

Влияние мевалоната, золедроната и БЦЖ-индукции на фенотип моноцитов/макрофагов

А.П. Лыков, С.Н. Белогородцев, Е.К. Немкова, А. Ветлугина, Т.М. Терехова, Я.Ш. Шварц

Новосибирский НИИ туберкулеза Минздрава России
630040, г. Новосибирск, ул. Охотская, 81а

Резюме

Клетки врожденного иммунитета, в основном моноциты/макрофаги, при первичной встрече с патогеном формируют долговременную неспецифическую иммунологическую память, так называемый тренированный иммунитет. В его образовании важная роль отводится метаболитам мевалонатного пути. Целью исследования было изучение влияния модуляторов мевалонатного пути, мевалоната и золедроната, на формирование тренированного иммунитета в моноцитах/макрофагах человека и животных. **Материал и методы.** Использованы моноцитоподобные клеточные линии человека THP-1 и U-937, перитонеальные макрофаги мышей BALB/c. Тренированный иммунитет индуцировали *in vitro* инкубацией клеток THP-1 и U-937 в течение 24 и 72 часов с инактивированными микобактериями вакцинального штамма БЦЖ, а *in vivo* – внутрибрюшинным введением БЦЖ мышам BALB/c с выделением перитонеальных макрофагов на 7-е сутки после инфицирования (лаг-фаза). Гиперреактивность клеток оценивали ответом на второй стимул бактериальным липополисахаридом (ЛПС) и меваланатом, золедронатом в присутствии или в отсутствие ЛПС. В кондиционированных средах от клеток оценивали уровень лактата, цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-10), оксида азота и глюкозы. **Результаты и их обсуждение.** Обнаружено, что моноцитоподобные клеточные линии THP-1 и U-937 по-разному отвечают продукцией цитокинов, лактата и потреблением глюкозы на БЦЖ-стимул при наличии или отсутствии лаг-фазы. Мевалонат и золедронат сами по себе или в сочетании с ЛПС также по-разному стимулируют секрецию цитокинов. Наличие лаг-фазы для моноцитоподобных клеток человека существенно для уровня продукции цитокинов и потребления глюкозы. Показано, что перитонеальные макрофаги усиливают выброс провоспалительных цитокинов в ответ на ЛПС, мевалонат и золедронат. **Заключение.** Мевалонат и золедронат индуцируют в моноцитах/макрофагах тренированный иммунитет.

Ключевые слова: THP-1, U-937, перитонеальные макрофаги, вакцина БЦЖ, липополисахарид, мевалонат, золедронат, лактат, цитокины, оксид азота, потребление глюкозы, тренированный иммунитет.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Автор для переписки: Лыков А.П., e-mail: aplykov2@mail.ru

Для цитирования: Лыков А.П., Белогородцев С.Н., Немкова Е.К., Ветлугина А., Терехова Т.М., Шварц Я.Ш. Влияние мевалоната, золедроната и БЦЖ-индукции на фенотип моноцитов/макрофагов. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2023;43(3):57–63. doi: 10.18699/SSMJ20230306

Effect of mevalonate, zoledronate and BCG on monocyte/macrophage phenotype

A.P. Lykov, S.N. Belogorodtsev, E.K. Nemkova, A. Vetlugina, T.M. Terekhova, Ya.Sh. Schwartz

Novosibirsk Tuberculosis Research Institute of Minzdrav of Russia
630040, Novosibirsk, Okhotskaya str., 81a

Abstract

Cells of innate immunity, mainly monocytes/macrophages, form a long-term nonspecific immunological memory during the initial encounter with the pathogen, the so-called trained immunity. Mevalonate pathway metabolites play an important role in the formation of trained immunity. The aim of this investigation was to study the effect of modulators of mevalonate pathway, mevalonate and zoledronate, on the formation of trained immunity in human and animal monocytes/macrophages. **Material and methods.** Human monocyte-like cell lines THP-1 and U-937, peritoneal macrophages of BALB/c mice were used. Trained immunity was induced *in vitro* by incubation of THP-1 and U-937 monocyte-like cell lines for 24 and 72 hours with inactivated *Mycobacteria* of BCG vaccine strain, and *in vivo* by intraperitoneal administration of BCG to BALB/c mice with isolation of peritoneal macrophages on day 7 after infection (lag phase). Cell hyperreactivity was assessed by response to a second stimulus with bacterial lipopolysaccharide (LPS) and mevalonate, zoledronate in the presence or absence of LPS. Lactate, cytokine (IL-1 β , TNF- α , IL-10), nitric oxide and glucose level was measured in conditioned media from cells. **Results and discussion.** The study showed that monocyte-like cell lines THP-1 and U-937 responded differently by cytokine production, lactate, and glucose consumption to BCG stimulus in the presence or absence of lag phase. Mevalonate and zoledronate alone or in combination with LPS also stimulated cytokine production in different ways. The presence of lag phase for human monocyte-like cells is essential for the level of cytokine production and glucose consumption. Peritoneal macrophages have been shown to enhance pro-inflammatory cytokine production in response to LPS, mevalonate, and zoledronate. **Conclusions.** Mevalonate and zoledronate induce trained immunity in monocytes/macrophages.

