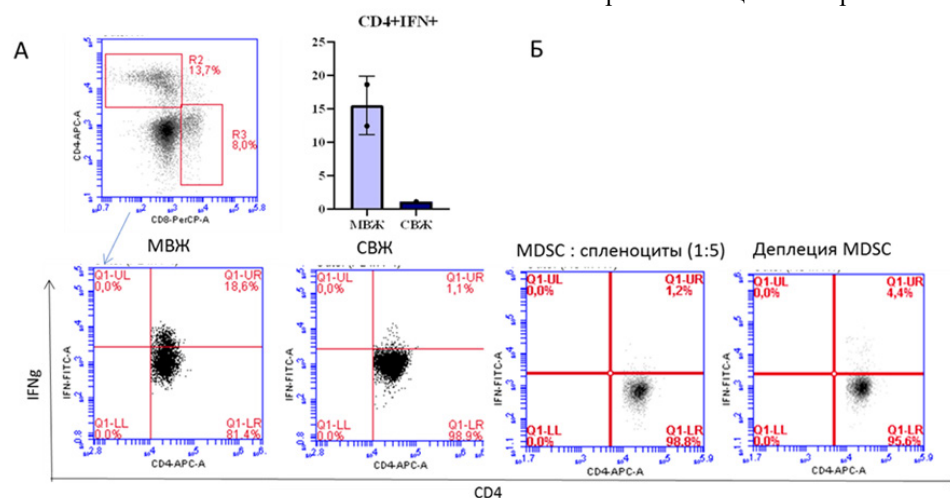
торых мышей были выше титры АТ, специфичных для домена S1, у части мышей были выше титры АТ, реагирующих с протеином N (данные не показаны). Достоверных различий между старыми и молодыми мышами в титрах IgG к S1 и N обнаружены не были (данные не показаны).

Чтобы проверить, являются ли MDSC супрессорными в отношении Т-клеточного антиген-специфического ответа, мы использовали 2 подхода: добавление выделенных магнитной сепарацией MDSC к культуре спленоцитов и деплеция MDSC из культуры спленоцитов. Во-первых, мы оценили антиген-специфический Т-клеточный ответ у старых и молодых иммунизированных мышей по продукции IFN γ CD4 $^+$ клетками после добавления в культуру цельновирионного SARS-CoV-2 *in vitro*.

Как показано на рисунке 5А, продукция IFN γ была значительно снижена у старых вакцинированных мышей по сравнению с молодыми мышами. Удаление MDSC из культуры спленоцитов в некоторой степени восстанавливало продукцию IFN γ (рисунок 5Б), в то время как добавление MDSC (Gr1 $^+$), выделенных магнитной сепарацией из спленоцитов старых мышей, значительно ингибировало антиген-специфический ответ CD4 $^+$ Т-клеток в ответ на SARS-CoV2 *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В совокупности, данные, представленные в данной работе, демонстрируют, что в ответ на иммунизацию инактивированным цельновирионным SARS-CoV2 как



Примечание – показаны репрезентативные точечные графики цитофлуориметрии (А и Б), обобщенные данные с усредненными значениями \pm стандартное отклонение (А).

Рисунок 4 – Продукция IFN γ CD4 $^+$ Т-клетками молодых и старых вакцинированных мышей линии BALB/c после добавления в культуру спленоцитов инактивированного вируса SARs-CoV-2 (А) и после деплеции MDSC (Б)

