



# **БЕЛКИ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПРИ ТУБЕРКУЛЁЗЕ ЛЁГКИХ**

М.В. Ерохина,  
Л.Н. Лепеха,  
Е.Н. Павлова,  
А.Э. Эргешов

МОСКВА  
2025

УДК 616-002.5  
57.085.23  
577.29  
ББК 55.4  
Ф 94

**Рецензент:**

Академик РАН *В.И. Литвинов*,  
научный руководитель ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулёзом  
Департамента здравоохранения г. Москвы»

**Ерохина М.В., Лепеха Л.Н., Павлова Е.Н., Эргешов А.Э.** Белки множественной лекарственной устойчивости при туберкулёзе лёгких.  
– Москва: Издательство РАН, – 2025. – 162 с.

В монографии впервые представлены собственные оригинальные исследования, позволившие научно обосновать актуальность изучения при туберкулёзе лёгких особой группы белков-транспортёров, получивших название белков множественной лекарственной устойчивости (белков МЛУ). Цель данной монографии – обобщить и структурировать знания о белках МЛУ применительно к разным аспектам развития и лечения такого социально значимого заболевания, как туберкулёз лёгких. Представленные сведения вносят свой вклад в разработку инновационных стратегий в терапии этого сложного инфекционного заболевания. Это открывает новые возможности для повышения эффективности химиотерапии туберкулёза органов дыхания. Монография представляет интерес для исследователей в области фтизиатрии, патоморфологии, иммунологии, микробиологии, клеточной биологии, молекулярной генетики, фармакогенетики, фармакологии, практикующих врачей, преподавателей и студентов медицинских факультетов и ВУЗов.

*Владиславу Всеволодовичу Ерохину—  
дорогому Учителю,  
выдающемуся Ученому,  
замечательному Человеку  
посвящается наше исследование.*

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ОБ АВТОРАХ</b> .....	
<b>ПРЕДИСЛОВИЕ</b> .....	7
<b>ГЛАВА 1. ЧТО МЫ ЗНАЕМ О БЕЛКАХ-ТРАНСПОРТЁРАХ, ОПОСРЕДУЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ</b> .....	9
1.1. История открытия белков МЛУ и их структурные особенности.....	9
1.2. Субстратная «всеядность» P-gr, MRP1, BCRP.....	14
1.3. Локализация и функциональная активность P-gr, MRP1, BCRP в клетках лёгких.....	19
1.4. Белки МЛУ и противотуберкулёзные препараты.....	24
1.5. Полиморфизмы генов белков МЛУ и их клиническая значимость.....	27
1.6. Заключение к главе 1.....	32
<b>ГЛАВА 2. БЕЛКИ МЛУ В КЛИНИКЕ ТУБЕРКУЛЁЗА ЛЁГКИХ</b> .....	34
2.1. Особенности гранулематозной реакции и белки МЛУ при туберкулёзе.....	34
2.2. Морфологическая характеристика туберкулём, визуализация <i>M. tuberculosis</i> и анализ экспрессии генов белков МЛУ.....	41
2.3. Взаимосвязь экспрессии генов P-gr и цитокинов при разной активности туберкулёзного процесса.....	53
2.4. Заключение к главе 2.....	58
<b>ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИГНАТУРЫ, СВЯЗАННЫЕ С БЕЛКОМ-ТРАНСПОРТЁРОМ P-GP</b> .....	60
3.1. Расширенный молекулярно-генетический анализ как характеристика воспаления при туберкулёме лёгкого.....	60
3.2. Молекулярно-генетические сигнатуры, связанные с высокой и низкой экспрессией гена P-gr.....	61
3.3. Заключение к главе 3.....	72
<b>ГЛАВА 4. БЕЛКИ МЛУ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЁЗНОМ ВОСПАЛЕНИИ И ЕГО ХИМИОТЕРАПИИ</b> .....	73
4.1. Гистологическая характеристика туберкулёзного воспаления у мышей в динамике развития и после химиотерапии.....	74
4.2. Анализ экспрессии генов P-gr, Mrp1, Bcrp.....	79
4.3. Заключение к главе 4.....	84

<b>ГЛАВА 5. МОДЕЛИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ P-GR В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ <i>in vitro</i></b> .....	85
5.1. Модулирование функциональной активности P-gr.....	86
5.2. Митохондрии, тест для оценки активности P-gr.....	88
5.3. Заключение к главе 5.....	91
<b>ГЛАВА 6. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ РИФАМПИЦИНА ИЛИ БЕДАКВИЛИНА НА БЕЛОК МЛУ P-GR</b> .....	92
6.1. Активность P-gr в провоспалительных макрофагах человека в условиях действия противотуберкулёзных препаратов.....	93
6.2. Влияние <i>M. tuberculosis</i> на экспрессию гена P-gr и фенотип макрофагов.....	103
6.3. Инкапсулированная лекарственная форма рифампицина и её влияние на P-gr.....	104
6.4. Сравнительная характеристика иммуномодулирующих свойств рифампицина и бедаквилина.....	112
6.5. Заключение к главе 6.....	117
<b>ГЛАВА 7. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ БЕЛКА МЛУ P-GR В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА</b> .....	118
7.1. Влияние P-gr на экспрессию генов и секрецию цитокинов.....	119
7.2. Эффект ингибирования P-gr на активность макрофагов при действии рифампицина.....	121
7.3. Эффект ингибирования P-gr на активность макрофагов при действии бедаквилина.....	122
7.4. Влияние P-gr на экспрессию генов фагоцитарных рецепторов в макрофагах.....	124
7.5. Ингибирование P-gr и фагоцитарная активность макрофагов в условиях действия рифампицина или бедаквилина.....	126
7.6. Заключение к главе 7.....	130
<b>ГЛАВА 8. ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	131
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	136

## ОБ АВТОРАХ

**Ерохина Мария Владиславовна** – доктор биологических наук, доцент, заместитель заведующего кафедрой клеточной биологии и гистологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»; заведующая лабораторией клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза», г. Москва

**Лепеха Лариса Николаевна** – доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки Российской Федерации, главный научный сотрудник отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза», г. Москва

**Павлова Екатерина Николаевна** – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», г. Москва

**Эргешов Атаджан Эргешович** – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, директор ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза»; профессор кафедры фтизиопульмонологии ФГБОУ ВО «Российский университет медицины», г. Москва

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Благодаря научному и технологическому прогрессу в медицине, реализации фундаментально-прикладных исследований во фтизиатрии стала возможна ранняя диагностика туберкулёзной инфекции, созданы все условия для своевременной терапии заболевания как уже известными, так и новыми противотуберкулёзными препаратами. Тем не менее, в последние годы в разных регионах мира, в том числе и в Российской Федерации, возрастает доля туберкулёза, вызываемого штаммами возбудителя с множественной лекарственной устойчивостью. Поэтому сегодня остро стоит вопрос о поиске новых стратегий повышения эффективности лечения таких больных.

Важным дополнением к традиционной химиотерапии могут стать современные подходы, направленные на организм «хозяина» – самого пациента. В рамках этого направления осуществляется поиск новых прогностических биомаркеров и перспективных мишеней для фармакологического воздействия на клетки пациента, а также способов повышения биодоступности необходимых лекарственных средств при туберкулёзе лёгких. В этой связи особое внимание привлекают белки множественной лекарственной устойчивости (белки МЛУ) и, в особенности, их представитель – Р-гликопротеин (Р-gp). Эти белки относятся к семейству АТФ-связывающих белков-экспортеров, функциональная активность которых препятствует накоплению в клетках лекарственных препаратов. По данным ресурса Drugbank число веществ, с которыми взаимодействует только Р-gp, уже достигает более 600 наименований. Его ингибирование приводит к значительному повышению эффективности противотуберкулёзных препаратов, что подтверждает актуальность создания и углублённого всестороннего изучения этого нового научно-практического направления во фтизиатрии. Оно требует понимания разных аспектов, особенностей распределения и функциональной активности белков МЛУ в клетках-мишенях больного туберкулёзом и является важным шагом на пути к персонализированной медицине.

Цель данной монографии – обобщить и структурировать знания о белках МЛУ применительно к разным особенностям развития и лечения такого социально значимого заболевания, как туберкулёз лёгких, победа над которым является одной из приоритетных задач современной медицины.

Уважаемые коллеги и друзья, хочу подчеркнуть, что инициатором и создателем этого направления в нашей стране является выдающийся ученый, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки Владислав Всеволодович Ерохин. Он был у истоков развития современных фундаментальных направлений во фтизиатрии, результаты которых успешно внедрялись в клиническую практику и способствовали своевременной диагностике и оптимизации лечения туберкулёза, что было его личным устремлением как фтизиоморфолога, руководителя различных подразделений Центрального НИИ туберкулёза, а затем и директора этого многопрофильного института.

Владислава Всеволодовича всегда отличали искренняя доброжелательность и внимание как в отношении к своим сотрудникам и ученикам, так и ко всем, кто нуждался в совете и поддержке. Его замечательная фраза: «Всё будет хорошо!» – внушала оптимизм и уверенность в успехе. Он всегда находил время для личного общения и обсуждения различных научных исследований, особенно, если они касались приоритетных направлений фтизиопульмонологии. В последние 10 лет проблема белков МЛУ получила дальнейшее развитие, различные аспекты которого мы, его ученики, постарались изложить в нашей монографии.

*Директор ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза», член-корреспондент Российской академии наук, А.Э. Эргешов*



## ГЛАВА 1

### ЧТО МЫ ЗНАЕМ О БЕЛКАХ-ТРАНСПОРТЁРАХ, ОПОСРЕДУЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННУЮ УСТОЙЧИВОСТЬ

#### 1.1 История открытия белков МЛУ и их структурные особенности

Изучение белков, относящихся к суперсемейству АТФ-связывающих транспортёров (*АТФ Binding Cassette*, АВС-транспортёры) в настоящее время является одним из активно развивающихся научных направлений. Во многом это связано с открытием многочисленных белков (более 300) данного семейства у представителей разных филогенетических групп. Реализация программы «Геном человека» позволила выявить не менее 50 генов, кодирующих белки этого семейства в организме человека. В настоящее время признано, что АТФ-связывающие белки-транспортёры составляют одно из крупнейших семейств мембранных белков и играют ключевую роль не только во многих физиологических процессах при различных патологиях, но и в развитии такого феномена, как формирование «множественной лекарственной устойчивости» (МЛУ) клеток человека.

Открытие белков этого суперсемейства началось в 70-х годах прошлого века с исследования импорта питательных веществ у бактерии *Escherichia coli*. Было показано, что транспорт субстратов происходит в результате гидролиза АТФ (Berger and Heppel, 1974). Одновременно с открытием транспортёров у бактерий произошло другое открытие, которое стало прорывом в понимании механизмов, обеспечивающих выживаемость опухолевых клеток человека – обнаружение и изучение первого АТФ-связывающего транспортёра в клетках млекопитающих. Это открытие произошло в результате культивирования клеток яичника китайского хомячка (СНО) в присутствии противоопухолевого препарата колхицина, который блокирует сборку микротрубочек. В результате такого культивирования клетки СНО приобрели резистентность к колхицину, которая была связана с появлением на плазматической мембране белка с молекулярной массой 170 кДа, что привело к открытию Р-gp (Juliano and Ling, 1976; Riordan and Ling, 1979). После расшифровки гена Р-gp, получившего изначально название *MDR1* (*multidrug resistance 1*), была обнаружена структурная гомология между Р-gp и белком HlyВ *Escherichia coli*, осуществляющего транспорт гемолизина из бактериальной клетки, а также экспорт токсинов, антибиотиков и других соединений (Thanassi and Hultgren, 2000).