Key words: THP-1, U-937, peritoneal macrophages, BCG vaccine, lipopolysaccharide, mevalonate, zoledronate, lactate, cytokines, nitric oxide, glucose consumption, trained immunity.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Correspondence author: Lykov A.P., e-mail: aplykov2@mail.ru

Citation: Lykov A.P., Belogorodtsev S.N., Nemkova E.K., Vetlugina A., Terekhova T.M., Schwartz Ya.Sh. Effect of mevalonate, zoledronate and BCG on monocyte/macrophage phenotype. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(3):57–63. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230306

Введение

До недавнего времени считалось, что формирование иммунологической памяти является функцией адаптивного иммунитета, который характеризуется антигенной специфичностью и большой длительностью. Однако последние данные свидетельствуют о роли клеток врожденного иммунитета в данном процессе [1]. Многие инфекции или живые вакцины индуцируют в моноцитах/макрофагах (М/Мф) долговременную неспецифическую память, или фенотип, называемый в англоязычной литературе «trained immunity» (ТИ) [2]. Липополисахарид (ЛПС) способен индуцировать толерантность М/Мф, а β -глюкан и вакцина Кальметта – Герена (БЦЖ) вызывают ТИ через рецепторы к дектину-1 и NOD2, что активирует сигнальный путь Akt/mTOR/HIF-1 α , изменения метаболизма и эпигенетическую перестройку. В то же время такой механизм индукции ТИ характерен для эндогенных лигандов типа DAMP (мочевая кислота, окисленные липопротеиды низкой плотности, катехоламины) [2–4]. Стимуляцию ТИ рассматривают как перспективное направление для разработки новых стратегий лечения [5, 6]. Феномен ТИ используют в лечении остеосаркомы мурамилдипептидом и БЦЖ при раке мочевого пузыря, предполагается, что при этом активируется аутофагия [7]. Способность к

развитию ТИ показана для гемопоэтических стволовых и миелоидного ряда прогениторных клеток [8]. Метаболиты мевалонатного пути влияют на миелоидные клетки через активацию IGF1-R/mTOR и последующую модификацию гистонов. Статины способны предотвращать индукцию ТИ, а больные с синдромом гипериммуноглобулинемии D, обусловленным дефицитом мевалонаткиназы, который приводит к накоплению мевалоната, имеют конститутивный тип ТИ [9]. Бисфосфонаты влияют на дифференцировку и жизнеспособность М/Мф [10].

Цель работы – оценить влияние модуляторов мевалонатного пути, мевалоновой и золедроновой кислот, на фенотип М/Мф.

Материал и методы

В качестве М/Мф человека взяты опухолевые моноцитарные клеточные линии THP-1 (получена от больного острым моноцитарным лейкозом, моноцитоподобная, ATCC TIB202) и U-937 (получена от больного гистиоцитарной лимфомой, гистиомоноцитойдная клетка, ATCC CRL1593). Клеточные линии выращивали в питательной среде RPMI-1640 с 2 мМ L-глутамин («Панэко», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 1 % смеси антибиотик/антимикотик (Gibco), 5 мМ HEPES-

буфера (Sigma-Aldrich, США) в культуральных матрасах Т-150 (TPP, Швейцария) при 37 °С и газовой смеси 95 % атмосферного воздуха / 5 % CO₂ в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония), обновление среды проводили каждые 3–4 суток.

Опыт 1 (без лаг-фазы между первым и вторым стимулом): клетки ТНР-1, U-937 культивировали в течение 24 часов в матрасах Т-25 в присутствии или в отсутствие инактивированной нагреванием вакцины БЦЖ (АО НПО «Микроген», Россия) из расчета 0,1 мкг/10⁶ клеток/мл в CO₂-инкубаторе. Далее клетки осаждали при 1500 оборотов в минуту в течение 5 минут, дважды. Вносили по 10⁶ клеток/лунку в 24-луночный планшет (TPP) в среде культивирования с добавлением 50 или 100 мкМ золедроната (Плива Хорватска д.о.о., Хорватия), 2 мМ мевалоната ((±)-mevalonolactone, Sigma-Aldrich) и 0,5 мкг/мл ЛПС (Sigma-Aldrich), инкубировали 16–18 часов, собирали культуральную среду.

