© Коллектив авторов, 2020

Будихина А.С.¹, Муругина Н.Е.¹, Максимчик П.В.², Дагиль Ю.А.¹,
Мельников М.В.^{1,3}, Балясова Л.С.¹, Муругин В.В.¹, Чкадуа Г.З.⁴,
Пинегин Б.В.¹, Пашенков М.В.¹

Аэробный гликолиз не играет незаменимой роли в продукции провоспалительных цитокинов дендритными клетками

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Российский научный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119997, г. Москва, Российская Федерация

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Активация клеток врожденного иммунитета сопровождается усилением процессов гликолиза, однако взаимосвязь гликолиза с конкретными параметрами врожденного иммунного ответа до конца не определена.

Цель работы – изучить взаимосвязь между процессами гликолиза и продукцией провоспалительных цитокинов дендритными клетками (ДК) при их активации липополисахаридом (ЛПС).

Материал и методы. ДК получали из моноцитов крови здоровых доноров и стимулировали ЛПС в присутствии различных сочетаний D-глюкозы, 2-дезоксид-глюкозы (2-ДГ) и D-маннозы. Продукцию цитокинов анализировали с помощью иммуноферментного анализа, экспрессию генов цитокинов – с помощью ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией, показатели гликолиза – с помощью анализатора метаболизма XFе96 в реальном времени.

Результаты. Показано, что аэробный гликолиз не играет незаменимой роли в продукции цитокинов ДК человека *in vitro*. При активации ЛПС макрофаги и ДК вырабатывают сопоставимые количества провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли (ФНО) и интерлейкина-6 (ИЛ-6), несмотря на гораздо меньшую интенсивность гликолиза в ДК. Ингибирование гликолиза с помощью глюкозного голодания (культивирования в среде без глюкозы) не оказывает достоверного влияния на продукцию ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-12p70 ЛПС-активированными ДК. В то же время 2-ДГ, широко используемая в качестве ингибитора гликолиза, подавляет продукцию этих же цитокинов ЛПС-активированными ДК, а также снижает жизнеспособность ДК. В отличие от глюкозного голодания, 2-ДГ вызывает развитие ответа на несложные белки [unfolded protein response (UPR)]. Устранение UPR с помощью избытка D-маннозы ослабляет негативные эффекты 2-ДГ на продукцию цитокинов и на жизнеспособность ДК.

Заключение. Полученные данные позволяют частично пересмотреть взгляды на роль гликолиза в развитии врожденного иммунного ответа.

Ключевые слова: дендритные клетки; макрофаги; гликолиз; 2-дезоксид-глюкоза; липополисахарид; цитокины; ответ на несложные белки

Статья поступила 30.01.2020. Принята в печать 20.02.2020.

Для цитирования: Будихина А.С., Муругина Н.Е., Максимчик П.В., Дагиль Ю.А., Мельников М.В., Балясова Л.С., Муругин В.В., Чкадуа Г.З., Пинегин Б.В., Пашенков М.В. Аэробный гликолиз не играет незаменимой роли в продукции провоспалительных цитокинов дендритными клетками. Иммунология. 2020; 41 (1): 31–41. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-31-41

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 16-15-10314-П.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Пашенков Михаил Владимирович –
доктор медицинских наук,
и.о. заведующего лабораторией
клинической иммунологии
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России, Москва,
Российская Федерация
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

Budikhina A.S.¹, Murugina N.E.¹, Maximchik P.V.², Dagil Yu.A.¹, Melnikov M.V.^{1,3}, Balyasova L.S.¹, Murugin V.V.¹, Chkadua G.Z.⁴, Pinegin B.V.¹, Pashenkov M.V.¹

Aerobic glycolysis is dispensable for pro-inflammatory cytokine production by dendritic cells

¹ National Research Center Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, 115522, Moscow, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University, 119192, Moscow, Russian Federation

³ Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU) of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 117997, Moscow, Russian Federation

⁴ Federal State Budgetary Scientific Institution «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Centre», Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 115478, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Activation of innate immune cells is accompanied by an increase in glycolysis; however, the links between glycolysis and specific parameters of innate immune response have not been conclusively established.

Aims – to study the relationship between glycolysis and proinflammatory cytokine production by dendritic cells (DCs) activated by lipopolysaccharide.

Material and methods. DCs were generated from blood monocytes of healthy donors and stimulated by LPS in the presence of different combinations of D-glucose, 2-deoxy-D-glucose (2-DG) and D-mannose. Cytokine production was analysed by enzyme-linked immunosorbent assay, cytokine gene expression by real-time PCR with reverse transcription, glycolysis by XFe96 real-time metabolism analyzer.