у молодых, так и у старых мышей развивается адекватный гуморальный ответ, выражающийся в продукции специфических антител к антигенам вируса и повышению уровней антителопродуцирующих В-клеток. В то же время у старых животных наблюдается выраженное снижение уровней Т-клеток. С одной стороны, причиной такого снижения, по-видимому, является инволюция тимуса. С другой стороны, снижение уровней Т-клеток у старых животных может быть обусловлено повышением уровня иммуносупрессорной популяции MDSC. Так, мы продемонстрировали негативную корреляцию между уровнем цитотоксических Т-клеток и уровнем MDSC. Более того, мы наблюдали негативную корреляцию между содержанием PMN-MDSC и Т-клеток, экспрессирующих маркер CD62L, который необходим для миграции лимфоцитов в лимфатические узлы, где происходит процесс презентации антигена. Эксперименты *in vitro* показали, что MDSC были способны подавлять антиген-специфическую продукцию IFN γ Т-клетками, которая частично восстанавливается при деплеции данных клеток из культуры. Частичное восстановление свидетельствует о возможном вовлечении других популяций иммуносупрессорных клеток, например, Т-регуляторных клеток. К сожалению, мы не оценивали уровень данной популяции клеток у животных в данном исследовании. Тем не менее, полученные результаты предполагают значительное влияние MDSC на формирование Т-клеточного иммунного ответа при вакцинации. Дальнейшее исследование роли данных клеток в опосредованной вакциной защите будет способствовать повышению эффективности вакцин против SARS-CoV2, а также вакцин против других патогенов человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта AP13067593 «Исследование роли MDSC в регуляции иммунного ответа на вакцину при старении и разработка фармакологических подходов к повышению эффективности вакцинации», финансируемой Министерством образования и науки Республики Казахстан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтверждают отсутствие финансовой или какой-либо иной поддержки исследования, или конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Bradley S., Bender M.D. Infectious disease risk in the elderly // *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* - 2003. - Vol.23. - P.57–64. doi: 10.1016/s0889-8561(02)00078-4.
- Fulop T., Larbi A., Witkowski J. M. et al. Immunosenescence and cancer // *Crit. Rev. Oncog.* - 2013. - Vol. 18. - P. 489–513. doi: 10.1615/CritRevOncog.2013010597.
- Yoshikawa T.T. Epidemiology and unique aspects of aging and infectious diseases // *Clin. Infect. Dis.* - 2000. - Vol. 30(6). - P. 931–933. doi:10.1086/313792.
- Goronzy J. J., Weyand C. M. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines // *Nat. Immunol.* - 2013. - Vol.14. - P. 428–436. doi: 10.1038/ni.2588.
- Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA.

Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis // *Lancet Infect Dis.* - 2012. - Vol. 12(1). - P. 36-44. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70295-X. Epub 2011 Oct 25. Erratum in: *Lancet Infect Dis.* 2012 Sep;12(9):655. PMID: 22032844.

6. Berild JD, Winje BA, Vestrheim DF, Slotved H-C, Valentiner-Branth P, Roth A, Storsäter J. A Systematic Review of Studies Published between 2016 and 2019 on the Effectiveness and Efficacy of Pneumococcal Vaccination on Pneumonia and Invasive Pneumococcal Disease in an Elderly Population // *Pathogens.* - 2020. - Vol. 9(4). - P. 259. https://doi.org/10.3390/pathogens9040259.

7. Salminen, Antero et al. The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the inflammaging process // *Ageing Research. Reviews.* - 2018. - N. 48. - P. 1-10.

8. Budhwar S., Verma P., Verma R. et al. The yin and yang of myeloid-derived suppressor cells // *Front. Immunol.* - 2018. - Vol. 28. 2776. doi: 10.3389/fimmu.2018.02776. eCollection 2018.

9. Schroeter A, Roesel MJ, Matsunaga T, Xiao Y, Zhou H, Tullius SG. Aging Affects the Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Alloimmunity // *Front Immunol.* - 2022. - Vol. 13. - P. 917972. doi: 10.3389/fimmu.2022.917972.

10. Onyilagha C., Kuriakose S., Ikeogu N. et al. Myeloid-derived suppressor cells contribute to susceptibility to *Trypanosoma congolense* infection by suppressing CD4 $^+$ T cell proliferation and IFN γ production // *J. Immunol.* - 2018. - Vol. 201(2). - P. 507–515. doi: 10.4049/jimmunol.1800180.

11. Heithoff D.M., Enioutina E.Y., Bareyan D. et al. Conditions that diminish myeloid-derived suppressor cell activities stimulate cross-protective immunity // *Infect. Immun.* - 2008. - Vol. 76(11). -P. 5191–5199. doi: 10.1128/IAI.00759-08.

12. Chen S., Akbar S.M., Miyake T. et al. Diminished immune response to vaccinations in obesity: role of myeloid-derived suppressor and other myeloid cells // *Obes. Res. Clin. Pract.* - 2015. - Vol. 9(1). - P. 35–44. doi: 10.1016/j.orcp.2013.12.006.