В конце 80-х годов XX века в целом ряде статей было признано наличие большого семейства транспортных белков, функционирующих за счёт энергии АТФ (Chen et al., 1986; Gerlach et al., 1986; Gros et al., 1986). Сам термин АТФ-связывающие транспортёры (АВС-transporters) был введён в 1990 году

(Hyde et al., 1990). К этому времени уже стало очевидным, что такие транспортеры вовлечены в транспорт различных субстратов (от ионов до крупных белков), что приводит к их участию во многих биохимических и физиологических процессах.

Общим для белков данного семейства является присутствие трансмембранных доменов (TMDs) и цитоплазматического домена, который входит в структуру активного центра белка, в котором и происходит связывание молекулы АТФ и её гидролиз. Активный центр формируется двумя нуклеотид-связывающими доменами (NBDs). В настоящее время все известные белки данного семейства (импортёры и экспортёры) относятся к 8 подсемействам (Theodoulou and Kerr, 2015). При написании их названия используется аббревиатура ABC с указанием подсемейства (ABCA, ABCB и т.д.).

Белки-транспортеры, ответственные за связывание с лекарственными препаратами, относятся к подсемействам В (ABCB), С (ABCC) и G (ABCG) и являются белками-экспортёрами. В настоящее время эти семейства включают 29 белков, три из них – Р-гр (ABCB1), MRP1 (ABCC1) и BCRP (ABCG2) играют значимую роль в формировании в клетках человека устойчивости сразу к широкому спектру лекарственных препаратов, получившую название применительно к опухолевым клеткам – множественная лекарственная устойчивость. А сами белки-транспортеры Р-гр, MRP1 и BCRP относят к основным белкам, формирующим МЛЮ (далее белки МЛЮ).

Феномен МЛЮ или кросс-резистентность для опухолевых клеток (линия СНО) впервые был описан в 1970 году (Biedler and Reihem, 1970). Первым из белков МЛЮ был описан белок плазматической мембраны, получивший название Р-гликопротеин (Р-гр). Авторы открытия Juliano и Ling дали белку название по заглавной букве от слова Permeability – проницаемость (Juliano and Ling, 1976). В отечественных научных статьях преимущественно используется написание Р-гликопротеин с английской буквой «Р» или сокращённое название Р-гр. Клетки линии СНО, которые длительно культивировали в присутствии колхицина, продемонстрировали не только снижение накопления самого колхицина, но и других противоопухолевых препаратов, т.е., как предположили авторы открытия, плазматическая мембрана клеток оказалась непроницаемой для прохождения через неё целого ряда веществ. Позже выяснилось, что вещества могут проникать в резистентные клетки путём диффузии, но далее они активно выводятся во внеклеточную среду. Резистентная сублиния, в отличие от исходных клеток, характеризовалась присутствием на плазматической мембране белка с молекулярной массой 170 кДа (1280 а.о.). Активность белка сопровождалась гидролизом АТФ, и по аналогии с бактериальными белками-транспортерами был сделан вывод, что Р-гр действует как энергозависимая помпа (Endicott and Ling 1989). Лекарственную устойчивость клеток человека обеспечивает Р-гр, кодируемый геном *MDR1* (историческое название гена) или *ABCB1* (название по современной классификации). У грызунов Р-гр кодируется двумя генами *Mdr1a* (*Abcba*) и *Mdr1b* (*Abcbb*), так как трансфекция именно этих генов приводит

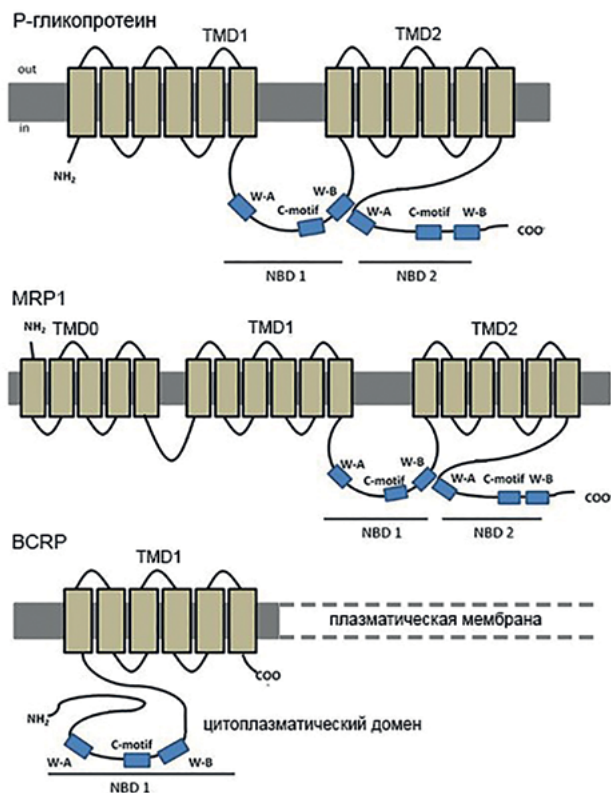
к развитию МЛУ в опухолевых клетках (Gottesman et al., 1993, 1995). Гены *Mdr1a* и *Mdr1b* на 85% идентичны друг другу и имеют более 80% гомологии с геном *MDR1 (ABCB1)*.

Ген P-gp впервые был клонирован в 1985 году (Riordan et al., 1985). Он расположен на 7-й хромосоме и содержит 29 экзонов, при этом два 5'-экзона не транслируются. Трансляция мРНК длиной 4872 п.н., включая нетранслируемую область, приводит к образованию белка длиной 1280 аминокислот. P-gp посттрансляционно модифицируется путём фосфорилирования и N-гликозилирования. Гликозилирование необходимо для направленной ориентации в пространстве и стабильности белка, но, по-видимому, не влияет на его транспортную функцию (Gottesman and Pastan, 1993). Фосфорилирование P-gp киназами, в частности протеинкиназой С, влияет на его транспортную функцию и связанную с ней активность АТФ-азы, а также на внутриклеточный синтез и транспорт P-gp (Idriss et al., 2000).

В 1992 году Cole и соавторы открыли другой белок-транспортёр с молекулярной массой 190 кДа (1531 а.о.) – MRP1 (Multidrug Resistance-associated Protein 1, ген *MRP1/ABCC1* – у человека и *Mrp1/Abcc1* – у грызунов, имеют 88% идентичности). MRP1 впервые был описан в клетках мелкоклеточного рака лёгких (Cole et al. 1992). К настоящему времени открыто 9 белков-транспортёров данного семейства, которые формируют лекарственную устойчивость. MRP1 транспортирует органические анионы, нейтральные формы и формы, конъюгированные с глутатионом, глюкуронатом или сульфатом (Borst et al., 2000; Borst and Elferink, 2002, Wang et al., 2021).

Далее был открыт транспортёр BCRP (Breast Cancer Resistance Protein, 75 кДа, 655 а.о., ген *BCRP/ABCG2* – у человека и *Bcrp/Abcg2* – у грызунов, имеют 81–82% идентичности), который выявили в клетках рака молочной железы резистентной линии MSF-7/AdrVp. Эти клетки не содержали P-gp и MRP1, но проявляли множественную лекарственную устойчивость, что и привело к открытию BCRP (Doyle et al., 1998).

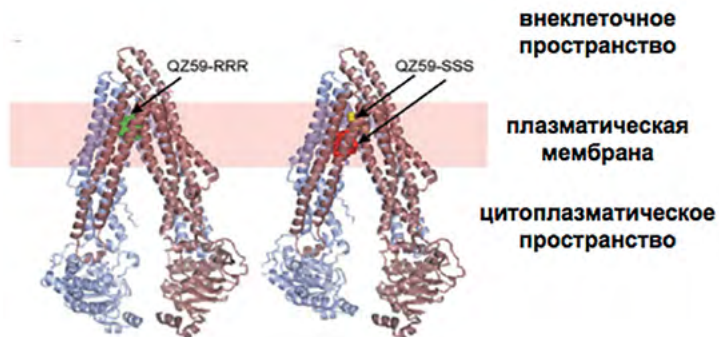
Рассмотренные выше белки-транспортёры имеют специфичные структурные особенности организации трансмембранных доменов (TMD). Структуры P-gp и MRP1 образованы единой молекулой полипептида и содержат 12 и 17 трансмембранных участков соответственно. В структуре P-gp имеется два TMD (TMD1 и TMD2), у MRP1 – три TMD (TMD0, TMD1 и TMD2) и два нуклеотид-связывающих домена (рис. 1.1). В отличие от них, BCRP – «полутранспортер», содержащий 6 трансмембранных участков (один TMD) и один нуклеотид-связывающий домен, который собирается в гомодимер для обеспечения транспорта субстратов.



**Рис. 1.1.** Структурная организация P-гр, MRP1 и BCRP. TMDs – трансмембранные домены. NBD – нуклеотид-связывающие домены. W-A – мотив Walker A, W-B – мотив Walker B, C-motif – мотив C (Ferreira et al., 2014, модифицировано)

Нуклеотид-связывающие домены содержат 3 высококонсервативные последовательности: мотивы Walker A и B, которые обнаружены во многих АТФ-связывающих белках и мотив C, который располагается между мотивами Walker A и Walker B и является уникальным именно для суперсемейства АТФ-связывающих белков (Walker et al., 1982). Предполагается, что мотив C может участвовать в распознавании субстратов или гидролизе АТФ (Tomblin et al., 2004; Leslie et al., 2005).

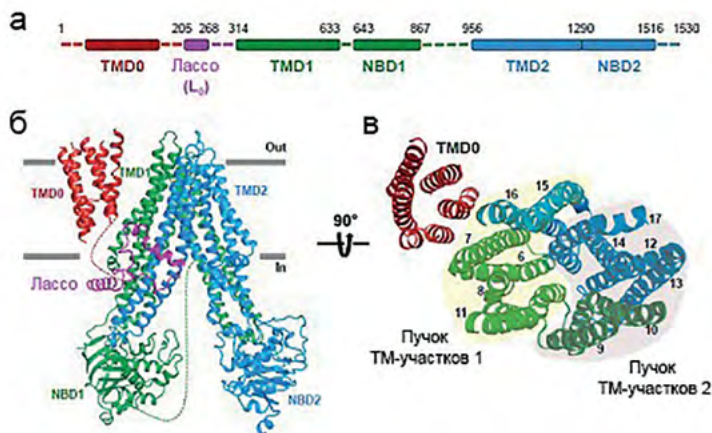
В 2005 году, почти через 30 лет после открытия P-гр, методом криоэлектронной микроскопии (с разрешением 8 Å) была получена трехмерная структура P-гр, которая продемонстрировала, что 12 трансмембранных участков формируют структуру в виде «поры» (внутренняя полость, карман) (Rosenberg et al., 2001, 2005). В 2009 году было создано трёхмерное стереоизображение структуры P-гр мыши (Aller et al., 2009), который на 87% оказался идентичен человеческому P-гр, а пути транслокации субстратов в них совпали на 96%. Также выяснилось, что трансмембранные участки формируют две симметричные половинки, в результате чего и образуется обширная внутренняя полость в структуре P-гр (рис. 1.2).



**Рис. 1.2.** Структура Р-гр мыши, полученная методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 4,35–4,4 Å в присутствии ингибиторов Р-гр. Слева – изображение в присутствии ингибитора QZ59-RRR (зелёный), справа – изображение Р-гр в присутствии одновременно двух ингибиторов QZ59-SSS (красный и жёлтый). Рисунок сделан на основе Aller et al., 2009

При этом «карман» для связывания с субстратами оказался расположенным непосредственно в плазматической мембране, а не со стороны цитоплазмы, как считалось изначально. Область «кармана» окружена ароматическими и гидрофобными остатками, что предполагает связывание с субстратом за счет гидрофобных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Было показано, что область связывания с субстратом внутри липидного бислоя значительна по своим размерам, около 6000 Å, и может одновременно связывать 2 молекулы одного субстрата. До настоящего времени структура Р-гр из всех белков МЛЮ остаётся наиболее изученной. В 2015 году была предложена трёхмерная модель человеческого гомодимера BCRP, полученная на основе методов высокого разрешения в положении  $\Lambda$ -конформации. В отсутствие нуклеотидов и субстратов BCRP формирует  $\Lambda$ -конформацию с далеко отстоящими друг от друга NBD-регионами, наподобие структуры Р-гр. При этом авторы отмечают, что в V-положении структура белка выглядит более закрытой и узкой, чем в  $\Lambda$ -конформации (Rosenberg et al., 2015).