Results. We show that aerobic glycolysis is dispensable for pro-inflammatory cytokine production by human DCs *in vitro*. Upon activation with LPS, macrophages and DCs produce comparable amounts of the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-6 (IL-6), despite the much lower rate of glycolysis in DCs. Inhibition of glycolysis by glucose starvation (culturing in glucose-free medium) does not significantly affect TNF, IL-6 and IL-12p70 production by LPS-activated DCs. At the same time, 2-DG, a widely used glycolysis inhibitor, suppresses production of these cytokines by LPS-activated DCs and compromises their viability. Unlike glucose starvation, 2-DG induces an unfolded protein response (UPR). Cancellation of this UPR by an excess of D-mannose alleviates negative effects of 2-DG on DC cytokine production and viability.

Conclusion. Obtained data allow to partially revise current views on the role of glycolysis in the development of innate immune response.

Keywords: dendritic cells; macrophages; glycolysis; 2-deoxy-D-glucose; lipopolysaccharide; cytokines; unfolded protein response

Received 30.01.2020. Accepted 20.02.2020.

For citation: Budikhina A.S., Murugina N.E., Maximchik P.V., Dagil Yu.A., Melnikov M.V., Balyasova L.S., Murugin V.V., Chkadua G.Z., Pinegin B.V., Pashenkov M.V. Aerobic glycolysis is dispensable for pro-inflammatory cytokine production by dendritic cells. *Immunologiya*. 2020; 41 (1): 31–41. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-31-41 (in Russian)

Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation grant No. 16-15-10314-P.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interests.

Введение

Дендритные клетки (ДК) играют уникальную роль в иммунной системе, выступая в роли связующего звена между врожденным и адаптивным иммунитетом. ДК распознают микробную инвазию с помощью паттерн-распознающих рецепторов (ПРР) врожденного иммунитета [1]. В ДК, активированных через ПРР, происходит процессинг и представление микробных антигенов, повышается экспрессия костимуляторных молекул, запускается синтез провоспалительных цитокинов. Тем

самым ДК передают информацию о микробной инвазии клеткам адаптивной иммунной системы – CD4⁺ и CD8⁺-Т-клеткам, обеспечивая запуск адаптивного иммунного ответа [2].

Наряду с этими хорошо изученными процессами, активация ДК под действием агонистов ПРР сопровождается усилением гликолиза [3, 4], которое происходит несмотря на достаточное поступление кислорода в клетку и наличие благоприятных условий для окислительного фосфорилирования (ОФ). Интенсивный гли-

For correspondence

Mikhail V. Pashenkov – MD, PhD,
Deputy Head of the Laboratory
of Clinical Immunology,
NRC Institute of Immunology
FMBA of Russia, Moscow,
Russian Federation

E-mail: mvpashenkov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

колиз в условиях нормоксии носит название аэробного гликолиза. Усиление гликолиза при стимуляции агонистами ПРР происходит и в других типах клеток врожденного иммунитета, в частности в макрофагах [5–7]. Главный физиологический смысл усиления гликолиза состоит, по-видимому, в том, что клетки иммунной системы таким образом подготавливаются к попаданию в условия гипоксии, существующие в очаге воспаления, где гликолиз является основным источником АТФ. Однако в ряде работ были получены данные, что ингибирование аэробного гликолиза приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов различными типами клеток врожденного иммунитета, в том числе ДК [3, 4, 6, 8–10]. Из этого был сделан вывод об избирательной вовлеченности гликолиза в выработку провоспалительных цитокинов. Если это так, то переход на гликолиз не просто адаптирует клетки к нахождению в очаге воспаления, а необходим для развития самого воспаления [11].

Для блокирования гликолиза в экспериментах *in vitro* и *in vivo* обычно используют неметаболизируемый аналог глюкозы – 2-дезоксид-Д-глюкозу (2-ДГ) [3, 4, 6, 8–10]. Однако, помимо влияния на гликолиз, 2-ДГ нарушает процессы N-гликозилирования белков в эндоплазматическом ретикулуме, что вызывает перегрузку последнего неправильно сложенными белками и ведет к развитию так называемого ответа на несложенные белки (unfolded protein response, UPR) [12, 13]. UPR характеризуется значительными изменениями различных клеточных функций, в частности подавлением синтеза мРНК и белка [12, 14, 15]. В предыдущей работе мы показали, что ингибирующее влияние 2-ДГ на продукцию цитокинов человеческими макрофагами, активированными агонистами ПРР, обусловлено в первую очередь индукцией UPR, а не блокированием гликолиза [16]. Если для ингибирования гликолиза используется глюкозное голодание, то продукция цитокинов макрофагами меняется незначительно.

В настоящей работе мы показываем, что и в случае ДК человека гликолиз не играет незаменимой роли в продукции цитокинов.

Материал и методы

Реактивы. Рекомбинантные человеческие гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и интерлейкин-4 (ИЛ-4) были закуплены у фирмы Miltenyi Biotec (Германия), липополисахарид (ЛПС) *E.coli* O111:B4 – у Merck (США), 2-ДГ, D-манноза, D-глюкоза и олигомицин – у Sigma (США). В качестве полной культуральной среды (ПКС) использовали RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамин и 10 % фетальной телячьей сыворотки (все Life Technologies, Великобритания). ПКС без глюкозы готовили так же, но с использованием RPMI-1640, не содержащей глюкозы (Life Technologies, Великобритания).