Опыт 2 (лаг-фаза между первым и вторым стимулом): клетки ТНР-1, U-937 культивировали в матрасах Т-25 в присутствии или в отсутствие инактивированной вакцины БЦЖ 0,1 мкг/10⁶ клеток/мл в CO₂-инкубаторе, через 72 часа осаждали при 1500 оборотов в минуту в течение 5 минут, дважды, вносили по 10⁶ клеток/мл в матрасы Т-25 и дополнительно культивировали 72 часа (лаг-фаза). Далее клетки осаждали при 1500 оборотов в минуту в течение 5 минут, дважды, вносили по 10⁶ клеток/мл в 24-луночный планшет в среде культивирования с добавлением 50 или 100 мкМ золедроната, 2 мМ мевалоната и 0,5 мкг/мл ЛПС, инкубировали 16–18 часов, собирали культуральную среду.

Исследование *in vivo* с мышами BALB/c выполнено в соответствии с международными и национальными документами, регламентирующими проведение экспериментов на лабораторных животных, и с соблюдением всех современных стандартов биоэтики. Животных инфицировали внутрибрюшинно БЦЖ (0,1 мкг/мышь, опытная группа), на 7-е сутки из лаважной жидкости брюшной полости мышей выделяли перитонеальные макрофаги (пМф), вносили по 10⁶ клеток/лунку в 24-луночный планшет и инкубировали в среде культивирования. Через 24 часа удаляли надосадочную жидкость, дважды промывали физиологическим раствором, вносили ЛПС (0,5 мкг/мл), мевалонат (2 мМ) и золедронат (50 мкМ) на 24 часа, собирали культуральную среду.

Уровень нитритов, стабильных метаболитов оксида азота (NO), лактата, глюкозы и цитокинов определяли спектрофотометрически в культуральной среде с использованием реактива Грисса, наборов «Лактат-Ново», «Глюкоза-Ново», «Ин-

терлейкин-1 бета-ИФА-БЕСТ», «Интерлейкин-10-ИФА-БЕСТ» и «альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Новосибирск).

Нормальность распределения полученных данных оценивали с использованием w-критерия Шапиро – Уилкса, в таблицах данные представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$), статистическую значимость межгрупповых различий оценивали однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с поправкой по Бонферрони и принимали при $p < 0,05$.

Результаты

В табл. 1 суммированы данные по индукции фенотипа Т1 в моноцитоподобных клеточных линиях человека *in vitro*. В ответ на БЦЖ-стимуляцию клеток линии ТНР-1 выявлено усиление продукции ими лактата, провоспалительных цитокинов (IL-1β, TNF-α) и потребления глюкозы. Стимуляция непраймированных БЦЖ клеток линии ТНР-1 ЛПС способствует продукции цитокинов и потреблению глюкозы. Добавление к ним золедроната или мевалоната, а также комбинации золедроната, мевалоната и ЛПС способствует увеличению продукции IL-1β, TNF-α ($p < 0,05$). В то же время сочетание золедроната, мевалоната и ЛПС увеличивало секрецию праймированными БЦЖ клетками линии ТНР-1 IL-1β и снижение продукции TNF-α ($p < 0,05$). Клетки линии U-937 в отсутствие БЦЖ секретируют больше IL-1β и IL-10 по сравнению с клетками ТНР-1. На ЛПС-стимул непраймированные клетки U-937 отвечают приростом выброса TNF-α и снижением продукции IL-10. Золедронат и мевалонат способствовали приросту секреции непраймированными БЦЖ клетками линии U-937 TNF-α. Праймирование клеток линии U-937 вакциной БЦЖ усиливало базальную продукцию лактата, а в ответ на ЛПС-стимул – провоспалительных цитокинов. Сочетание золедроната, мевалоната и ЛПС способствовало увеличению выброса провоспалительных цитокинов.

Таким образом, метаболит мевалонатного пути и бисфосфонат влияют на продукцию провоспалительных цитокинов и, в меньшей степени, на гликолиз моноцитоподобными клеточными линиями человека без лаг-фазы между первым и вторым стимулом.