Наиболее сложным по своей структуре из АТФ-связывающих белков МЛЮ является белок-транспортёр MRP1. Он имеет дополнительный N-терминальный домен (TMD0), что приводит к формированию трёх TMDs и только одного функционального сайта для гидролиза АТФ. Наиболее полная трёхмерная модель структуры MRP1 была получена только в 2017 году, через 25 лет после его открытия (Johnson and Chen, 2017). Каталитический цикл MRP1 и его связывание с АТФ ещё находятся в процессе изучения. TMD0 содержит 5 альфа-спиральных трансмембранных участков и участок под названием лассо, соединяющий TMD0 и TMD1. Мутации в TMD0 не приводят к потере MRP1 своей транспортной функции. Двенадцать трансмембранных участков, входящих в TMD1 и TMD2, собираются в два псевдосимметричных пучка: пучок 1 содержит трансмембранные участки 6, 7, 8, 11, 15, 16, а пучок 2 включает в себя участки 9, 10, 12, 13, 14 и 17 (рис. 1.3).



**Рис. 1.3.** Трёхмерная модель структурной организации MRP1 в положении  $\Lambda$ -конформации. А – схема расположения доменов MRP1, Б –  $\Lambda$ -конформация MRP1, В – расположение трансмембранных участков, вид сверху (модифицировано по Johnson and Chen, 2017)

## 1.2 Субстратная «всеядность» P-гр, MRP1, BCRP

На сегодняшний день известно, что из вышеперечисленных белков МЛУ P-гр обладает наиболее широкой субстратной «всеядностью», и он может экспортировать или связывать вещества самой разной химической структуры. Список субстратов P-гр постоянно пополняется и уже включает в себя сотни веществ ([https://go.drugbank.com/bio\\_entities/BE0001032](https://go.drugbank.com/bio_entities/BE0001032)).

Разнообразные субстраты для P-гр объединяют следующие характеристики: большинство из них липофильны, имеют молекулярную массу от 300 до 4000 Да, содержат в химической структуре ароматические кольца и несут небольшой заряд. К субстратам этого белка-транспортёра относятся органические катионы, слабые органические основания, некоторые органические анионы и незаряженные соединения, в том числе полипептиды и их производные.

Субстраты MRP1 – это амфипатические органические кислоты, конъюгированные с большой гидрофобной группой. MRP1 может формировать перекрёстную устойчивость к субстратам P-гр, но, как правило, уровень такой устойчивости будет значительно ниже (Leslie et al., 2005).

Первоначально сформировалось мнение, что BCRP характеризуется более узким по сравнению с P-гр и MRP1 диапазоном субстратов, в который входят некоторые противоопухолевые препараты (антрациклины, митоксантрон, ингибитор топоизомеразы I камптотecin). Однако позже стало ясно, что BCRP обладает широкой субстратной специфичностью: от гидрофобных субстратов до гидрофильных органических анионов, конъюгированных с сульфатами, глутатионом и глюкуроном. Он также может транспортировать нуклеозидные препараты и их монофосфатные производные (Rosenberg et al., 2015).

Несмотря на то, что P-gr активно исследуется почти 50 лет, его способность распознавать и транспортировать широкий спектр соединений до сих пор недостаточно изучена и вызывает многочисленные дискуссии. Считается, что одной из причин, которая бы могла объяснить широкую субстратную специфичность («всеядность») P-gr – это наличие нескольких сайтов связывания с субстратами.

В 1997 году Shapiro и Ling описали 2 сайта связывания субстратов на P-gr: H-сайт, названный так за специфичность связывания с Hoechst 33342 и R-сайт, связывающий родамин 123 и антрациклины (доксорубин и даунорубин). Эти сайты действуют кооперативно: субстрат, транспортируемый через R-сайт связывания, стимулирует перенос субстрата через H-сайт, что и обеспечивает транспорт нескольких разных субстратов одновременно. В то же время, добавление в среду культивирования колхицина стимулирует транспорт Hoechst 33342 и ингибирует выброс родамина 123. На таком ингибировании и основывается работа тест-систем для выявления функциональной активности P-gr и определения его субстратов (Shapiro and Ling, 1997, 1998).

Третий из открытых сайтов связывает прогестерон (progesterone), и из-за этого получил название P-сайт. Интересно, что прогестерон связывается с P-gr, но при этом не является его субстратом. Фактически прогестерон является модулятором P-gr, стимулируя транспорт с R- и H-сайтов. При этом родамин 123 и прогестерон совместно стимулируют транспорт Hoechst 33342 сильнее, чем каждый из них по отдельности (Kimura et al., 2007). Это указывает на наличие разных вариантов взаимодействия как субстратов с сайтами связывания, так и самих сайтов между собой, что также повышает число субстратов для P-gr. Использование фотоактивных аналогов субстратов и ингибиторов P-gr, таких как винбластин, колхицин, родамин 123, паклитаксел, верапамил и другие, позволили суммарно идентифицировать 7 различных сайтов для их связывания в структуре P-gr (Safa, 2004). Множественные сайты на P-gr проявляют комплексные аллостерические взаимодействия, через которые связывание лекарственного средства на одном сайте переключает другие сайты между конформациями высокой или низкой аффинности. Например, винбластин на сайте связывания P-gr препятствует связыванию других субстратов во всех сайтах связывания – отрицательная связь, в то же время, прениламин и мегестролацетат усиливают связывание дигидропиридина. Наиболее важным результатом этой и большинства других экспериментальных работ по идентификации сайтов связывания субстратов с P-gr является установление того факта, что субстраты могут иметь более одного сайта связывания с разной степенью аффинности, и каждый из них способен к транспортной функции. **Таким образом, существование нескольких сайтов и их влияние друг на друга генерируют молекулярную гибкость, что позволяет объяснить широкую субстратную специфичность P-gr.**

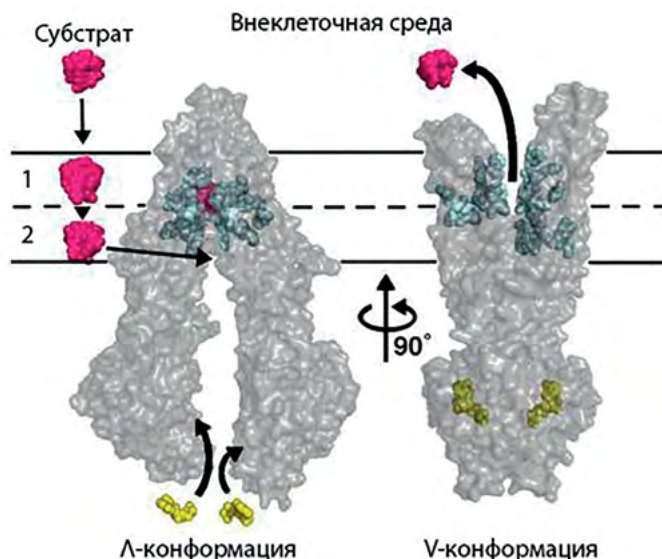
Так как большинство субстратов P-gr являются гидрофобными соединениями, данный белок-транспортёр называют также «гидрофобным пылесосом». Изначально существовала модель P-gr как помпы, в рамках которой субстраты из клетки транспортируются непосредственно из цитоплазмы. Но позднее было показано, что между трансмембранными участками 4 и 6 и 10 и 12 образуются ворота, которые позволяют гидрофобным молекулам и фосфолипидам

входить во внутреннюю полость транспортёра напрямую из внутреннего слоя билипидной мембраны и из него экспортироваться во внеклеточную среду (Shapiro and Ling, 1997, 1998).

Вторая модель – это «модель флиппазы», в которой субстрат связывается с субстрат-связывающим «карманом» во внутреннем слое плазматической мембраны, а затем переворачивается («flip») во внешний её слой. После достижения внешнего слоя субстрат очень быстро диффундирует во внеклеточную водную фазу, либо возвращается спонтанным образом во внутренний слой мембраны. В настоящее время имеются существенные доказательства, которые подтверждают как модель флиппазы, так и модель «гидрофобного пылесоса» (Sharom, 2014).

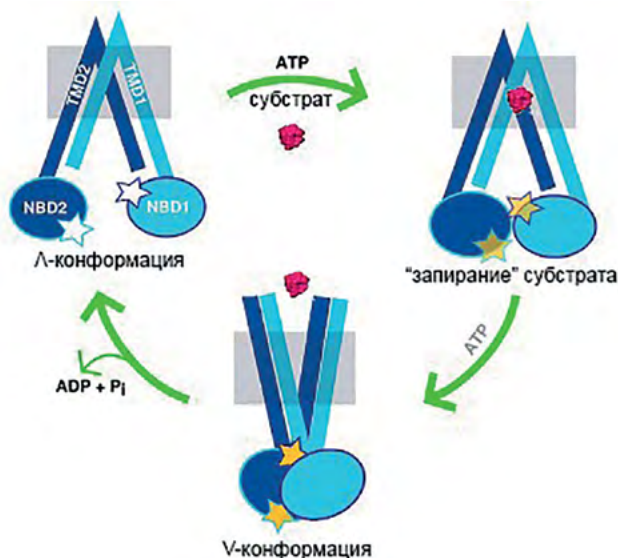
Транспортировка субстратов Р-гр зависит от гидролиза АТФ (Ritchie et al., 2011). Р-гр подвергается конформационным изменениям после связывания субстрата с TDMs и двух молекул АТФ с двумя NBDs (происходит запираение субстрата в канале Р-гр). Для высвобождения субстрата во внеклеточную среду необходим гидролиз АТФ с высвобождением пирофосфата, в результате чего происходит последующее конформационное изменение структуры Р-гр и открытие его канала во внеклеточную среду.

В «кармане» происходит связывание субстратов со специфичными сайтами, где они остаются до стимуляции АТФазной активности транспортёра (рис. 1.4). Открытая во внутреннюю среду клетки конформация Р-гр получила название  $\Lambda$ -конформация ( $\Lambda$ -заглавная буква лямбда греческого алфавита). Такая конфигурация не позволяет субстрату выйти во внеклеточное пространство (Aller et al., 2009).



**Рис. 1.4.** Схема конформационных изменений структуры Р-гр в плазматической мембране. Субстрат (пурпурный) из внеклеточной среды проходит наружный слой билипидной мембраны (1), входит во внутренний слой плазматической мембраны (2) и в карман (голубой) через открытый портал. АТФ (жёлтый) связывается с нуклеотид-связывающим доменом, вызывая конформационные изменения: сближение NBDs и изменение структуры Р-гр с  $\Lambda$ -конформации на V-конформацию, открытую во внеклеточное пространство (Aller et al., 2009, модифицировано)

Предполагается, что АТФазная активность Р-гр стимулируется связыванием субстрата со специфичными сайтами. Для изменения конформационной структуры белка две молекулы АТФ должны связаться с NBDs регионами для их димеризации. Для выхода субстрата во внеклеточную среду необходим последующий гидролиз АТФ, в результате чего происходит конформационное изменение структуры Р-гр: в результате АТФазной активности происходит изменение с  $\Lambda$ -конформации на V-конформацию (рис. 1.5), при которой взаимодействие субстрата со специфичными сайтами в «кармане» ослабляется и субстрат выходит во внеклеточную среду. Дальнейшее образование пирофосфата (Pi) и АДФ возвращает структуру белка в исходную  $\Lambda$ -конформацию (Ritchie et al., 2011; Condic-Jurkic et al., 2018).