13. Vaccari M, Fourati S, Brown DR, Silva de Castro I, Bissa M, Schifanella L, Doster MN, Foulds KE, Roederer M, Koup RA, Sui Y, Berzofsky JA, Sekaly RP, Franchini G. Myeloid Cell Crosstalk Regulates the Efficacy of the DNA/ALVAC/gp120 HIV Vaccine Candidate // *Front Immunol.* - 2019. - Vol. 10. - P. 1072. doi: 10.3389/fimmu.2019.01072

14. Lin A., Liang F., Thompson E.A. et al. Rhesus macaque myeloid-derived suppressor cells demonstrate T cell inhibitory functions and are transiently increased after vaccination // *J. Immunol.* - 2018. - Vol. 200(1). - P. 286–294. doi: 10.4049/jimmunol.1701005.

15. IACUC Policy on the Retro-orbital Bleeding of Rodents. John Hopkins University. Available online: https://web.jhu.edu/animalcare/procedures/retro-orbital.html (accessed: 09.01.2023).

16. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI. Antigen-specific inhibition of CD8 $^+$ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species // *J Immunol.* - 2004. - Vol. 172. - P. 989–999.

17. Ohl K, Tenbrock K. Reactive Oxygen Species

as Regulators of MDSC-Mediated Immune Suppression // Front Immunol. - 2018. - Vol. 9. - P. 2499. doi:10.3389/fimmu.2018.02499

18. Flores, R. R., Clauson, C. L., Cho, J., Lee, B. C., McGowan, S. J., Baker, D. J., Niedernhofer, L. J., & Robbins, P. D. (2017). Expansion of myeloid-derived suppressor cells with aging in the bone marrow of mice through a NF-κB-dependent mechanism // Aging cell. - 2017. - Vol. 16(3). - P. 480–487. doi.org/10.1111/ace1.12571.

19. Springer T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm // Cell. – 1994. – Vol.76. – P.301-314. doi: 10.1016/0092-8674(94)90337-9.

20. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells // J Immunol. - 2009. - Vol. 183(2). - P.937-44. doi: 10.4049/jimmunol.0804253.

REFERENCES

1. Bradley S., Bender M.D. Infectious disease risk in the elderly // Immunol. Allergy Clin. N. Am. - 2003. - Vol.23. - P.57–64. doi: 10.1016/s0889-8561(02)00078-4.

2. Fulop T., Larbi A., Witkowski J. M. et al. Immunosenescence and cancer // Crit. Rev. Oncog. - 2013. - Vol. 18. - P. 489–513. doi: 10.1615/CritRevOncog.2013010597.

3. Yoshikawa T.T. Epidemiology and unique aspects of aging and infectious diseases // Clin. Infect. Dis. - 2000. - Vol. 30(6). - P. 931–933. doi:10.1086/313792.

4. Goronzy J. J., Weyand C. M. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines // Nat. Immunol. - 2013. - Vol.14. - P. 428–436. doi: 10.1038/ni.2588.

5. Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, Belongia EA. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis // Lancet Infect Dis. - 2012. - Vol. 12(1). - P. 36-44. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70295-X. Epub 2011 Oct 25. Erratum in: Lancet Infect Dis. 2012 Sep;12(9):655. PMID: 22032844.

6. Berild JD, Winje BA, Vestheim DF, Slotved H-C, Valentiner-Branth P, Roth A, Storsäter J. A Systematic Review of Studies Published between 2016 and 2019 on the Effectiveness and Efficacy of Pneumococcal Vaccination on Pneumonia and Invasive Pneumococcal Disease in an Elderly Population // Pathogens. - 2020. - Vol. 9(4). - P. 259. https://doi.org/10.3390/pathogens9040259.

7. Salminen, Antero et al. The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the inflammaging process // Ageing Research. Reviews. – 2018. – N. 48. – P. 1-10.

8. Budhwar S., Verma P., Verma R. et al. The yin and yang of myeloid-derived suppressor cells // Front. Immunol. - 2018. - Vol. 28. 2776. doi: 10.3389/fimmu.2018.02776. eCollection 2018.

9. Schroeter A, Roesel MJ, Matsunaga T, Xiao Y, Zhou H, Tullius SG. Aging Affects the Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Alloimmunity // Front Immunol. - 2022. - Vol. 13. - P. 917972. doi: 10.3389/fimmu.2022.917972.