Культивирование ДК и макрофагов. Незрелые ДК получали путем 6-суточного культивирования моноцитов крови здоровых доноров с ГМ-КСФ и ИЛ-4, как опи-

сано ранее [17, 18]. По истечении 6 сут клетки собирали, отмывали, ресуспендировали в нормальной ПКС или в ПКС без глюкозы. Для анализа продукции цитокинов ДК высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты по 20 000 клеток на 100 мкл среды на лунку, для анализа потребления глюкозы и высвобождения лактата – в 24-луночные планшеты (SPL Life Sciences, Республика Корея) в количестве 250 тыс. клеток на 500 мкл среды на лунку. В культуры добавляли ЛПС до конечной концентрации 100 нг/мл или эквивалентный объем культуральной среды (отрицательный контроль). 2-ДГ (10 или 50 мМ) и D-маннозу (10 или 50 мМ) вносили за 30 мин до внесения ЛПС. Планшеты инкубировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂ через необходимые промежутки времени собирали супернатанты и клеточные лизаты. В качестве контроля ставили эксперименты с макрофагами, которые получали от тех же доноров, что и ДК, путем культивирования моноцитов с ГМ-КСФ без добавления ИЛ-4 [17].

ПЦР в реальном времени. Экспрессию мРНК *TNF*, *IL6*, *TLR4*, *XBPI1*, *XBPIU*, *HSPA5*, *EIF2AK3*, *ERN1*, *DDIT3* и *ATF6* анализировали с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), как описано ранее [16]. Относительную экспрессию (ОЭ) генов рассчитывали по методу 2^{–ΔΔCt}. Референс-образцом, в которых ОЭ всех генов приравнивалась к 1, служили нестимулированные ДК данного донора. В качестве нормировочного гена использовали *GAPDH*.

Вестерн-блоттинг ставили по ранее описанной методике [17]. Использовали первичные кроличьи антитела к фосфорилированной форме фактора инициации трансляции eIF2α (pS51) и к белку XBP1 (Cell Signaling Technologies, США), а также вторичные антитела к иммуноглобулинам кролика, меченные пероксидазой (Jackson ImmunoResearch, США). Контролем загрузки служил α-тубулин, для определения которого использовали мышинные моноклональные антитела (клон DM1A) производства Novus Biologicals (США) и вторичные антитела к IgG1 мыши, меченные пероксидазой (Jackson ImmunoResearch, США).

Определение глюкозы, лактата и цитокинов в супернатантах клеточных культур. Концентрацию глюкозы в культуральных супернатантах и в ПКС определяли на биохимическом анализаторе Synchron CX5 Pro (Beckman Coulter, США), концентрацию лактата – с помощью набора реактивов фирмы Biovision (США). Потребление глюкозы и высвобождение лактата одной клеткой за 24 ч рассчитывали, как описано ранее [7]. Концентрации ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-12p70 в супернатантах определяли с помощью сэндвич-ИФА, используя наборы реактивов производства eBioscience (США) и «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия).

Анализ клеточного метаболизма в реальном времени. Скорость закисления внеклеточной среды (extracellular acidification rate, или ECAR, показатель гликолиза) и скорость потребления кислорода (oxygen consumption rate, или OCR, показатель митохондриального дыхания) измеряли на приборе Seahorse XFe96

Рис. 1. Характеристики энергетического метаболизма дендритных клеток (ДК) и макрофагов (МΦ)

Парные культуры ДК и макрофагов получали из моноцитов крови здоровых доноров. А и Б – кинетика скорости закисления среды (ECAR, график А) и потребления кислорода (OCR, график Б) макрофагами и ДК репрезентативного здорового донора (представлены $M \pm \sigma$ по 4 повторам). Пунктирная линия – момент впрыска среды, ЛПС и олигомицина. В и Г – базальные значения ECAR (В) и OCR (Г) культур ДК и макрофагов 7 доноров. Д и Е – площади под кривыми ECAR (Д) и OCR (Е) после добавления к клеткам среды или ЛПС (6 доноров). Ж и З – 24-часовое потребление глюкозы (Ж) и высвобождение лактата (З) ДК и макрофагами 10 доноров (Ж) и 6 доноров (З). На графиках В–З: каждый донор обозначен особым символом; горизонтальные линии – средние значения для групп; # $p = 0,07$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Analyzer (Agilent Technologies, США), как описано ранее [7]. Измерения проводили в среде XF base medium (Agilent Technologies, США) с добавлением 2 mM L-глутамин, 10 mM D-глюкозы (Sigma, США) и 10 % фетальной телячьей сыворотки. Интервалы между измерениями составляли 9 мин. Вычисляли два вида показателей: 1) базальные показатели ECAR и OCR (среднее значение двух последних измерений, предшествующих впрыску); 2) площади под кривыми «время–ответ» (AUC) после впрыска среды и ЛПС.