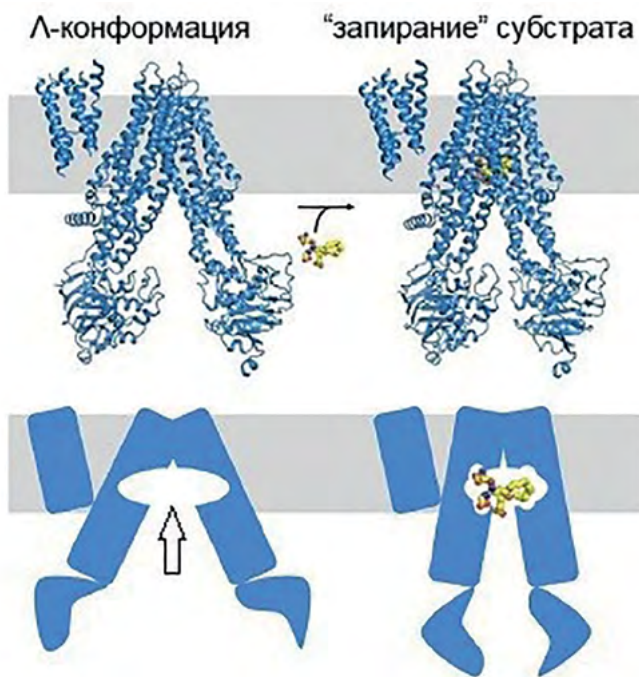
**Рис. 1.5.** Каталитический цикл Р-гр. Структура Р-гр показана схематично: синие – трансмембранные домены, которые подвергаются конформационным изменениям при связывании с субстратом и АТФ. Цикл стартует с позиции открытого канала со стороны цитоплазмы –  $\Lambda$ -конформации (Condic-Jurkic et al., 2018, модифицировано)

Одна молекула АТФ расходуется на одну транспортируемую молекулу субстрата. Так как в структуре Р-гр содержится два NBD-региона, было сделано предположение, что Р-гр одновременно транспортирует две молекулы субстрата (Sheps and Ling, 2007).

Следует отметить, что данные о роли АТФ в поддержании функциональной активности Р-гр зачастую весьма противоречивы. Ещё в 1999 году было продемонстрировано, что утрата Р-гр NBD-регионов не предотвращает связывание с ним субстратов (Loo and Clarke, 1999). В то же время, димеризация NBD сама по себе является АТФ-зависимым процессом и требует расхода АТФ (Tomblin et al., 2004). Результаты других работ демонстрируют, что после связывания с АТФ аффинность Р-гр к субстрату, наоборот, падает и восстанавливается только после высвобождения пирофосфата (Martin et al., 2001). Возможно, что

энергия АТФ необходима как для транспорта субстратов, так и для создания определённой структуры Р-гр. Так, ранее было показано, что Р-гр обладает АТФазной активностью и в отсутствие эндогенных субстратов. Авторы предположили, что само поддержание  $\Lambda$ -конформации является энергозатратным процессом, и это свойство получило название «базовой АТФазной активности» (Lerner-Marmarosh et al., 1999). В 2017 году в статье в журнале «Nature» была предложена модель формирования V-конформации Р-гр. Эта модель предполагает, что экспорт субстрата (лекарства) во внеклеточную среду требует двухэтапного процесса гидролиза АТФ (Verhalen et al., 2017). Таким образом, вопрос АТФазной активности Р-гр и его конформационных изменений всё ещё находится в процессе детального изучения.

В отличие от Р-гр, в структуре MRP1 выявлен единый сайт, связывающий субстраты. Этот сайт обладает структурной пластичностью и состоит из двух частей. Одна часть – это положительно заряженный регион, который связывается с фрагментом молекулы глутатиона (Р-rocket или Р-карман). Вторая часть – это регион, взаимодействующий с гидрофобными составляющими конъюгатов (Н-rocket или Н-карман) (рис. 1.6).



**Рис. 1.6.** Схема трёхмерной модели кристаллической структуры MRP1 и субстрат-связывающего сайта (модифицировано по Johnson and Chen, 2017). Стрелка указывает на единый сайт связывания субстратов. Жёлтый цвет – субстрат

Предполагается, что в результате формирования такого сложного субстрат-связывающего сайта, MRP1 может узнавать широкий спектр субстратов различной химической природы (Johnson and Chen, 2017).

Механизмы формирования лекарственной устойчивости при помощи BCRP неизвестны и только находятся на стадии исследования при помощи высокоточных современных методов.

### 1.3 Локализация и функциональная активность P-gp, MRP1, BCRP в клетках лёгких

На сегодняшний день известно, что P-gp, MRP1, BCRP экспрессируются в широком спектре нормальных тканей с экскреторной (тонкий и толстый кишечник, печень, почки) и барьерной функцией (гематоэнцефалический барьер, гематотестикулярный барьер, плацента, аэрогематический барьер), где участвуют в выполнении физиологических функций организма.

Предполагается, что белки МЛУ осуществляют транспорт физиологических субстратов и в норме защищают клетки и ткани от действия экзогенных и эндогенных ксенобиотиков (Leslie et al., 2005; van de Ven et al., 2009). Наиболее ярким примером их защитной функции является история открытия роли P-gp в мышцах, нокаутных по генам *Mdr1a* и *Mdr1b* (*Abcb1a* и *Abcb1b*). У этих мышей не было выявлено никаких аномалий в развитии, но после проведения санитарной обработки вивария ивермектином именно у животных *mdr1*(-/-) проявились симптомы интоксикации этим препаратом, вплоть до смертельного исхода. По сравнению с животными дикого типа, в тканях головного мозга этих мышей было выявлено 100-кратное увеличение содержания ивермектина (Schinkel et al., 1994). Это открытие позволило выявить физиологическую роль P-gp – защита клеток и тканей от проникновения токсичных веществ, и прежде всего – в головной мозг. В нервной ткани P-gp выявляется в эндотелии гематоэнцефалического барьера, в астроцитах, макрофагах и нейронах (Lee et al., 2001). В более позднем исследовании Schinkel с соавторами на мышцах, нокаутных по гену *Mdr1a*, было показано, что инъекция меченых тритием лекарств (дексаметазона, дигоксина и циклоспорина А) приводит к их накоплению в нервной ткани. Наиболее высокий уровень (в 20–50 раз больше, чем у мышей исходного типа) был выявлен при накоплении дигоксина и циклопорина А, а уровень дексаметазона был увеличен в 2–3 раза по сравнению с животными дикого типа. **Эти исследования впервые продемонстрировали, что P-gp может быть важным фактором, определяющим фармакокинетику разных лекарственных препаратов, а не только противоопухолевых агентов** (Schinkel et al., 1997, 1999).

В том же исследовании было продемонстрировано, что у мышей экспрессия генов *Mdr1a* и *Mdr1b* в разных органах несколько различается. Но в совокупности эти две изоформы P-gp имеют такое же распределение в организме, как и P-gp в организме человека, и это сходство предполагает их единую физиологическую функцию. Высокие уровни *Mdr1a* регистрируются в гематоэнцефалическом барьере, кишечнике, плаценте, печени и почках. *Mdr1b* экспрессируется в надпочечниках, эндометрии беременных самок, яичниках, плаценте, печени и почках (Schinkel et al., 1997b). P-gp снижает концентрацию в крови перорально вводимых лекарств, способствуя их выведению через желчь, мочу и фекалии, тем самым защищая головной мозг, яички самцов и эмбрионы беременных самок мышей от потенциально токсичных ксенобиотиков (Fromm, 2004).

Как правило, распределение белков МЛУ в организме человека оценивают по уровню экспрессии их генов или по результатам иммунохимического выявления. Данные разных авторов по экспрессии генов МЛУ и выявлению

их белков могут различаться (Ерохина, 2004). В нормальных тканях экспрессия гена *ABCB1* характерна, прежде всего, для клеток эпителия и эндотелия. В этих клетках Р-гр локализуется на апикальной поверхности плазматической мембраны. Высокие уровни экспрессии *ABCB1* идентифицированы в клетках кортикального слоя надпочечников, дистальных канальцев почки, в печени, в эпителии разных отделов кишечника. Средний уровень экспрессии наблюдается в эндометрии и в клетках эндотелия сосудов головного мозга (в клетках центральной нервной системы), а низкие уровни экспрессии гена *ABCB1* – во многих других органах (Germann et al., 1996).

Высокие уровни экспрессии гена *ABCB1* регистрируются в мультипотентных гемопоэтических стволовых клетках, но в целом для клеток системы кроветворения характерны разные уровни экспрессии гена *ABCB1* (Chaudhary and Roninson, 1991; Chaudhary et al., 1992; Scotto, 2003). Среди клеток крови наиболее высокий уровень его экспрессии регистрируется в НК-клетках, в Т- и В-лимфоцитах. При этом Т-киллеры имеют уровень экспрессии *ABCB1* выше, чем Т-хелперы. В В-лимфоцитах уровень экспрессии *ABCB1* ниже, чем в Т-лимфоцитах, и снижается при их активации и дифференцировке в клетки памяти (Klimecki et al., 1994; 1995).

Для моноцитов не свойственна экспрессия гена *ABCB1*, но при дифференцировке моноцитов в макрофаги в них обнаруживается функционально активный Р-гр (van de Ven et al., 2009). Кроме того, существуют различия в функциональной активности Р-гр между 2 типами макрофагов: в макрофагах с фенотипом М2 (противовоспалительные) она выше по сравнению с макрофагами с провоспалительным фенотипом М1 (Cory et al., 2016). Следует отметить, что макрофаги играют одну из ключевых ролей в патогенезе туберкулеза, так как выступают «убежищем» для возбудителя. Одним из механизмов защиты микобактерий туберкулёза от макрофагов является изменение их пути активации с провоспалительного состояния М1 на противовоспалительное состояние М2 (Marino et al., 2015; Cho et al., 2020).

Таким образом, функционально активный Р-гр есть во многих типах иммунных клеток, однако его роль и функции в них исследованы недостаточно (Bossennec et al., 2018). Вероятнее всего, Р-гр отвечает за транспорт ксенобиотиков, а также, по разным данным, участвует в транспорте цитокинов.

Мыши с нокаутом по гену *Bcrp1* (*Abcg2*) или *Mrp1* (*Abcc1*) также сохраняют свою жизнеспособность и фертильность. Но мыши *Bcrp1* (-/-) могут быть чувствительны к отдельным компонентам пищи. На основе чего было сделано заключение, что роль BCRP/*Bcrp1* важна для защиты клеток и тканей от токсичных компонентов, которые могут поступать с пищей или в результате фармакологического воздействия. У человека BCRP защищает клетки и ткани против различных ксенобиотиков. Данная функция BCRP наиболее выражена в клетках кишечника, печени, плаценты и гематоэнцефалическом барьере. Также BCRP выполняет защитную и регуляторную функцию в стволовых клетках. В каждой тестируемой ткани обнаруживается как мРНК, так и белок BCRP. Этот фоновый уровень при иммуногистохимическом мечении объясняется присутствием BCRP в эндотелии вен и капилляров, в том числе и в тканях лёгких (Maliepaard et al., 2001).

В обзоре van de Ven и коллег MRP1 назван «вездесущим», исходя из анализа данных разных авторов (van de Ven et al., 2009). На мышах, нокаутных по гену *Mrp1*, подтверждена его роль в защите клеток и тканей от действия ксенобиотиков. Тучные клетки, выделенные из подкожной клетчатки брюшной полости нокаутных мышей, демонстрируют повышенное накопление цистеинил лейкотриена С4 (LTC<sub>4</sub>, фактор воспаления и бронхальной астмы). Это наблюдение подразумевает, что MRP1 – доминирующий транспортер LTC<sub>4</sub> в тучных клетках, и LTC<sub>4</sub> рассматривается в качестве физиологического субстрата для MRP1/Mrp1 (Wijnholds et al., 1997).