10. Onyilagha C., Kuriakose S., Ikeogu N. et al. Myeloid-derived suppressor cells contribute to susceptibility to

Trypanosoma congolense infection by suppressing CD4⁺ T cell proliferation and IFNγ production // J. Immunol. - 2018. - Vol. 201(2). - P. 507–515. doi: 10.4049/jimmunol.1800180.

11. Heithoff D.M., Enioutina E.Y., Bareyan D. et al. Conditions that diminish myeloid-derived suppressor cell activities stimulate cross-protective immunity // Infect. Immun. - 2008. - Vol. 76(11). -P. 5191–5199. doi: 10.1128/IAI.00759-08.

12. Chen S., Akbar S.M., Miyake T. et al. Diminished immune response to vaccinations in obesity: role of myeloid-derived suppressor and other myeloid cells // Obes. Res. Clin. Pract. - 2015. - Vol. 9(1). - P. 35–44. doi: 10.1016/j.orcp.2013.12.006.

13. Vaccari M, Fourati S, Brown DR, Silva de Castro I, Bissa M, Schifanella L, Doster MN, Foulds KE, Roederer M, Koup RA, Sui Y, Berzofsky JA, Sekaly RP, Franchini G. Myeloid Cell Crosstalk Regulates the Efficacy of the DNA/AL-VAC/gp120 HIV Vaccine Candidate // Front Immunol. - 2019. - Vol. 10. - P. 1072. doi: 10.3389/fimmu.2019.01072

14. Lin A., Liang F., Thompson E.A. et al. Rhesus macaque myeloid-derived suppressor cells demonstrate T cell inhibitory functions and are transiently increased after vaccination // J. Immunol. - 2018. - Vol. 200(1). - P. 286–294. doi: 10.4049/jimmunol.1701005.

15. IACUC Policy on the Retro-orbital Bleeding of Rodents. John Hopkins University. Available online: https://web.jhu.edu/animalcare/procedures/retro-orbital.html (accessed: 09.01.2023).

16. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrivovich DI. Antigen-specific inhibition of CD8⁺ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species // J Immunol. - 2004. - Vol. 172. - P. 989–999.

17. Ohl K, Tenbrock K. Reactive Oxygen Species as Regulators of MDSC-Mediated Immune Suppression // Front Immunol. - 2018. - Vol. 9. - P. 2499. doi:10.3389/fimmu.2018.02499

18. Flores, R. R., Clauson, C. L., Cho, J., Lee, B. C., McGowan, S. J., Baker, D. J., Niedernhofer, L. J., & Robbins, P. D. (2017). Expansion of myeloid-derived suppressor cells with aging in the bone marrow of mice through a NF-κB-dependent mechanism // Aging cell. - 2017. - Vol. 16(3). - P. 480–487. doi.org/10.1111/ace1.12571.

19. Springer T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm // Cell. – 1994. – Vol.76. – P.301-314. doi: 10.1016/0092-8674(94)90337-9.

20. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells // J Immunol. - 2009. - Vol. 183(2). - P.937-44. doi: 10.4049/jimmunol.0804253.

МИЕЛОИДТЫ СУПРЕССОРЛЫҚ ЖАСУШАЛАР (MDSC) SARS-COV-2 ТҮТАС ВИРИОН ВАКЦИНАСЫМЕН ИММУНИЗАЦИЯЛАНҒАН ЕГДЕ ТЫШҚАНДАРДАҒЫ Т-ЖАСУШАЛЫҚ РЕАКЦИЯНЫ РЕТТЕЙДІ

Ю.В. Перфильева^{1,2}, Н. Абдолла^{1,2}, А. Кали¹, Р.Т. Тлеулиева¹, Д.С. Әбен¹, Ю.Р. Абдусаттарова^{1*}, А.В. Лушова^{1,2}, Е.О. Остапчук^{1,2}, Б.В. Каральник³ и Н.Н. Беляев⁴

¹«М.А. Айтхожин атындағы молекулалық биология және биохимия институты», ШЖҚ РМК, Алматы қ., Қазақстан

²«Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС Алматы қаласындағы филиалы, Алматы қ., Қазақстан