На формирование фенотипа Т1 в моноцитах/макрофагах влияет наличие лаг-фазы (период покоя между первой стимуляцией БЦЖ и вторым стимулом, в течение которого происходят метаболические и эпигенетические изменения) [2]. В настоящем исследовании показано, что клетки линии ТНР-1 как без праймирования, так и после

Таблица 1. Продукция цитокинов, лактата, NO и потребление глюкозы клеточными линиями THP-1 и U-937 при индукции TI без лаг-фазы

Table 1. Cytokine, lactate, NO production and glucose consumption by cell lines THP-1 and U-937 during induction of trained immunity without lag phase (M ± SD)

Условия культивирования	IL-1β, пг/мл	TNF-α, пг/мл	IL-10, пг/мл	Лактат, мМ	NO, мкМ/мл	Потребление глюкозы, мМ
Клеточная моноцитоподобная линия THP-1						
В отсутствие БЦЖ						
Базальный уровень	67,0 ± 2,1	128,0 ± 0,8	71,0 ± 1,4	1,29 ± 0,14	5,34 ± 1,06	0,50 ± 0,01
ЛПС	93,5 ± 0,8*	196,0 ± 1*	79,6 ± 0,8*	1,24 ± 0,01	5,08 ± 0,23	0,87 ± 0,19*
Золедронат 50 мкМ	65,0 ± 1,5	184,3 ± 4,5*	77,1 ± 1,6*	1,3,0 ± 0,14	4,67 ± 0,11	0,50 ± 0,02
Золедронат 50 мкМ + ЛПС	93,5 ± 0,8*	231,1 ± 4,5*	58,5 ± 3,2*	1,47 ± 0,06*	4,89 ± 0,04	0,57 ± 0,03*
Золедронат 100 мкМ	69,2 ± 0,01	327,4 ± 4,8*	69,0 ± 1,3	1,47 ± 0,09	4,75 ± 0,08	0,67 ± 0,24
Золедронат 100 мкМ + ЛПС	82,0 ± 0,8*	103,4 ± 4,5*	63,0 ± 3,7*	1,4,0 ± 0,03*	4,81 ± 0,23	0,76 ± 0,30
Мевалонат	84,2 ± 2,3*	220,0 ± 2,8*	70,0 ± 2,9	1,37 ± 0,02	4,67 ± 0,04	0,62 ± 0,09*
Мевалонат + ЛПС	95,4 ± 0,5*	247,2 ± 4,7*	66,0 ± 0,3*	1,46 ± 0,03*	4,67 ± 0,04	0,92 ± 0,54
После стимуляции вакциной БЦЖ						
Базальный уровень	71,5 ± 0,01 [#]	169,0 ± 1,0 [#]	69,0 ± 2,1	1,36 ± 0,01	5,08 ± 0,001	1,57 ± 0,70 [#]
ЛПС	71,5 ± 1,5 [#]	138,0 ± 3,0* [#]	66,0 ± 0,8 [#]	1,43 ± 0,02* [#]	4,92 ± 0,08	2,40 ± 0,66 [#]
Золедронат 50 мкМ + мевалонат	95,0 ± 1,5*	146,0 ± 1,3*	64,1 ± 2,6	1,55 ± 0,22	5,18 ± 0,68	1,17 ± 0,21 [#]
Золедронат 50 мкМ + мевалонат + ЛПС	105,5 ± 3,5*	98,0 ± 0,2*	55,0 ± 0,0*	1,44 ± 0,02*	4,75 ± 0,15	1,68 ± 1,55
Клеточная гистиоцитоподобная моноцитарная линия U-937						
В отсутствие БЦЖ						
Базальный уровень	100,2 ± 1,3	87,3 ± 1,2	76,0 ± 0,1	1,56 ± 0,001	6,65 ± 1,85	1,80 ± 0,05
ЛПС	103,0 ± 1,5	129,0 ± 0,8*	66,0 ± 2,4*	1,61 ± 0,03	5,98 ± 0,83	1,59 ± 1,51
Золедронат 50 мкМ	103,0 ± 1,2	136,0 ± 1,3*	62,3 ± 0,8*	1,69 ± 0,11	4,78 ± 0,04	0,74 ± 0,25*
Золедронат 50 мкМ + ЛПС	101,0 ± 0,8	95,0 ± 1,5*	67,0 ± 1,5*	1,35 ± 0,09*	5,13 ± 0,38	0,56 ± 0,10*
Золедронат 100 мкМ	92,0 ± 2,3	117,5 ± 4,1*	69,0 ± 0,8*	1,56 ± 0,2	4,78 ± 0,11	2,95 ± 3,5
Золедронат 100 мкМ + ЛПС	89,0 ± 1,5*	64,5 ± 2,4*	64,3 ± 1,8*	1,47 ± 0,07*	5,10 ± 0,11	0,51 ± 0,01*
Мевалонат	104,0 ± 2,1	100,0 ± 1,0*	65,0 ± 0,8*	1,62 ± 0,11	4,70 ± 0,00	1,75 ± 1,75
Мевалонат + ЛПС	97,5 ± 0,8*	57,0 ± 1,2*	58,3 ± 2,6*	1,45 ± 0,11*	4,65 ± 0,15	0,51 ± 0,00*
После стимуляции вакциной БЦЖ						
Базальный уровень	70,4 ± 1,5 [#]	60,5 ± 1,2 [#]	60,0 ± 0,5 [#]	1,80 ± 0,12 [#]	4,75 ± 0,15	1,42 ± 1,17
ЛПС	81,0 ± 0,0* [#]	82,2 ± 0,1* [#]	57,3 ± 0,5* [#]	1,55 ± 0,16	4,86 ± 0,08	0,50 ± 0,00* [#]
Золедронат 50 мкМ + мевалонат	107,3 ± 1,3*	90,1 ± 0,2*	58,0 ± 1,1	1,74 ± 0,06	4,83 ± 0,26	0,55 ± 0,05*
Золедронат 50 мкМ + мевалонат + ЛПС	106,0 ± 1,3*	62,1 ± 1,4	56,0 ± 0,5*	1,72 ± 0,11	4,67 ± 0,04	0,50 ± 0,00*