MRP1 имеет решающее значение для миграции дендритных клеток из периферических тканей в лимфатические узлы. Дендритные клетки являются антигенпрезентирующими, участвуют в активации Т-клеток. Они взаимодействуют с антигенами в периферических тканях, а затем мигрируют в лимфатические узлы, где локализуются в богатой Т-клетками паракортикальной зоне (Robbiani et al., 2000).

В последние годы всё больше накапливается данных о роли основных белков МЛУ, и, в первую очередь, Р-gp в воспалительной реакции. Этот аспект их функциональной активности будет рассмотрен в соответствующем разделе монографии, посвящённом туберкулёзному воспалению.

Изучение локализации основных белков МЛУ в клетках лёгкого ведётся с 90-х годов прошлого века, и этот вопрос до сих пор остаётся в фокусе внимания научных групп и предметом дискуссий. Лёгкие относятся к органам с высоким риском проникновения экзогенных ксенобиотиков и инфекционных возбудителей во внутреннюю среду организма, что предполагает наличие и формирование эффективных систем защиты. Адекватному выполнению этих функций в значительной степени способствуют клеточный состав и структура альвеолярного эпителия в тесном взаимодействии с легочным сурфактантом (Ерохин и Романова, 2000). Лёгкие постоянно вступают в контакт с широким разнообразием потенциально опасных и токсичных веществ, которые присутствуют во вдыхаемом воздухе. Микроорганизмы, пыль и токсичные частицы в значительной степени удаляются в верхних отделах дыхательных путей через мукоцилиарный клиренс. Защита лёгких от вредных веществ в альвеолярном отделе обеспечивается сурфактантно-альвеолярным комплексом: бактерицидными свойствами сурфактанта, фагоцитарной активностью альвеолярных макрофагов, клетками эпителиальной выстилки. На клеточно-молекулярном уровне механизмы, играющие роль в защите от токсичных агентов, как предполагается, могут обеспечиваться различными белками-транспортёрами.

Данный вопрос исследуется с помощью применения разных экспериментальных моделей: (1) анализа экспрессии генов МЛУ; (2) иммуногистохимического выявления белков МЛУ; (3) изучения протеома; (4) использования первичной культуры клеток лёгкого человека; (5) использования коммерческих модифицированных вариантов первичной культуры клеток лёгкого человека, таких как НТЕriCs (эпителий трахеи), NHBEs (эпителий бронхов), HPAEpic5 (альвеолярный эпителий); (6) культивируемых линий клеток, полученных из опухолей лёгкого.

Методом количественной оценки протеома (quantification targeted absolute proteomics, QTAP) в тканях лёгких человека обнаружено 19 белков-транспортёров, в той или иной степени опосредующих развитие лекарственной устойчивости. Среди них отмечается высокая экспрессия *ABCC1* и *ABCG2*, и более низкая – *ABCBI*. Авторы отмечают, что у разных доноров уровень экспрессии *ABCC1* различался в 18 раз, что указывает на вариабельность данного параметра. В коммерческих линиях первичной культуры эпителиальных клеток QTAP-анализ выявил высокие уровни следующих из белков МЛЮ: в НТЕpiCs (эпителий трахеи) – MRP1, в NHBEs (эпителий бронхов) – MRP1 и BCRP, в HPAEpic5 (альвеолярный эпителий) – P-gp (Sakamoto et al., 2013).

Иммуногистохимическое выявление P-gp, MRP1 и BCRP в лёгких было проведено в целом ряде работ. Методом иммуногистохимического окрашивания была показана локализация P-gp на апикальной поверхности реснитчатых эпителиальных клеток бронхов человека, на апикальной и латеральной поверхностях серозных клеток бронхиальных желез, а также на люминальной поверхности эндотелиальных клеток бронхиальных капилляров (Lechapt-Zalcman et al., 1997).

Scheffer и соавторы анализировали образцы лёгкого человека, мыши, крысы и морской свинки (Scheffer et al., 2002). Для этого использовали как парафиновые, так и криосрезы. В отличие от других авторов, в данной работе проанализирована локализация сразу нескольких белков МЛЮ. В исследованных образцах P-gp и MRP1 выявлялись в эпителиальных клетках бронхов, на апикальной и базолатеральной мембранах соответственно. MRP1 также обнаруживался в серомукоидных железах, а P-gp – в альвеолярных макрофагах. BCRP в небольшом количестве регистрируется в эпителиальном слое, в эпителии синусов серомукоидных желез и в эндотелии мелких капилляров. Интенсивность меченых альвеолярных макрофагов сильно варьировала. Авторы предполагают, что это связано с разным состоянием макрофагов. Все вышеперечисленные результаты согласуются с содержанием в цитоплазме и РНК данных белков.

Авторами исследования сделано заключение, что иммуногистохимическое окрашивание лёгких мышей, крыс и морских свинок указывает на эволюционно консервативность локализации этих белков. P-gp и MRP1 следует рассматривать в качестве белков-переносчиков, играющих важную роль в нормальной физиологии лёгких. И для выяснения их роли необходимо провести сравнение их экспрессии, локализации и функциональной активности при различных бронхолёгочных патологиях у животных и человека, так как физиологическая роль вышеназванных белков в клетках лёгкого до конца неизвестна. Только для MRP1 показано, что он является основным транспортёром цистеинил лейкотриена, который является потенциальным медиатором воспаления на поздней стадии астматической реакции. Авторы предполагают, что данные белки участвуют в ограничении проникновения через бронхоальвеолярный эпителий различных токсинов, содержащихся во вдыхаемом воздухе (Scheffer et al., 2002). С результатами Scheffer и соавторов согласуются данные целого ряда других исследований, результаты которых суммированы в табл. 1.1.

**Табл. 1.1.** Данные иммуногистохимического выявления Pgp, MRP1, BCRP в лёгких человека и грызунов\*

Клетки лёгких	Белки МЛУ	Ссылки
Эпителий бронхов	P-gp, MRP1, BCRP	Cordon-Cardo et al., 1990; van der Valk et al., 1990; Flens et al., 1996; Izquierdo et al., 1996; Lechapt-Zalcman et al., 1997; Bréchet et al., 1998; Scheffer et al., 2002; Campbell et al., 2003; Fetsch et al., 2006; Endter et al., 2007
Эпителий бронхиол	P-gp, MRP1	van der Valk et al., 1990; Flens et al., 1996; Scheffer et al., 2002
Серозные и базальные клетки бронхиальных желёз	P-gp, MRP1, BCRP	Lechapt-Zalcman et al., 1997; Bréchet et al., 1998; Scheffer et al., 2002
Альвеолярный эпителий/ альвеолоциты 1-го типа	P-gp, BCRP	van der Valk et al., 1990; Izquierdo et al., 1996; Campbell et al., 2003; Fetsch et al., 2006; Endter et al., 2007; Ерохина и др., 2016
Альвеолярные макрофаги	P-gp, MRP1	van der Valk et al., 1990; Flens et al., 1996; Scheffer et al., 2002
Эндотелий сосудов бронхов/ бронхиол	P-gp, BCRP	Cordon-Cardo et al., 1990; Lechapt-Zalcman et al., 1997; Scheffer et al., 2002
Эндотелий альвеол	BCRP	Scheffer et al., 2002

*\*В представленных работах написание аббревиатуры белков МЛУ дано преимущественно заглавными буквами, независимо от объекта исследования.*

Также следует отметить, что результаты иммуногистохимического маркирования зависят, в том числе, и от панели использованных антител. Этим объясняется тот факт, что опубликованные результаты в ряде случаев не совпадают, и прежде всего это касается выявления белков МЛУ в клетках альвеолярного эпителия (van der Valk et al., 1990; Campbell et al., 2003; Ерохина и др., 2016)

Другие модели, позволяющие изучать локализацию белков МЛУ и их функциональную активность – это культивируемые клетки: первичная культура клеток, их генетически модифицированный вариант, а также культивируемые клетки, имеющие своё происхождение из опухолей лёгкого.

Hamilton и соавторы с целью выявления локализации белка Р-гр и его функциональной активности провели исследования на культивируемых клетках бронхолегочного эпителия в модели *in vitro*. В результате было продемонстрировано, что транспорт субстрата Р-гр – родамина 123 – идёт преимущественно от базолатеральной поверхности клеток к апикальной и опосредован Р-гр (Hamilton et al., 2001). Отсутствие функционально активного Р-гр на апикальной поверхности плазматической мембраны приводит к нарушению направленного транспорта родамина 123 через альвеолоциты (Florea et al., 2001).

Иммунохимическое исследование показало, что Р-гр локализуется на апикальной мембране пневмоцитов 1-го типа (альвеолоциты 1-го типа). Вестерн-блот анализ выявил присутствие Р-гр в монослое первичной культуры клеток альвеолярного эпителия hAEPС как непосредственно после выделения клеток, так и через 8 дней культивирования. Изучение транспорта родамина 123 через монослой клеток hAEPС продемонстрировало его активность и ингибирование в присутствии верапамила. Эти результаты доказывают, что Р-гр обладает функциональной активностью в клетках альвеолярного эпителия человека (Endter et al., 2007). Функционально активный Р-гр был обнаружен в альвеолоцитах I и II типов в альвеолярных макрофагах (Berg et al., 2018).

Продемонстрирована зависимость между выраженностью воспалительной реакции в лёгких и экспрессией генов белков МЛУ. У мышей с нокаутом по генам *mrl1 (abcc1)*, *mdr1a/b (abcb1a/b)* при воздействии агентов, индуцирующих воспаление в лёгких, наблюдается менее выраженный воспалительный ответ по сравнению с мышами дикого типа (Wijnholds et al., 1997, van der Deen et al., 2007).

**Таким образом, в клетках лёгкого Р-гр локализуется на апикальной поверхности бронхоальвеолярного эпителия и эндотелия, а также на плазматической мембране альвеолярных макрофагов; MRP1 – на базолатеральной поверхности эпителия бронхов и бронхиол и в альвеолярных макрофагах; BCRP – в эпителиальном слое бронхов и в эндотелии капилляров бронхов, бронхиол и альвеол. Предполагается, что в клетках лёгкого белки МЛУ выполняют важную роль, связанную с осуществлением транспортных процессов, защитой альвеолярного региона от экзогенных токсичных веществ, возбудителей, поддержанием гомеостаза сурфактанта, а также модулируют воспалительные реакции.**

#### 1.4 Белки МЛУ и противотуберкулёзные препараты

Большинство имеющихся на сегодняшний день статей о взаимодействии и влиянии противотуберкулёзных препаратов на активность белков МЛУ касаются рифампицина – одного из ключевых препаратов при лечении туберкулёза. Рифампицин относится к группе антибиотиков, действие которых связано с блокированием синтеза РНК в прокариотических клетках, и это один из немногих антибиотиков, который эффективен против внутриклеточных форм *M. tuberculosis*.

Многочисленные химические соединения с молекулярной массой от 300 до 4000 Да могут быть субстратами для Р-гр, MRP1, BCRP. Субстраты – это вещества, которые непосредственно транспортируются белком-транспортёром.

Индукторы – вещества, стимулирующие экспрессию генов *ABCBI*, *ABCC1*, *ABCG2*. Ингибиторы – это соединения, которые блокируют функциональную активность белков МЛУ в результате прочного связывания с субстрат-связывающим сайтом или через влияние на АТФ-связывающий домен.

Рифампицин способен напрямую связываться с Р-гр (Fardel et al., 1995). У *Mdr1*<sup>-/-</sup> мышей рифампицин накапливается в клетках печени, в отличие от *Mdr1*<sup>+/+</sup> мышей (Schuetz et al., 1996). Эти результаты указывают на то, что рифампицин является субстратом Р-гр.