Анализ клеточной гибели. Для выявления погибших и жизнеспособных клеток использовали окрашивание трипановым синим, а также окрашивание ФИТЦ-меченным аннексином-V и пропидий-йодидом (eBioscience, США) с анализом на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). В последнем случае жизнеспособными считали клетки, не окрашивающиеся ни аннексином-V, ни пропидий-йодидом. Оба метода давали схожие результаты по процентному содержанию жизнеспособных клеток.

Статистика. Для статистической обработки результатов использовали программу GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software, США). Парные измерения сравнивали с помощью парного *t*-теста. При сравнении нескольких групп использовали ANOVA для парных измерений.

Результаты

ДК характеризуются более низкими уровнями спонтанного и индуцированного гликолиза, чем макрофаги

Для сопоставления энергетического метаболизма ДК и макрофагов, полученных от одних и тех же доноров, проанализировали скорость закисления среды и скорость потребления кислорода клетками – показатели, соответственно, гликолиза и митохондриального дыхания. Анализ проводили в реальном времени до и после впрыска ЛПС в культуральную среду (рис. 1А, Б). По сравнению с макрофагами, ДК характеризовались существенно более низкой базальной скоростью закисления среды (до впрыска ЛПС; рис. 1А, В) и существенно меньшим ее повышением после добавления ЛПС (рис. 1А, Д). Скорость потребления кислорода ДК и макрофагами в базальных условиях была сопоставимой и существенно не менялась после впрыска ЛПС (рис. 1Б, Г, Е).

Для оценки гликолитического резерва использовали олигомицин – ингибитор митохондриальной АТФ-синтазы, вынуждающий клетки для поддержания выработки АТФ задействовать максимально возможный уровень гликолиза. Олигомицин резко снижал потребление кислорода как ДК, так и макрофагами (рис. 1Б); при этом в макрофагах скорость закисления среды выходила на новый, более высокий стационарный уровень, а в ДК имел место лишь преходящий «всплеск» этого показателя с возвратом к исходным значениям (рис. 1А). Кроме того, ДК потребляли существенно меньше глюкозы и высвобождали меньше лактата, чем макрофаги, причем как в базальных условиях, так и при стимуля-

ции ЛПС (рис. 1Ж, З). Полученные данные говорят о невысокой интенсивности гликолиза в ДК по сравнению с макрофагами.

ДК способны вырабатывать существенные количества провоспалительных цитокинов, несмотря на низкий уровень гликолиза

Одной из причин низкого гликолитического ответа ДК на ЛПС могла быть более низкая экспрессия рецептора TLR4. Однако, по данным ПЦР-РВ, экспрессия мРНК TLR4 в парных образцах ДК и макрофагов была сопоставимой (рис. 2А). Кроме того, ЛПС вызывал сопоставимую продукцию ФНО и ИЛ-6 двумя типами клеток (рис. 2Б, В), тогда как ЛПС-индуцированная продукция ИЛ-12p70 у ДК была значительно выше, чем у макрофагов (рис. 2Г). Таким образом, ДК при стимуляции ЛПС способны вырабатывать высокие уровни провоспалительных цитокинов при сравнительно невысоких уровнях гликолиза.

2-ДГ и глюкозное голодание по-разному влияют на продукцию цитокинов ДК

Ранее мы показали, что 2-ДГ оказывает значительное модулирующее действие на продукцию ФНО, ИЛ-6 и про-ИЛ-1 β макрофагами, активированными агонистами NOD1 и TLR4, тогда как глюкозное голодание (культивирование в среде без глюкозы) не оказывает значимого эффекта на продукцию этих же цитокинов, при том что оба подхода ингибируют гликолиз одинаково эффективно [16]. При изучении влияния ингибиторов гликолиза на ЛПС-индуцированную продукцию цитокинов ДК выявились схожие тенденции: 2-ДГ подавляла выработку ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-12p70, тогда как глюкозное голодание практически не влияло на продукцию этих цитокинов в течение 24 ч после добавления ЛПС (рис. 2Д, Е, Ж). Чтобы подробнее охарактеризовать действие 2-ДГ на ЛПС-индуцированную продукцию ФНО, изучили кинетику экспрессии мРНК *TNF* в ДК. Оказалось, что под действием 2-ДГ она меняется незначительно (рис. 2З). Это говорит о преимущественном воздействии 2-ДГ на этап трансляции мРНК цитокинов, что согласуется с данными, полученными другими авторами на модели мышинных ДК [3].