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – базального уровня, # – без стимуляции БЦЖ.

праймирования БЦЖ отвечают на ЛПС приростом продукции провоспалительных цитокинов и гликолиза (табл. 2). Аналогичная картина показана для золедроната и мевалоната. Парадоксально, но лаг-фаза для клеток линии U-937 способствовала приросту спонтанной продукции провоспа-

лительных цитокинов и ее снижению в ответ на второй стимул. Таким образом, наличие лаг-фазы между первым и вторым стимулом способствовало формированию фенотипа TI в THP-1.

Резидентные перитонеальные макрофаги (пМф) в силу простоты получения являются

Таблица 2. Продукция цитокинов, лактата, NO и потребление глюкозы клеточными линиями THP-1 и U-937 при индукции TI с наличием лаг-фазы

Table 2. Cytokine, lactate, NO production and glucose consumption by cell lines THP-1 and U-937 during induction of trained immunity with lag phase (M ± SD)

Условия культивирования	IL-1β, пг/мл	TNF-α, пг/мл	IL-10, пг/мл	Лактат, мМ	NO, мкМ/мл	Потребление глюкозы, мМ
Клеточная моноцитоподобная линия THP-1						
Базальный уровень						
Базальный уровень	92,5 ± 2,0	129,3 ± 0,3	59,9 ± 0,6	2,40 ± 0,01	5,43 ± 0,58	7,52 ± 0,35
ЛПС	112,0 ± 5,1*	146,2 ± 2,4*	62,2 ± 1,1	2,40 ± 0,03	4,80 ± 0,00	6,90 ± 0,08
Золедронат 50 мкМ	117,0 ± 11,3*	114,0 ± 2,3*	56,4 ± 1*	2,30 ± 0,00	4,80 ± 0,001	6,94 ± 0,03
Золедронат 50 мкМ + ЛПС	114,0 ± 6,6*	98,0 ± 2,9*	53,0 ± 1,5	2,30 ± 0,01	4,75 ± 0,00	7,30 ± 0,19
Мевалонат	92,0 ± 0,8	147,1 ± 2,1*	54,0 ± 0,5	2,34 ± 0,00	4,75 ± 0,05	7,04 ± 0,20
Мевалонат + ЛПС	129,4 ± 2,8*	147,1 ± 1,2*	51,0 ± 0,5	2,3 ± 0,03	4,75 ± 0,001	6,80 ± 0,11
После стимуляции вакциной БЦЖ						
Базальный уровень	141,0 ± 1,9 [#]	176,0 ± 3,3 [#]	133,5 ± 11,7 [#]	2,40 ± 0,06	4,90 ± 0,08	7,04 ± 0,14
ЛПС	185,4 ± 11,2* [#]	235,3 ± 4,6* [#]	57,4 ± 2,8*	2,32 ± 0,03	4,90 ± 0,08	6,85 ± 0,08
Золедронат 50 мкМ	195,0 ± 1,5*	254,0 ± 5,5*	91,1 ± 4,1*	2,40 ± 0,01	4,75 ± 0,00	7,10 ± 0,15
Золедронат 50 мкМ + ЛПС	290,4 ± 3,6*	234,0 ± 2*	61,5 ± 0,5*	2,31 ± 0,03	4,93 ± 0,02	9,32 ± 1,36*
Клеточная гистицитоподобная моноцитарная линия U-937						
Базальный уровень						
Базальный уровень	228,0 ± 5,4	244,5 ± 2,6	60,0 ± 1,6	2,01 ± 0,4	5,23 ± 0,38	7,30 ± 0,19
ЛПС	156,0 ± 0,5*	204,0 ± 0,5*	62,1 ± 1,3	2,03 ± 0,28	5,20 ± 0,15	7,42 ± 0,04
Золедронат 50 мкМ	176,0 ± 2,3*	229,0 ± 1,3*	54,0 ± 0,3	2,20 ± 0,05	4,73 ± 0,02	7,20 ± 0,42
Золедронат 50 мкМ + ЛПС	225,0 ± 4,6	175,2 ± 5,2*	52,0 ± 0,3*	2,30 ± 0,02	4,75 ± 0,00	7,30 ± 0,29
Мевалонат	221,5 ± 4,1	272,0 ± 7,5*	68,0 ± 0,6*	2,20 ± 0,02	5,00 ± 0,18	7,70 ± 0,53