Рифампицин является не только субстратом, но и индуктором экспрессии гена *ABCBI*, что было продемонстрировано на клетках, ответственных за абсорбцию и выведение антибиотика: гепатоцитах, энтероцитах, эпителии почечных канальцев (Magnarin et al., 2004). Предполагается, что рифампицин связывается с ядерным рецептором PXR (pregnane X receptor), через активацию которого и вызывает индукцию экспрессии *ABCBI* (Geick et al., 2001).

В энтероцитах кишечника и гепатоцитах печени рифампицин одновременно индуцирует экспрессию генов *ABCBI* и цитохрома *P450*, а также активность ферментов, метаболизирующих лекарственные препараты, что приводит к уменьшению всасываемости лекарственных препаратов – субстратов для Р-гр. Это, в свою очередь, вызывает снижение эффективности тех лекарств, которые перорально принимаются одновременно с рифампицином (Ерохина, 2004).

Данные о возможности индуцировать экспрессию *ABCBI* рифампицином в иммунных клетках не однозначны. На мононуклеарах периферической крови получены результаты, которые подтверждают возрастание уровня экспрессии гена и белка Р-гр при воздействии рифампицином (Owen et al., 2006) или демонстрируют отсутствие эффекта (Вескумонт et al., 2000; Мансеау et al., 2010). Схожие данные получены при исследовании влияния рифампицина на экспрессию гена белка *MRP1* (Fromm et al., 2000).

Методом ПЦР в реальном времени пытались выявить корреляцию между уровнем транскрипции мРНК *ABCBI*, *MRP1*, *BCRP* в мононуклеарах периферической крови и биоптатах печени и тонкой кишки здоровых доноров. Была обнаружена корреляция между уровнем экспрессии *ABCBI*, *BCRP* и *PXR* в мононуклеарах и кишечнике (Albermann et al., 2005). Это позволяет предположить, что индукция экспрессии гена *ABCBI* под воздействием рифампицина может быть различной в зависимости от типа клеток.

Так как рифампицин является субстратом Р-гр, то было выдвинуто предположение, что использование фармакологических ингибиторов Р-гр усилит его эффект против возбудителя. Проведённые исследования показали, что ингибирование функциональной активности Р-гр в инфицированных макрофагах приводит к увеличению в них концентрации двух противотуберкулёзных препаратов – рифампицина и этамбутола, и, в итоге, к более эффективному уничтожению *M. tuberculosis* (Hartkoorn et al., 2007). Это напрямую свидетельствует о том, что функциональная активность Р-гр может препятствовать достижению этими препаратами своей мишени – *M. tuberculosis*, а использование его ингибиторов усиливает эффект их действия. Использование фармакологического ингибитора Р-гр

верапамила совместно с рифампицином способствует усилению бактерицидных эффектов антибиотика и в отношении устойчивых к рифампицину штаммов *M. tuberculosis* (Gupta et al., 2013; Demitto et al., 2015). Также верапамил усиливает в несколько раз бактерицидный эффект бедаквилаина (Adams et al., 2014; Gupta et al., 2015; Xu et al., 2018; Viljoen et al., 2019). Хотя относительно бедаквилаина до конца не решён вопрос, является ли он субстратом P-гр.

Оценивая эффект фармакологического ингибирования P-гр на усиление бактерицидных свойств рифампицина не стоит забывать, что ингибиторы P-гр могут блокировать и активность бактериальных АТФ-связывающих белков-транспортеров (Chen et al., 2018). Кроме того, верапамил активирует аутофагию в макрофагах, что повышает бактерицидные свойства инфицированных макрофагов (Abate et al., 2016).

Актуальным направлением является оценка влияния белков МЛУ на биодоступность ингаляционных препаратов. В таких исследованиях важная роль отводится экспериментальным моделям. В частности, на модели изолированного и перфузируемого лёгкого (грызунов) в условиях *ex vivo* тестируется накопление различных химических соединений, в том числе и в присутствии ингибиторов P-гр. Выяснено, что неудачи с накоплением ингаляционных лекарственных препаратов в альвеолярном эпителии связаны с активностью P-гр, и применение его ингибиторов усиливает эффект их накопления в клетках лёгких (Ehrhardt et al., 2017; Price et al., 2017). Эти данные также подчёркивают актуальность поиска путей ингибирования активности P-гр для повышения эффективности действия противотуберкулёзных препаратов.

Липидный и белковый состав плазматической мембраны во многом определяет, завершится ли связывание P-гр, MRP1 или BCRP с субстратом или нет. В связи с этим одним из перспективных направлений для снижения активности этих транспортёров является активация процессов эндоцитоза и его разновидности – фагоцитоза.

Реализация данного направления – активации фагоцитоза посредством использования противотуберкулёзных препаратов – в настоящее время разрабатывается при помощи разных биотехнологических подходов. В клинической практике уже применяются препараты экзогенного лёгочного сурфактанта – активатора фагоцитоза (Ерохин и др., 2014). На стадии доклинических исследований находятся антибактериальные препараты, инкапсулированные в полимер молочной и/или гликолевой кислот (Hirota et al., 2010, Erokhina et al., 2015; 2022).

Информация о лекарственных препаратах – субстратах для белков МЛУ постоянно пополняется на ресурсе DrugBank ([drugbank.com](http://drugbank.com)). В настоящее время субстратами или ингибиторами P-гр названы 617 лекарственных препарата, в том числе субстратами для P-гр являются противотуберкулёзные препараты рифампицин, моксофлоксацин, этамбутол. В базе DrugBank отсутствует информация о противотуберкулёзных препаратах – субстратах для MRP1 и BCRP.

Транспорт лекарственных препаратов через плазматические мембраны клеток человека и клеточную стенку возбудителя является одним из важных аспектов в проблеме лечения туберкулёза. В целях заблаговременного предупреждения снижения эффективности лекарственных препаратов за счёт ак-

тивности белков МЛЮ Американским департаментом здравоохранения и Центром по созданию и разработке лекарств (US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration и Center for Drug Evaluation and Research) в 2010 г. были разработаны рекомендации об обязательном тестировании новых лекарственных форм на предмет их взаимодействия с наиболее универсальным из белков МЛЮ – P-gp, и предложен алгоритм проведения такого тестирования на моделях *in vitro* и *in vivo* (FDA 2010). В более поздних рекомендациях предложено при создании новых лекарств учитывать активность уже двух белков-транспортёров – P-gp и BCRP (FDA 2017). Первоначально рекомендуется проводить исследования на клеточных линиях с высокой функциональной активностью этих белков, и в случае подтверждения, что препарат является их субстратом или ингибитором – тестировать на животных.

В нашей стране первые эксперименты с противотуберкулёзными препаратами рифампицином и изониазидом и оценкой их влияния на P-gp и MRP1 были поставлены в НИИ Канцерогенеза ОНЦ им. Н.Н. Блохина Минздрава РФ в лаборатории генетики опухолевых клеток ещё в конце 90-х годов прошлого века. В России основоположником научного направления, связанного с развитием резистентности опухолевых клеток и участием в этом процессе белков МЛЮ, является доктор медицинских наук, профессор Алла Александровна Ставровская. При её непосредственном участии и М.В. Ерохиной были проведены эксперименты, показавшие, что рифампицин является индуктором функциональной активности как P-gp, так и MRP1. Эти работы заложили базу для дальнейших исследований в области взаимодействия противотуберкулёзных препаратов и белков МЛЮ.

Таким образом, противотуберкулёзный препарат рифампицин является одновременно субстратом P-gp и индуктором экспрессии гена *ABCB1*. Эти эффекты рифампицин проявляет в клетках с секреторной и экскреторной функцией. Использование ингибиторов P-gp повышает эффективность действия рифампицина, этамбутола, бедаквилина на возбудитель в моделях *in vitro* и *in vivo*, а также – ряда ингаляционных препаратов в модели *ex vivo*. Использование фармакологических ингибиторов P-gp совместно с антибиотиками может рассматриваться в качестве перспективной стратегии повышения эффективности терапии при туберкулёзе лёгких.

### 1.5 Полиморфизмы генов белков МЛЮ и их клиническая значимость

Технологические достижения в секвенировании и генотипировании открыли новую эру в изучении генетики человека, став основой для стремительного развития **фармакогенетики** (изучение вариаций в последовательности ДНК, связанных с реакцией на лекарства) и **фармакогеномики** (изучение вариаций характеристик ДНК и РНК, связанных с реакцией на лекарства). Эти биомедицинские направления фокусируются на повышении эффективности лекарственной терапии и снижении побочных реакций за счёт персонализированного подбора препаратов и их дозировок на осно-

ве молекулярно-генетического профиля пациента (Roden et al., 2019). Для этого определяются вариации генов белков (полиморфизмы, гаплотипы или сцепленные полиморфизмы), оказывающих влияние на фармакокинетику и фармакодинамику конкретных лекарств. Информация о таких вариациях систематизирована в специализированных базах данных, например, PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org>), что делает её ценным ресурсом для клинических специалистов и исследователей (Whirl-Carrillo et al., 2012).

Гены белков, регулирующих ключевые этапы взаимодействия организма человека с лекарствами, называются ADME-генами: от английского **A**bsorption (всасывание), **D**istribution (распределение), **M**etabolism (метаболизм), **E**xcretion (выведение). ADME-гены классифицируют в четыре группы, исходя из функциональной роли формирующих их белков (Hu et al., 2020; Jittikoon et al., 2016). К первой группе относят гены ферментов фазы I, которые катализируют первичную модификацию молекул (окисление, восстановление, гидролиз, дезаминирование) для подготовки их к выведению из организма. К данной группе относятся гены белков суперсемейства цитохрома P450 (CYP). Ко второй группе относят гены ферментов фазы II, обеспечивающих присоединение химических групп для образования гидрофильных метаболитов. Примером таких ферментов являются белки глюкуронозилтрансфераза (UGT), глутатионтрансфераза (GST), сульфотрансфераза (SULT), N-ацетилтрансфераза (NAT) и тиопуринметилтрансфераза (TPMT). В результате совместной работы ферментов фазы I и II образуются неактивные и водорастворимые метаболиты, которые выводятся из организма через желчь, мочу или кал. К третьей группе относятся гены двух суперсемейств транспортных белков: ABC-транспортёры и транспортёры растворенных веществ (SLC). ABC-транспортёры отвечают преимущественно за экспорт лекарств из клеток, в то время как SLC – за их импорт. Согласованная работа этих транспортных белков влияет на биодоступность лекарств и их накопление в клетках-мишенях. Наибольшее значение в контексте полиморфизмов, изменяющих фармакокинетику лекарственных препаратов, имеют гены *ABCG2*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3* и *ABCB1*. Четвертая группа – это гены других белков (рецепторы, ионные каналы), не входящие в первые три группы, но участвующие в процессах ADME.

Не вызывает сомнений, что именно транспортные белки могут быть основными детерминантами фармакокинетических профилей лекарственных средств. В 2007 году был сформирован Международный консорциум по исследованию белков-транспортёров (The International Transporter Consortium, ИТС, <https://www.itc-transporter.org/>). В 2010 году им были опубликованы первые рекомендации относительно методов изучения взаимодействия транспортёров с лекарствами и интерпретации данных исследований, а также рекомендации и примеры руководств, которые следует учитывать при разработке лекарств (The International Transporter Consortium et al., 2010). В 2018 году ИТС опубликовал обзор анализа влияния полиморфизмов транспортёров на биодоступность лекарственных препаратов и вызываемые ими побочные реакции (Yee et al., 2018). Несмотря на то, что в обзоре рассматривается большое количество ассоциаций между полиморфизмами в ABC-транспортёрах и реакцией у паци-

ентов на лекарства (с высокой статистически значимой ценностью), клиническая полезность этих вариантов вызывает сомнения, за исключением только одного гена *CFTR* (от английского Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), мутации в котором приводят к возникновению такого заболевания, как муковисцидоз (López-Fernández, 2018).