2-ДГ вызывает развитие UPR в ДК

Стереоизомером D-глюкозы является D-манноза, отличающаяся от D-глюкозы расположением атома кислорода при 2-м атоме углерода. Поскольку в молекуле 2-ДГ этот атом кислорода отсутствует, с химической точки зрения 2-ДГ идентична 2-дезоксид-маннозе и является антагонистом D-маннозы. Поскольку D-манноза необходима для N-гликозилирования белков, 2-ДГ ингибирует не только гликолиз, но и N-гликозилирование белков в эндоплазматическом ретикулуме, вызывая его перегрузку неправильно сложенными белками и развитие UPR [12]. В предыдущей работе мы показали, что модулирующее влияние 2-ДГ на выработку цитокинов макрофагами обусловлено именно индукцией UPR [16]. 2-ДГ оказывала аналогичное действие и на

Рис. 2. Продукция провоспалительных цитокинов ДК в сопоставлении с макрофагами тех же доноров и влияние 2-ДГ и глюкозного голодания на продукцию цитокинов

А – экспрессия мРНК TLR4 парными культурами ДК и макрофагов. Б, В, и Г – уровни ФНО (Б), ИЛ-6 (В) и ИЛ-12p70 (Г) в супернатантах ДК и макрофагов без стимуляции и при стимуляции ЛПС в течение 3 и 24 ч. Показаны индивидуальные значения, средние значения и стандартные отклонения групп. Д, Е и Ж – влияние 2-ДГ (50 мМ) и глюкозного голодания на продукцию ФНО (Д), ИЛ-6 (Е) и ИЛ-12p70 (Ж) дендритными клетками (уровни цитокинов в супернатантах через 3 и 24 ч после добавления ЛПС). З – влияние 2-ДГ на кинетику экспрессии мРНК TNF ЛПС-стимулированными ДК ($M \pm \sigma$, $n = 3$). Значения достоверности: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; н.д. – недостоверно ($p > 0,05$).

ДК: в присутствии 2-ДГ происходило значительное (на 1–2 порядка) повышение экспрессии мРНК нескольких маркеров UPR, включая *XBP1S*, *XBP1U*, *HSPA5* (BiP), *EIF2AK3* (PERK), *ERN1* (IRE-1 α) и *DDIT3* (CHOP) (рис. 3А); повышался уровень фосфорилированного по серину-51 фактора инициации трансляции eIF2 α (данное фосфорилирование обеспечивает ингибирование трансляции при UPR); повышался уровень фактора транскрипции XBP1 (этот белок транслируется на матрице сплайсированной мРНК *XBP1S* и участвует в запуске транскрипционного ответа на UPR) (рис. 3Б, В). Глюкозное голодание, напротив, не влияло на уровни XBP1 и фосфо-eIF2 α (рис. 3В).

2-ДГ вызывает гибель значительной части ДК в течение 24 ч

При культивировании ДК с 2-ДГ вплоть до 9 ч с начала эксперимента жизнеспособность ДК существенно не менялась (данные не представлены), однако через 24 ч отмечалось резкое снижение доли жизнеспособных клеток (рис. 4). Гибель ДК происходила независимо от сопутствующей стимуляции ЛПС. В условиях глюкозного голодания жизнеспособность ДК существенно не менялась. Интересно, что 2-ДГ лишь незначительно влияла на жизнеспособность макрофагов (рис. 4), что было отмечено нами и в предыдущей работе [16].

Рис. 3. 2-ДГ индуцирует UPR в ДК

А – кинетика экспрессии мРНК маркеров UPR дендритными клетками в присутствии 2-ДГ (50 мМ) и ЛПС (100 нг/мл). Показаны результаты одного опыта из трех со схожими результатами. Б – уровни фосфо-eIF2 α после 30-минутной инкубации с/без 2-ДГ и последующей 1- и 2-часовой инкубации с/без ЛПС (1 репрезентативный опыт из 3). В – влияние 2-ДГ, маннозы и глюкозного голодания на уровень белка XBP1 и фосфорилирование eIF-2 α в ДК (1 эксперимент из 2 со схожими результатами).

Рис. 4. Жизнеспособность ДК и макрофагов одного и того же донора после 24 ч культивирования в присутствии 2-ДГ или в условиях глюкозного голодания

1 репрезентативный эксперимент из 3, на графиках указаны проценты жизнеспособных клеток (не окрашенных аннексином-V или пропидий-йодидом). Схожие результаты получены при подсчете клеток с трипановым синим (данные не представлены).

D-манноза отменяет или ослабляет эффекты 2-ДГ на ДК

Поскольку 2-ДГ индуцирует UPR, выступая как антагонист D-маннозы, эффекты 2-ДГ на продукцию цитокинов и жизнеспособность ДК должны отменяться избытком D-маннозы [12, 13]. Действительно, добавление D-маннозы отменяло или ослабляло влияние 2-ДГ на экспрессию маркеров UPR (рис. 3Б), на ЛПС-индуцированную продукцию цитокинов (рис. 5А–Г) и на жизнеспособность ДК (рис. 5Д).