Мевалонат + ЛПС	188,0 ± 4,1*	238,5 ± 0,4	69,0 ± 0,5*	2,32 ± 0,03	4,80 ± 0,08	7,30 ± 0,25
После стимуляции вакциной БЦЖ						
Базальный уровень	128,4 ± 5,4 [#]	124,2 ± 6,2 [#]	63,0 ± 3,2	2,40 ± 0,01	4,93 ± 0,02	7,21 ± 0,43
ЛПС	105,0 ± 2* [#]	107,1 ± 5,1* [#]	73,0 ± 4,2* [#]	2,22 ± 0,02	4,95 ± 0,05	7,64 ± 0,08
Золедронат 50 мкМ	99,0 ± 2,2*	75,2 ± 3,3*	71,5 ± 0,8*	2,33 ± 0,01	5,13 ± 0,13	6,60 ± 0,81
Золедронат 50 мкМ + ЛПС	66,2 ± 6,7*	57,0 ± 3,3*	66,0 ± 2,6	2,00 ± 0,36	4,85 ± 0,00	7,60 ± 0,26

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – базального уровня, # – без стимуляции БЦЖ.

объектом исследования воздействий на них различных химических агентов. Нами проведено исследование влияния мевалоната и золедроната на выраженность формирования фенотипа TI *in vivo* (табл. 3). Установлено, что пМф усиливали продукцию IL-1β, TNF-α, особенно последнего, в ответ на ЛПС-стимул, мевалонат и золедронат. Кроме того, при добавлении мевалоната увеличивалась продукция клетками лактата и NO без второго стимула. Таким образом, в пМф воспроизведено формирование фенотипа TI в ответ на БЦЖ-стимул и показана возможность его частич-

ного воспроизведения мевалонатом и золедронатом.

Обсуждение

Неспецифическая долговременная иммунологическая память (TI) характеризуется метаболическим, эпигенетическим и функциональным перепрограммированием клеток врожденного иммунитета. Эти функциональные изменения происходят на нескольких уровнях, а именно – на уровне предшественников костного мозга, цирку-

Таблица 3. Продукция цитокинов, лактата, NO и потребление глюкозы перитонеальными макрофагами мышей Balb/c при индукции TI *in vivo***Table 3.** Cytokine, lactate, NO production and glucose consumption by peritoneal macrophages of Balb/c mice during induction of trained immunity *in vivo* (M ± SD)

Условия культивирования	IL-1β, пг/мл	TNF-α, пг/мл	IL-10, пг/мл	Лактат, мМ	NO, мкМ/мл	Потребление глюкозы, мМ
Базальный уровень						
Базальный	72,3 ± 3,1	85,0 ± 7,1	71,7 ± 1,9	2,60 ± 0,00	4,8 ± 0,6	3,8 ± 0,2
Мевалонат	86,6 ± 4,3*	147,4 ± 3,9*	71,5 ± 3,9	2,80 ± 0,00*	6,8 ± 0,1*	4 ± 0,2
Золедронат	105,2 ± 3,7*	135,5 ± 4,1*	75,4 ± 3,8	2,70 ± 0,10	4,4 ± 0,3	4 ± 0,4
ЛПС-стимулированный уровень						
Базальный	80,3 ± 1,9 [#]	132,1 ± 1,8 [#]	69,0 ± 3,8	3,10 ± 0,10 [#]	4,3 ± 0,5	4,1 ± 0,1
Мевалонат	106,3 ± 3,8* [#]	56,8 ± 3,1* [#]	60,7 ± 0,9* [#]	2,90 ± 0,20	4,1 ± 0,2 [†]	4,2 ± 0,2
Золедронат	84,9 ± 4,1 [#]	226,1 ± 0,8* [#]	72,4 ± 0,8	3,00 ± 0,10	4,4 ± 0,9	3,9 ± 0,2