В базе PharmGKB уровень доказательства связи генетического варианта с клинически значимым исходом, с токсичностью или эффективностью препарата классифицируется от 1 до 4. Где 1 соответствует высокому уровню доказательств, 2 – умеренному, 3 – низкому и 4 – предварительному. Согласно базе данных PharmGKB, гены *ABCB1* (P-гр) и *ABCG2* (BCRP) являются значимыми ADME-генами (<https://www.pharmgkb.org/vips>), имея уровень 1 или 2 доказательств.

Несомненным лидером среди генов белков МЛЮ по генетическим вариациям является ген белка P-гр. Полиморфизм в данном гене впервые был обнаружен в 1989 году (Kioka et al., 1989). На 2021 год в нем было идентифицировано 4 453 однонуклеотидных вариантов (SNVs), большая часть которых расположена или в некодирующих областях, или они являются синонимичными (замена нуклеотида не влияет на саму аминокислоту) (Bruckmueller and Cascorbi, 2021). Функциональные последствия воздействия большинства из них на фармакокинетику лекарственных препаратов не выяснены.

Ранее считалось, что, в отличие от собак и кошек, у людей нет мутаций, которые бы приводили к полной потере функции P-гр (Bruckmueller and Cascorbi, 2021; Mealey et al., 2023). В 2001 году было установлено, что молекулярно-генетическая основа так называемой «чувствительности к ивермектину» у собак пастушьих пород (колли) заключается в дефиците P-гр, вызванном делеционной мутацией *ABCB1* (Mealey et al., 2001). Эта делеция приводит к эффекту преждевременного прекращения синтеза P-гр. В 2015 году обнаружили новую нонсенс-мутацию *ABCB1* (1930\_1931del TC) у кошек (Mealey and Burke, 2015). Ивермектин, противопаразитарный препарат, считается безопасным благодаря своей способности выводиться P-гр через гематоэнцефалический барьер. У животных с нонсенс-мутациями в гене P-гр ивермектин вызывает неврологические расстройства, которые могут быть фатальными. Было зарегистрировано несколько случаев неврологических расстройств после лечения ивермектином у людей, но наличие мутаций в гене *ABCB1* у них не исследовали (Chandler, 2018). В 2020 году были обнаружены 2 нонсенс-мутации у человека: 13-летний мальчик поступил в отделение неотложной помощи с нарушениями состояния сознания после приема ивермектина. Секвенирование гена *ABCB1* позволило обнаружить 2 нонсенс-мутации у ребенка. Эти мутации приводили к тому, что в структуре молекулы P-гр отсутствовал C-концевой нуклеотидсвязывающий домен, необходимый для транспорта лекарств (Baudou et al., 2020). Факт, что у человека нонсенс-мутации в гене P-гр крайне редки, указывает на огромное эволюционное значение P-гр в реализации «химического иммунитета».

Наиболее часто исследуемыми генетическими изменениями гена *ABCB1* являются синонимичные варианты 3435 C>T (rs1045642), 1236 C>T (rs1128503) и несинонимичный вариант 2677 G>T/A (rs2032582) (Bruckmueller and Cascorbi,

2021). Несмотря на то, что синонимичные полиморфизмы не оказывают влияния на последовательность кодирующих ими аминокислот, предполагается, что они могут влиять на функциональные характеристики белка-транспортёра (Shen et al., 1999, Chamary and Hurst, 2009) и его субстратную специфичность (Kimchi-Sarfaty et al., 2007).

Впервые клиническая значимость синонимичного полиморфизма 3435C>T (rs1045642) была продемонстрирована в работе Hoffmeyer и коллег (Hoffmeyer et al., 2000). Сравнение результатов генотипирования *ABCB1* (в статье *MDR1*) и соответствующих уровней Р-гр (вестерн-блот) в двенадцатиперстной кишке здоровых добровольцев выявило, что гомозиготный (мутантный) аллель ТТ связан с более чем двукратным снижением уровня экспрессии гена *ABCB1* и синтеза Р-гр по сравнению с гомозиготным аллелем СС (дикий тип). У человека с самым низким уровнем Р-гр был гомозиготный генотип ТТ, а с самым высоким – фенотип СС, и разница в уровнях Р-гр была 65-кратной. У лиц, гомозиготных по полиморфизму ТТ, низкий уровень Р-гр в двенадцатиперстной кишке сопровождался выявлением в плазме крови высокого уровня дигоксина после перорального приёма противоэпилептического препарата и субстрата Р-гр. Таким образом, было впервые продемонстрировано, что снижение уровня Р-гр в кишечнике сопровождается лучшим всасыванием препарата – субстрата Р-гр, что приводит к повышению его концентрации в крови и возрастанию его биодоступности.

Дальнейшие исследования влияния данного полиморфизма на фармакокинетику были противоречивыми (Hodges et al., 2011; Ahmed et al., 2016). У пациентов с мутантным аллелем (3435C>T) были выявлены после приёма однократной дозы дигоксина как низкие концентрации препарата в сыворотке крови (Sakaeda et al., 2001), так и, наоборот, высокие уровни дигоксина в отличие от носителей дикого типа гена *ABCB1* (Verstuyft et al., 2003).

Синонимичный вариант 1236 C>T (rs2032582), по-видимому, также оказывает влияние на конформацию Р-гр, что влияет на его функциональные характеристики (Kimchi-Sarfaty et al., 2007).

В отличие от первых двух вариантов, триаллельный полиморфизм 2677 G>T/A (rs2032582) вызывает аминокислотные замены в цитоплазматической области белка Р-гр. Эксперименты по оценке функциональной активности Р-гр с таким полиморфизмом в гене *ABCB1* указывают на более высокие скорости транспорта субстратов и более высокую активность АТФ-связывающих доменов, чем в диком типе (Schaefer et al., 2006).

Эффект этого варианта на фармакокинетику винкристина был обнаружен у детей с острой лимфобластной лейкемией, хотя он был и незначительный (Plasschaert et al., 2004).

Все 3 описанных выше генетических варианта сцеплены (встречаются у около 70% европеоидов), формируя гаплотипы (Leschziner et al., 2006). В большинстве этнических групп наиболее распространены гаплотип CGC, либо гаплотип ТТТ (Hodges et al., 2011). Однако частота гаплотипов различается между этническими группами (Bruckmueller and Cascorbi, 2021). Предполагается, что именно гаплотипы, а не отдельные генетические вариации оказывают влияние на фарма-

кокинетические параметры субстратов P-gp (Fung and Gottesman, 2009). Множество однонуклеотидных полиморфизмов выявлено в цитохроме P450, который отвечает за детоксикацию лекарств и, что актуально, однонуклеотидный полиморфизм CYP3A5 (A22893G) связан с гаплотипом *ABCB1* (Fung et al., 2009). Несмотря на большую многолетнюю работу по установлению генетического вклада *ABCB1* в распределение лекарств, нет однозначного ответа о роли отдельных полиморфизмов и гаплотипов в биодоступности лекарственных препаратов.

Важно отметить, что биодоступность лекарственных препаратов, в первую очередь, зависит от экспрессии и функциональной активности транспортных белков. Поскольку их экспрессия и функциональная активность демонстрируют широкую изменчивость, была выдвинута гипотеза, что генетические вариации в генах транспортеров могут только частично объяснить межиндивидуальные различия в фармакокинетике лекарственных препаратов и их клиническую значимость (Cascorbi, 2006). Различные внутренние факторы, такие как этническая принадлежность, возраст, пол, физиологические состояния и заболевания органов, а также внешние факторы, такие как диета, использование трав или лекарств, микробиом и воздействие окружающей среды могут оказывать влияние на функцию и экспрессию транспортеров (Galetin et al., 2024).

Данные о клинической значимости полиморфизмов гена *ABCB1* при химиотерапии туберкулёза лёгких достаточно противоречивы, имеется необходимость в увеличении размеров выборок и проведении дополнительных исследований (Naidoo et al., 2019; Tomas et al., 2020). Открытым также остаётся вопрос о взаимосвязи между полиморфизмом *ABCB1* и активностью туберкулёзного воспаления у пациентов с туберкулёзом лёгких.

Имеется только один систематический обзор, в котором авторы следовали рекомендациям Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA). Поиск соответствующих исследований проводился в базах данных PubMed, Embase, Web of Science и Scopus (Sileshi et al., 2022). Целью обзора было оценить вклад генетических вариаций ферментов, метаболизирующих лекарственные препараты, и белков-переносчиков, в том числе *ABCB1*, в индивидуальную вариабельность фармакокинетики рифампицина. По результатам проведённого анализа только результаты трёх статей (Chigutsa et al., 2011; Huerta-García et al., 2019; Medellin-Garibay et al., 2020) были включены в обзор. Авторы делают вывод, что для определения влияния генетических вариаций на фармакокинетику рифампицина, как субстрата P-gp, для оптимизации химиотерапии туберкулёза необходимы дальнейшие контролируемые клинические исследования с достаточным количеством участников в выборках.

В отличие от *ABCB1* ген *ABCG2* не столь высоко полиморфен. Наиболее широко изученными однонуклеотидными полиморфизмами являются следующие несинонимичные варианты: 421 C>A (rs2231142), а также 34 G>A (rs2231137) (Bruckmueller and Cascorbi, 2021). Несколько исследований *in vitro* и *in vivo* показывают, что полиморфизм 421 C>A (rs2231142) вызывает снижение уровня BCRP, в то время как некоторые исследования также описали снижение активности АТФазы, что приводит к снижению функциональной актив-

ности транспортера. Замена аминокислот в результате полиморфизма 34 G>A происходит во внутриклеточном домене и может влиять на встраивание BCRP в плазматическую мембрану (Bruckmueller and Cascorbi, 2021). В последние годы были проведены многочисленные исследования для анализа влияния полиморфизмов гена *ABCG2* на фармакокинетику широкого спектра лекарственных средств, включая противораковые препараты, статины, иммунодепрессанты, противовирусные и противосудорожные препараты. Но среди субстратов данного белка нет ни одного антибиотика, также нет данных о влиянии полиморфизмов данного гена на устойчивость или чувствительность к туберкулёзу.

В *ABCC11* выявлены однонуклеотидные полиморфизмы T1684C и G4002A, которые вызывают функциональные изменения в белке MRP1, и их встречаемость также различается в зависимости от этнической принадлежности.

**Таким образом, продемонстрировано, что снижение уровня Р-гр в клетках кишечника за счёт полиморфизма гена *ABCB1* сопровождается лучшим всасыванием препаратов, что приводит к повышению их концентрации в крови и возрастанию биодоступности. Данные о клинической значимости полиморфизмов гена *ABCB1* при туберкулёзе лёгких достаточно противоречивы и существует необходимость в проведении дополнительных исследований, в том числе с учетом влияния гаплотипов на фармакокинетику противотуберкулёзных препаратов. Открытым также остаётся вопрос о взаимосвязи между полиморфизмом *ABCB1* и активностью туберкулёзного воспаления.**

## 1.6 Заключение к главе 1

Несмотря на то, что основные белки, опосредующие развитие МЛЮ, были открыты 30–50 лет назад, всё ещё остаётся много непонятого как в их структурных особенностях, так и в реализации функциональной активности. И эти завесы открываются только с разработкой новых высокотехнологичных методов исследования. Белки, опосредующие формирование МЛЮ в клетках человека, демонстрируют различия в своей структурной организации, принципах функциональной активности и субстратной специфичности. Именно их структурное и функциональное разнообразие и обеспечивает формирование в опухолевых клетках феномена МЛЮ, а при других заболеваниях – участие этих белков в развитии лекарственной устойчивости к препаратам разного клинического назначения, в том числе, и к противотуберкулёзным.