Обсуждение

Аэробный гликолиз является характерной чертой метаболизма опухолевых клеток и активированных клеток иммунной системы, соединяя в себе функции источника энергии (АТФ) и поставщика исходных метаболитов для биосинтетических процессов [11, 19]. Повышенный уровень гликолиза позволяет клеткам врожденного иммунитета выживать при попадании в условия гипоксии, имеющие место в очагах воспаления, поскольку гликолиз является единственным процессом, генерирующим АТФ независимо от ОФ. Функция гликолиза как поставщика метаболитов (углеродного «скелета») для биосинтетических процессов реализуется многочисленными

способами, в частности: 1) через окислительное декарбоксилирование пирувата – конечного продукта гликолиза – до ацетил-коэнзима А, который является исходным метаболитом в синтезе жирных кислот и холестерина, а также питает цикл Кребса, из которого изымаются метаболиты для синтеза аминокислот; 2) через превращение пирувата в L-аланин в реакции трансаминирования; 3) через поступление глюкозо-6-фосфата – первого промежуточного метаболита гликолиза – в пентозофосфатный путь, обеспечивающий синтез пентоз для построения нуклеиновых кислот.

Хотя гликолиз может обеспечивать метаболическую поддержку различных направлений активации и дифференцировки клеток иммунной системы, сформировалось представление об избирательной вовлеченности аэробного гликолиза в синтез медиаторов воспаления, в частности провоспалительных цитокинов. Это представление во многом основано на экспериментах с 2-ДГ, в которых этот неметаболизируемый аналог глюкозы подавлял продукцию различных провоспалительных цитокинов моноцитами, макрофагами и ДК [3, 4, 6, 8–10]. Однако в этих работах не принималось в расчет, что 2-ДГ не только ингибирует гликолиз, но и нарушает N-гликозилирование белков в эндоплазматическом ретикулуме.

ческом ретикулуме и тем самым индуцирует UPR [12]. Одним из основных проявлений UPR является общее подавление синтеза белков, к числу которых относятся и цитокины [14]. Интересно, что при этом не ингибируется трансляция ряда белков, участвующих в реализации транскрипционной программы UPR, что позволяет клетке адекватно отвечать на накопление несложных белков в эндоплазматическом ретикулуме [20]. Наряду с индукцией UPR 2-ДГ может нарушать гликозилирование самих молекул цитокинов, что может влиять на их секрецию и биологическую активность. Одним из исходов UPR при достаточной длительности этого состояния является клеточная гибель (апоптоз) [14], что, очевидно, наблюдалось и в нашем случае на модели ДК.

Результаты нашей работы показывают, что роль аэробного гликолиза в выработке провоспалительных цитокинов клетками врожденного иммунитета не столь критична, как принято думать. На это указывают несколько обстоятельств: 1) ДК и макрофаги при активации ЛПС вырабатывают сопоставимые количества цитокинов, несмотря на значительно меньшую интенсивность гликолиза в ДК (рис. 2); 2) если для ингибирования гликолиза используется не 2-ДГ, а глюкозное

голодание (т.е. прекращение притока глюкозы в клетку), ЛПС-индуцированная продукция цитокинов ДК (рис. 2) и макрофагами [16] существенно не меняется по сравнению с продукцией этих же цитокинов в условиях достаточного количества глюкозы; 3) D-манноза, отменяя 2-ДГ-индуцированный UPR, ослабляет и эффекты 2-ДГ на продукцию цитокинов и на жизнеспособность ДК; тем самым подтверждается, что модулирующее действие 2-ДГ на функции ДК по крайней мере частично обусловлено индукцией UPR. Тем не менее, поскольку D-манноза не полностью отменяет эффекты 2-ДГ на продукцию цитокинов, можно предположить дополнительные, не связанные с ингибированием гликолиза или индукцией UPR, механизмы действия 2-ДГ.

В целом, как ДК, так и МФ в условиях нормоксии справляются с дефицитом глюкозы как минимум в течение 24 ч (продолжительность глюкозного голодания в наших экспериментах). Можно предположить, что функции гликолиза в этих условиях компенсируются другими метаболическими путями. Так, альтернативным источником ацетил-коэнзима А, а также альтернативным источником электронов для ОФ является β -окисление жирных кислот. Глутаминолиз через обра-

Рис. 5. Влияние D-маннозы на изменения продукции цитокинов и жизнеспособности ДК, вызванные 2-ДГ

ДК инкубировали в течение 30 мин в присутствии указанных концентраций 2-ДГ и D-маннозы, затем добавляли ЛПС и культивировали в течение 3 и 24 ч, после чего оценивали уровни ФНО (А, Б), ИЛ-6 (В) и ИЛ-12p70 (Г) в супернатантах. Жизнеспособность ДК оценивали через 24 ч путем подсчета неокрашенных клеток с трипановым синим (Д). На всех графиках показаны $M \pm \sigma$ по 3 экспериментам; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

зование α -кетоглутарата питает цикл Кребса и поддерживает ОФ.