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – базального уровня, # – без стимуляции БЦЖ.

лирующих М/Мф и резидентных тканевых Мф. В нашем исследовании в качестве первого стимула для формирования TI взята вакцина БЦЖ, а в качестве объекта исследования – пМф мышей BALB/c, опухолевые моноцитоподобные клетки человека линий THP-1, U-937. Показано, что наличие периода покоя между первым и вторым стимулом является необходимым условием формирования фенотипа TI, а мевалонат и золедронат способствуют этому. Полученные нами данные согласуются с результатами других авторов [2, 4, 8, 11].

При индукции в клетках TI изменяется не только метаболизм глюкозы, глутамин, но и цикл трикарбоновых кислот, продукция ацетилкоэнзима А, а также увеличивается синтез мевалоната, а это ведет к изменениям на уровне эпигенетического ремоделирования с перестройкой архитектуры хроматина, что позволяет увеличить транскрипцию генов и усилить провоспалительный иммунный ответ [12]. Метаболиты мевалонной кислоты важны не только для формирования TI (повышения их чувствительности к вторичной стимуляции), но и для жизнеобеспечения опухолевых клеток [13].

Накапливаются данные о наличии у бисфосфонатов, помимо препятствия резорбции костной ткани, влияния на клетки иммунной системы. Так, золедронат подавляет генерацию дендритных клеток из моноцитов *in vitro*, снижает индуцированную ЛПС активацию NF-κB, являющуюся критичной для дифференцировки дендритных клеток, подавления выраженности реакции смешанной культуры лимфоцитов, угнетения продукции моноцитами TNF-α и фагоцитоза [14]. Показано, что бисфосфонаты (алендронат и золедронат) снижают жизнеспособность клеток линии THP-1 и их дифференцировку в макрофаги [15].

Выводы

1. Вакцина БЦЖ индуцирует формирование в моноцитоподобных клеточных линиях человека (THP-1, U-937) фенотипа долговременной неспецифической иммунологической памяти (TI) как с наличием, так и с отсутствием лаг-фазы между первым и вторым стимулом.

2. Мевалонат и золедронат сами по себе и в сочетании с ЛПС усиливают синтез провоспалительных цитокинов в моноцитоподобных клеточных линиях человека.

3. Мевалонат и золедронат по-разному влияют на продукцию провоспалительных цитокинов праймированными вакциной БЦЖ *in vivo* перитонеальными макрофагами.

Список литературы/ References

1. Bekkering S., Domínguez-Andrés J., Joosten L.A.B., Riksen N.P., Netea M.G. Trained Immunity: Reprogramming Innate Immunity in Health and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2021;39:667–693. doi: 10.1146/annurev-immunol-102119-073855
2. Bekkering S., Blok B.A., Joosten L.A.B., Riksen N.P., van Crevel R., Netea M.G. *In vitro* experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. *Clin. Vaccine Immunol.* 2016;23(12):926–933. doi: 10.1128/CVI.00349-16
3. Cheng S.C., Quintin J., Cramer R.A., Shephardson K.M., Saeed S., Kumar V., Giamarellos-Bourboulis E.J., Martens J.H.A., Rao N.A., Aghajani-refah A., ... Netea M.G. mTOR/HIF1α-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science.* 2014;345(6204):1250684. doi: 10.1126/science.1250684
4. Sohrabi Y., Sonntag G.V.H., Braun L.C., Lagache S.M.M., Liebmann M., Klotz L., Godfrey R., Kahles F., Waltenberger J., Findeisen H.M. LXR acti-