³Қазақ-Ресей университеті, Алматы қ., Қазақстан

⁴Пастер атындағы эпидемиология және микробиология ФЗИ ФБУН, Санкт-Петербург қ., Ресей

*yulduz2000a@gmail.com

ТҮЙІН

Миелоидты супрессорлық жасушалар (MDSC) - созылмалы қабынумен байланысты патологиялық процестерге қатысатын иммуносупрессорлық популяция. Соңғы жылдары бұл жасушалардың бірқатар патологиялық емес процестерді реттеудегі рөлі, атап айтқанда вакцинадан туындаған иммундық реакцияны дамытудағы рөлі белсенді талқыланды. Бұл жұмыс SARS-CoV-2 коронавирусының инактивацияланған тұтас вирионды препаратымен егілген егде жастағы тышқандарда иммундық жауапты қалыптастырудағы MDSC рөлін зерттеуге бағытталған. Егде жануарларды иммунизациялау В-жасушаларының салыстырмалы құрамының жоғарылауын және жас жануарлармен салыстырылатын титрлерде SARS-CoV-2 S1 және N ақуыздарына арнайы антиденелер өндірісін тудырды. Сонымен қатар, егде жануарлардағы MDSC деңгейінің жоғарылауы цитотоксикалық CD8⁺ Т-жасушаларының деңгейімен теріс корреляцияланды. Ескі жануарлардағы көкбауыр MDSC жас жануарлармен салыстырғанда оттегінің белсенді түрлерінің көбеюімен сипатталды. *In vitro* эксперименттер MDSC деплециясы антигенге тән IFNγ CD4⁺ Т-жасушаларының өндірісін арттырғанын көрсетті. Нәтижелер MDSC-дың SARS-CoV-2 тұтас жасушалық препаратына Т-жасушалық вакциналардың индукцияланған реакциясын реттеудегі теріс рөлін және осы бағытта қосымша зерттеулер жүргізу қажеттілігін көрсетеді, бұл қауіп тобындағы адамдарда SARS-CoV-2 вакциналарының тиімділігін қалай арттыруға болатынын түсінуге мүмкіндік береді.

Кілт сөздер: миелоидты супрессорлық жасушалар, қартаюу, вакцинация, SARS-CoV-2, иммундық жауап, тышқан жасушалары

MYELOID SUPPRESSOR CELLS (MDSC) REGULATE THE T-CELL RESPONSE IN OLD MICE IMMUNIZED WITH THE WHOLE-VIRION SARS-COV-2 VACCINE

Y.V. Perfilyeva^{1,2}, N. Abdolla^{1,2}, A. Kali¹, R.T. Tleulieva¹, D.S. Aben¹, Y.R. Abdusattarova^{1*}, A.V. Lushova^{1,2}, Y.O. Ostapchuk^{1,2}, B.V. Karalnik³ and N.N. Belyaev⁴

¹M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Almaty, Kazakhstan

²Filial LLP «National Center of Biotechnology» in Almaty, Almaty, Kazakhstan

³Kazakh-Russian Medical University, Almaty, Kazakhstan

⁴Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russia

*yulduz2000a@gmail.com

ABSTRACT

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are an immunosuppressive population involved in pathological processes associated with chronic inflammation. In recent years, the role of these cells in the regulation of a number of non-pathological processes, in particular, in the development of vaccine-induced immune response, has been actively discussed. This work was aimed at investigating the role of MDSC in the development of an immune response in old mice immunized with an inactivated whole virion SARS-CoV-2. Immunization of old animals induced an increase in the relative content of B cells and the production of specific antibodies to S1 and N proteins of SARS-CoV-2 in titers comparable to those of young animals. At the same time, elevated MDSC levels in aged animals negatively correlated with the level of CD8⁺ T cells. Splenic MDSCs in old animals were characterized by increased production of reactive oxygen species compared to young animals. *In vitro* experiments showed that MDSC depletion increased antigen-specific production of IFNγ by CD4⁺ T cells. The data obtained suggest a negative role for MDSC in regulating the T-cell vaccine-induced response to inactivated SARS-CoV-2 and encourage further studies in this direction, which may be a key to developing approaches to increase the efficacy of vaccines against SARS-CoV-2 in at-risk groups.

Keywords: myeloid suppressor cells, aging, vaccination, SARS-CoV-2, immune response, mouse cells