Обсуждая результаты работы, необходимо сделать следующие оговорки. Во-первых, мы не использовали глюкозное голодание длительностью свыше 24 ч. Возможно, при большей продолжительности глюкозного голодания его влияние на продукцию цитокинов и жизнеспособность клеток будет сильнее. По нашим предварительным данным, макрофаги в условиях глюкозного голодания и нормоксии сохраняют жизнеспособность в течение 3 сут, однако затем начинается процесс их гибели, так что к 14-м суткам большинство клеток погибает (неопубликованные данные). Тем не менее, поскольку ДК и макрофаги продуцируют провоспалительные цитокины в основном в течение первых суток после активации [21], снижение жизнеспособности в более поздние сроки вряд ли способно существенно повлиять на общее количество вырабатываемых цитокинов. Во-вторых, эксперименты

в данной работе проводили в условиях нормоксии. Ингибирование гликолиза в условиях гипоксии оказывает гораздо более выраженный и быстрый негативный эффект как на продукцию цитокинов, так и на жизнеспособность макрофагов [16] и, вероятно, других клеток врожденного иммунитета. В-третьих, мы изучили влияние глюкозного голодания только на синтез цитокинов. Представляет интерес исследовать эффекты глюкозного голодания на образование липидных медиаторов воспаления (простагландинов, лейкотриенов), на синтез антимикробных метаболитов, в частности итаконата, а также на другие функции клеток, такие как фагоцитоз, миграция, процессинг и представление антигенов.

Таким образом, в работе показано, что гликолиз не играет незаменимой роли в продукции цитокинов дендритными клетками. Полученные данные позволяют частично пересмотреть взгляды на место гликолиза в развитии врожденного иммунного ответа.

■ Литература

1. Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., Malefyt R.W., Kastelein R.A., Bazan F. et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 2001; 194 (6): 863–9.
2. Хаитов Р.М., Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Роль паттерн-распознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете. *Иммунология* 2009; 30 (1): 66–76.
3. Everts B., Amiel E., Huang S.C., Smith A.M., Chang C.H., Lam W.Y. et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKepsilon supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.* 2014; 15 (4): 323–32.
4. Everts B., Amiel E., van der Windt G.J., Freitas T.C., Chott R., Yarasheski K.E. et al. Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood.* 2012; 120 (7): 1422–31.
5. Rodriguez-Prados J.C., Traves P.G., Cuenca J., Rico D., Aragonés J., Martin-Sanz P. et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J. Immunol.* 2010; 185 (1): 605–14.
6. Na Y.R., Gu G.J., Jung D., Kim Y.W., Na J., Woo J.S. et al. GM-CSF induces inflammatory macrophages by regulating glycolysis and lipid metabolism. *J. Immunol.* 2016; 197 (10): 4101–9.
7. Муругина Н.Е., Балясова Л.С., Будихина А.С., Максимчик П.В., Дагиль Ю.А., Муругин В.В. и др. Метаболическое репрограммирование макрофагов при их активации агонистом рецептора NOD1. *Иммунология.* 2019; 40 (1): 5–14.
8. Dietl K., Renner K., Dettmer K., Timischl B., Eberhart K., Dorn C. et al. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J. Immunol.* 2010; 184 (3): 1200–9.
9. Hu K., Yang Y., Lin L., Ai Q., Dai J., Fan K. et al. Caloric restriction mimetic 2-deoxyglucose alleviated inflammatory lung injury via suppressing nuclear pyruvate kinase M2-signal transducer and activator of transcription 3 pathway. *Front. Immunol.* 2018; 9: 426.
10. Tannahill G.M., Curtis A.M., Adamik J., Palsson-McDermott E.M., McGettrick A.F., Goel G. et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature.* 2013; 496 (7444): 238–42.
11. O'Neill L.A., Pearce E.J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J. Exp. Med.* 2015; 213 (1): 15–23.
12. Xi H., Kurtoglu M., Lampidis T.J. The wonders of 2-deoxy-D-glucose. *IUBMB Life.* 2014; 66 (2): 110–21.
13. Maximchik P., Abdrakhmanov A., Inozemtseva E., Tyurin-Kuzmin P.A., Zhivotovsky B., Gogvadze V. 2-Deoxy-D-glucose has distinct and cell line-specific effects on the survival of different cancer cells upon antitumor drug treatment. *FEBS J.* 2018; 285 (24): 4590–601.
14. Grootjans J., Kaser A., Kaufman R.J., Blumberg R.S. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2016; 16 (8): 469–84.
15. Smith J.A. Regulation of cytokine production by the unfolded protein response; implications for infection and autoimmunity. *Front. Immunol.* 2018; 9: 422.
16. Будихина А.С., Муругина Н.Е., Максимчик П.В., Дагиль Ю.А., Николаева А.М., Балясова Л.С. и др. О роли гликолиза в продукции провоспалительных цитокинов макрофагами. *Иммунология.* 2019; 40 (5): 11–22.
17. Pashenkov M.V., Balyasova L.S., Dagil Y.A., Pinenin B.V. The role of the p38-MNK-eIF4E signaling axis in TNF production downstream of the NOD1 receptor. *J. Immunol.* 2017; 198 (4): 1638–48.
18. Sallusto F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 1994; 179 (4): 1109–18.
19. O'Neill L.A., Kishton R.J., Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* 2016; 16 (9): 553–65.
20. Jackson R.J., Hellen C.U., Pestova T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010; 11 (2): 113–27.
21. Langenkamp A., Messi M., Lanzavecchia A., Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 2000; 1 (4): 311–6.