- vation induces a proinflammatory trained innate immunity-phenotype in human monocytes. *Front. Immunol.* 2020;11:353. doi: 10.3389/fimmu.2020.00353
5. Mulder W.J.M., Ochando J., Joosten L.A.B., Fayad Z.A., Netea M.G. Therapeutic targeting of trained immunity. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019;18(7):553–566. doi: 10.1038/s41573-019-0025-4
6. Palgen J.L., Feraoun Y., Dzangué-Tchoupou G., Joly C., Martinon F., le Grand R., Beignon A.S. Optimize prime/boost vaccine strategies: trained immunity as a new player in the game. *Front. Immunol.* 2021;12:612747. doi: 10.3389/fimmu.2021.612747
7. Mourits V.P., Wijkmans J.C., Joosten L.A., Netea M.G. Trained immunity as a novel therapeutic strategy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2018;41:52–58. doi: 10.1016/j.coph.2018.04.007
8. Tercan H., Riksen N.P., Joosten L.A.B., Netea M.G., Bekkering S. Trained immunity: long-term adaptation in innate immune responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2021;41(1):55–61. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314212
9. Bekkering S., Arts R.J.W., Novakovic B., Kourtzelis I., van der Heijden C.D.C.C., Li Y., Popa C.D., Ter Horst R., van Tuijl J., Netea-Maier R.T., ... Netea M.G. Metabolic induction of trained immunity through the mevalonate pathway. *Cell.* 2018;172(1-2):135–146. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.025
10. Hoefert S., Hoefert C.S., Albert M., Munz A., Grimm M., Northoff H., Reinert S., Alexander D. Zoledronate but not denosumab suppresses macrophagic differentiation of THP-1 cells. An aetiologic model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Clin. Oral Investig.* 2015;19(6):1307–1318. doi: 10.1007/s00784-014-1358-3
11. Keating S.T., Groh L., van der Heijden C.D., Rodriguez H., dos Santos J.C., Fanucchi S., Okabe J., Kaipananickal H., van Puffelen J.H., Helder L., ... Riksen N.P. The set7 lysine methyltransferase regulates plasticity in oxidative phosphorylation necessary for trained immunity induced by β -glucan. *Cell Rep.* 2020;31(3):107548. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107548
12. Drummer C. 4th, Saoud F., Shao Y., Sun Y., Xu K., Lu Y., Ni D., Atar D., Jiang X., Wang H., Yang X. Trained immunity and reactivity of macrophages and endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2021;41(3): 1032–1046. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.315452
13. Gruenbacher G., Thurnher M. Mevalonate metabolism in cancer stemness and trained immunity. *Front Oncol.* 2018;8:394. doi: 10.3389/fonc.2018.00394
14. Wolf A.M., Rumpold H., Tilg H., Gastl G., Gunsilius E., Wolf D. The effect of zoledronic acid on the function and differentiation of myeloid cells. *Haematologica.* 2006;91(9):1165–1171.
15. Patntirapong S., Poolgesorn M. Alteration of macrophage viability, differentiation, and function by bisphosphonates. *Oral Dis.* 2018;24(7):1294–1302. doi: 10.1111/odi.12908

Информация об авторах:

Лыков Александр Петрович, к.м.н., ORCID: 0000-0003-4897-8676, e-mail: aplykov2@mail.ru
Белгородцев Сергей Николаевич, к.м.н., ORCID: 0000-0002-3481-3793, e-mail: s.belogorodtsev@mail.ru
Немкова Елизавета Кирилловна, ORCID: 0000-0003-2724-9546, e-mail: elizaveta.nemkova@mail.ru
Ветлугина Анна, ORCID: 0000-0002-1776-0466, e-mail: morpho.peleides.1997@gmail.com
Терехова Татьяна Михайловна, ORCID: 0000-0001-5313-7594, e-mail: t.terekhova98@gmail.com
Шварц Яков Шмульевич, д.м.н., ORCID: 0000-0002-3036-9795, e-mail: yshschwartz@mail.ru

Information about the authors:

Alexander P. Lykov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-4897-8676, e-mail: aplykov2@mail.ru
Sergei N. Belogorodtsev, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-3481-3793, e-mail: s.belogorodtsev@mail.ru
Elizaveta K. Nemkova, ORCID: 0000-0003-2724-9546, e-mail: elizaveta.nemkova@mail.ru
Anna Vetlugina, ORCID: 0000-0002-1776-0466, e-mail: morpho.peleides.1997@gmail.com
Tatjana M. Terekhova, ORCID: 0000-0001-5313-7594, e-mail: t.terekhova98@gmail.com
Yakov Sh. Schwartz, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0002-3036-9795, e-mail: yshschwartz@mail.ru

Поступила в редакцию 02.02.2023
После доработки 23.02.2023
Принята к публикации 03.03.2023

Received 02.02.2023
Revision received 23.02.2023
Accepted 03.03.2023