■ References

1. Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., Malefyt R.W., Kastelein R.A., Bazan F., et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 2001; 194 (6): 863–9.
2. Khaikov R.M., Pinenin B.V., Pashenkov M.V. Role of pattern recognition receptors in innate and adaptive immunity. *Immunologiya.* 2009; 30 (1): 66–76. (in Russian)
3. Everts B., Amiel E., Huang S.C., Smith A.M., Chang C.H., Lam W.Y., et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKepsilon supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.* 2014; 15 (4): 323–32.
4. Everts B., Amiel E., van der Windt G.J., Freitas T.C., Chott R., Yarasheski K.E., et al. Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood.* 2012; 120 (7): 1422–31.

5. Rodriguez-Prados J.C., Traves P.G., Cuenca J., Rico D., Aragonés J., Martín-Sanz P., et al. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J. Immunol.* 2010; 185 (1): 605–14.
6. Na Y.R., Gu G.J., Jung D., Kim Y.W., Na J., Woo J.S., et al. GM-CSF induces inflammatory macrophages by regulating glycolysis and lipid metabolism. *J. Immunol.* 2016; 197 (10): 4101–9.
7. Murugina N.E., Balyasova L.S., Budikhina A.S., Maximchik P.V., Dagil Yu.A., Murugin V.V., Chkadua G.Z., Pinegin B.V., Pashenkov M.V. Metabolic reprogramming of macrophages upon activation with a NOD1 receptor agonist. *Immunologiya.* 2019; 40 (1): 5–14. (in Russian)
8. Dietl K., Renner K., Dettmer K., Timischl B., Eberhart K., Dorn C., et al. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J. Immunol.* 2010; 184 (3): 1200–9.
9. Hu K., Yang Y., Lin L., Ai Q., Dai J., Fan K., et al. Caloric restriction mimetic 2-deoxyglucose alleviated inflammatory lung injury via suppressing nuclear pyruvate kinase M2-signal transducer and activator of transcription 3 pathway. *Front. Immunol.* 2018; 9: 426.
10. Tannahill G.M., Curtis A.M., Adamik J., Palsson-McDermott E.M., McGettrick A.F., Goel G., et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature.* 2013; 496 (7444): 238–42.
11. O'Neill L.A., Pearce E.J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J. Exp. Med.* 2015; 213 (1): 15–23.
12. Xi H., Kurtoglu M., Lampidis T.J. The wonders of 2-deoxy-D-glucose. *IUBMB Life.* 2014; 66 (2): 110–21.
13. Maximchik P., Abdrakhmanov A., Inozemtseva E., Tyurin-Kuzmin P.A., Zhivotovsky B., Gogvadze V. 2-Deoxy-D-glucose has distinct and cell line-specific effects on the survival of different cancer cells upon antitumor drug treatment. *FEBS J.* 2018; 285 (24): 4590–601.
14. Grootjans J., Kaser A., Kaufman R.J., Blumberg R.S. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2016; 16 (8): 469–84.
15. Smith J.A. Regulation of cytokine production by the unfolded protein response; implications for infection and autoimmunity. *Front. Immunol.* 2018; 9: 422.
16. Budikhina A.S., Murugina N.E., Maximchik P.V., Dagil Yu.A., Nikolaeva A.M., Balyasova L.S., Murugin V.V., Chkadua G.Z., Pinegin B.V., Pashenkov M.V. On the role of glycolysis in pro-inflammatory cytokine production by macrophages. *Immunologiya.* 2019; 40 (5): 11–22. (in Russian)
17. Pashenkov M.V., Balyasova L.S., Dagil Y.A., Pinegin B.V. The role of the p38-MNK-eIF4E signaling axis in TNF production downstream of the NOD1 receptor. *J. Immunol.* 2017; 198 (4): 1638–48.
18. Sallusto F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 1994; 179 (4): 1109–18.
19. O'Neill L.A., Kishton R.J., Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* 2016; 16 (9): 553–65.
20. Jackson R.J., Hellen C.U., Pestova T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010; 11 (2): 113–27.
21. Langenkamp A., Messi M., Lanzavecchia A., Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 2000; 1 (4): 311–6.