При пероральном приёме противотуберкулёзные препараты должны преодолеть целый ряд барьеров в виде АТФ-связывающих белков, локализующихся в клетках барьерных органов, прежде чем они достигнут свою мишень – *M. tuberculosis*. Транспорт лекарственных препаратов через плазматические мембраны клеток человека, а также через клеточную стенку и плазматическую мембрану возбудителя является одним из важных аспектов в эффективном лечении туберкулёза. Рифампицин, этамбутол, моксофлоксацин являются субстратами для Р-гр. Для бедаквилаина – одного из современных препаратов для лечения

лекарственно-устойчивого туберкулёза, данный вопрос не прояснён. Ингибирование функциональной активности Р-гр повышает эффективность действия не только рифампицина и этамбутола, но и бедаквилаина в моделях *in vitro* и *in vivo*, а также – ряда ингаляционных препаратов в модели *ex vivo*. Использование фармакологических ингибиторов Р-гр совместно с антибиотиками рассматривается в качестве перспективной стратегии повышения эффективности терапии при туберкулёзе лёгких. Изучение полиморфизмов генов белков МЛУ позволило лучше понять индивидуальные различия в метаболизме лекарств и будущие исследования их значения при противотуберкулёзной терапии должны быть направлены на более комплексные подходы к фармакогенетике для достижения значимого персонализированного подхода в лечении туберкулёза.

## ГЛАВА 2

### БЕЛКИ МЛУ В КЛИНИКЕ ТУБЕРКУЛЁЗА ЛЁГКИХ

#### 2.1 Особенности гранулематозной реакции и белки МЛУ при туберкулёзе

Поражение органов дыхания человека *M. tuberculosis* происходит в подавляющем большинстве случаев воздушно-капельным путём при контакте с бактериовыделителем или инфицированным материалом из окружающей среды. На вероятность заражения влияют: продолжительность контакта с большим активным туберкулёзом, статус иммунной системы и наличие сопутствующих заболеваний. Развитие туберкулёза протекает через разные стадии: от бессимптомной латентной инфекции до активных форм туберкулёза с различной степенью тяжести. Большинство людей, инфицированных *M. tuberculosis*, имеет статус латентно-инфицированных, то есть не имеет клинических признаков болезни, и только у 5–10% развивается активная форма туберкулёза.

Взаимодействие клеток и тканей макроорганизма с *M. tuberculosis* приводит к развитию защитной гранулематозной реакции, имеющей характерные для туберкулёза морфологические проявления. Формирование гранулём происходит в месте внедрения возбудителя за счёт местных клеточных элементов и мигрирующих в эту зону клеток из кровеносного русла. Начало этого процесса связано с протеолитической несостоятельностью резидентных, альвеолярных макрофагов, расположенных на поверхности респираторного эпителия. Их низкая биоцидность и высокая устойчивость клеточных стенок возбудителя к ферментативному расщеплению – причина внутриклеточного паразитирования не только микобактерий туберкулёза, но также *Leishmania*, *Legionella*, *Pseudomonas* (Mantovani et al., 2013). Патогенетически важно, что часть альвеолярных макрофагов с незавершённым фагоцитозом *M. tuberculosis* попадают в богатый сосудами интерстиций, где становятся центром привлечения лимфоцитов и циркулирующих моноцитов. Направленное продвижение мононуклеаров в зону гранулемогенеза связано с формированием градиента концентрации хемокинов, которые выделяют пораженные возбудителем резидентные макрофаги (Nguyen et al., 2012). К ним относятся такие медиаторы воспаления, как TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , PAF (фактор активации тромбоцитов, от англ. platelet-activating factor), MDC (макрофагальный хемокин, от англ. macrophage derived chemokine), лейкотриены (Khan et al., 2019, McMillan et al., 2004). Одновременно сигнал к развитию гранулематозной реакции поступает на Т-лимфоциты и от дендритных клеток. Т-хелперные лимфоциты становятся эффекторами гиперчувствительности замедленного типа. Среди цитокинов, которые они вырабатывают, важное значение для гранулемогенеза имеют фактор торможения миграции моноцитов и IL2. Они ускоряют приток и закрепляют моноциты в очаге инфекции, регулируют их трансформацию в макрофаги воспаления.

Макрофаги воспаления принимают непосредственное участие в формировании адаптивного иммунного ответа и обеспечивают развитие защитных механизмов, направленных как на элиминацию возбудителя за счёт фагоцитоза, так и ограничение зоны воспаления путем её фиброзирования. Возникающая при этом структурно-функциональная гетерогенность макрофагов воспаления связана со способностью клеток изменять свой фенотип в зависимости от условий микроокружения развитием реакций клеточного (опосредованного действием различных субпопуляций Т-лимфоцитов) и/или гуморального (иммунокомплексного) иммунитета. Такая пластичность макрофагов проявляется в процессе поляризации, обеспечивающей многообразие их функциональных возможностей. В настоящее время выделяют 2 основных способа поляризации макрофагов воспаления: классический, который происходит при контакте макрофага с активированным Т-хелпером 1-го типа (Th1), и альтернативный, связанный с действием цитокинов, выделяемых Т-хелперами 2-го типа (Th2) (Mills et al., 2000; Лепеха Л.Н., 2017; Лепеха Л.Н., Ерохина М.В., 2024). Пластичность и поляризация оценивается по цитокиновому профилю и преобладанию тех или иных фагоцитарных рецепторов на поверхности клетки. В первом случае макрофаг приобретает фенотип M1 (провоспалительный), а во втором – фенотип M2 (противовоспалительный).

Классически активированные макрофаги фенотипа M1 формируются под влиянием основных провоспалительных цитокинов (Lastrucci et al., 2015):

- IFN $\gamma$  стимулирует макрофаги к продукции IL12 и костимулирующих молекул CD80 и CD86. Цитокины IL6 и IL12 в синергизме с этими молекулами усиливают пролиферацию Т-лимфоцитов и их дифференцировку.

- IL15 индуцирует продукцию макрофагами дополнительного ростового фактора Т-лимфоцитов.

- MIF (фактор подавления миграции макрофагов) в синергизме с TNF- $\alpha$  индуцирует продукцию макрофагами нитроксидных радикалов.

- TGF $\beta$  – фактор хемотаксиса для гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов.

- Они вырабатывают большое количество IL12, IL23, IL6 и незначительное количество IL10, а также являются активными продуцентами провоспалительных цитокинов, таких как IL1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  (Xue et al., 2018).

- Макрофаги с фенотипом M2 формируются в условиях действия противовоспалительных цитокинов:

- IL10 снижает экспрессию CD80 и CD86, ингибирует продукцию и активность MIF, TNF- $\alpha$ , IL12.

- IL4 и TGF $\beta$  ингибируют секрецию монокинов, но не снижают экспрессию костимулирующих молекул CD80 и CD86.

- IL2 индуцирует продукцию макрофагами TGF $\beta$ , который ингибирует выработку нитроксидных радикалов и простагландина E2, снижает экспрессию рецепторов для IL2 на Т-лимфоцитах.

- Все противовоспалительные цитокины угнетают продукцию макрофагами нитроксидных радикалов.

Они отличаются большими, чем у M1 регуляторными возможностями, участвуют в развитии иммунологического ответа Th2, стимулируют процессы ангио- и фибриллогенеза (Martinez et al., 2008; Kreider et al., 2007).

Специфическим маркером M1-макрофагов является рецептор HLA-DR, который связан с представлением внеклеточных пептидов Т-лимфоцитам. Другими маркерами M1-макрофагов являются CD64, CD32, CD16 – рецепторы Fc-γ, инициирующие фагоцитоз и реакции иммуногенеза. Основными маркерами макрофагов M2-фенотипа являются MARCO-рецептор, маннозный рецептор (MRC1/CD206), металлопротеиназа-9 (MMP-9). MARCO-рецептор опосредует опсонин-независимый фагоцитоз (Jing et al., 2013).

На начальной стадии воспаления в гранулемах преобладают провоспалительные (M1) макрофаги. Активация *M. tuberculosis* фагоцитоза через маннозный рецептор способствует поляризации макрофагов в противовоспалительный (M2) фенотип и обеспечивает выживание в них возбудителя. Динамика изменения соотношения M1/M2 макрофагов в гранулемах определяет исход инфицирования, вызванного *M. tuberculosis* (Marino et al., 2015). Одним из механизмов защиты микобактерий туберкулёза от макрофагов является изменение их пути активации с провоспалительного состояния M1 на противовоспалительное состояние M2 (Marino et al., 2015; Cho et al., 2020). M1 и M2 макрофаги обладают разными функциями и задачами в зоне воспаления, и соотношение M1/M2 является тем триггером, который регулирует направление течения воспалительного процесса при туберкулёзе лёгких (рис. 2.1).

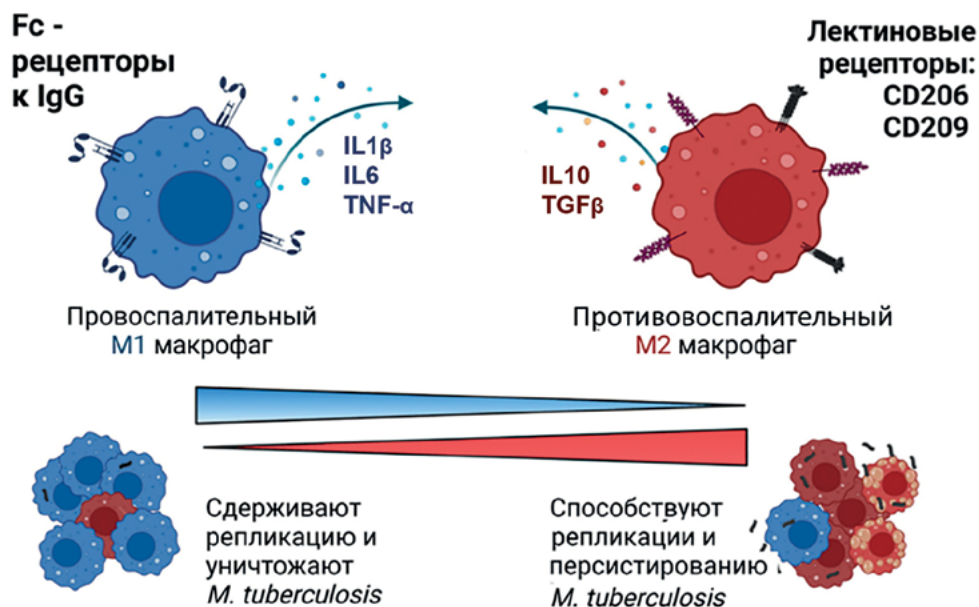


Рис. 2.1. Роль M1 и M2 макрофагов при туберкулёзном воспалении в лёгких. Рисунок сделан с помощью BioRender.com

Метод множественного иммунофенотипирования клеток на гистологических срезах операционного материала лёгких пациентов с туберкулёзом выявил, что в составе гранулём преобладают миелоидные клетки и лимфоциты

(McCaffrey et al., 2022). Миелоидные клетки представлены различными субпопуляциями макрофагов, дендритных клеток и моноцитов с различной степенью экспрессии маркеров CD11c, CD11b, CD209, CD68, CD14, CD16 и CD206. В то время как лимфоидный состав представлен преимущественно CD4<sup>+</sup> лимфоцитами (42,8%), CD8<sup>+</sup> лимфоцитами (30,6%), а также В-лимфоцитами (23,9%). В и CD4<sup>+</sup> Т-клетки более многочисленны в гранулемах без некротического центра, в то время как CD68 макрофаги – в некротизирующих гранулёмах (Sawyer et al., 2023). Применение современной флуоресцентной микроскопии позволяет расширить представления о локализации разных субпопуляций иммунных клеток в очагах специфического воспаления.

Различные цитокины, секретируемые преимущественно иммунными клетками, являются основными регуляторами воспаления при туберкулёзе. При этом сложно однозначно сказать, какие цитокины играют защитную роль, способствуя установлению контроля над инфекцией, а какие способствуют прогрессированию заболевания или повреждению тканей (Domingo-Gonzalez et al., 2016). Наличие динамического баланса между про- и противовоспалительными цитокинами необходимо для формирования адекватной гранулематозной реакции и контроля за микобактериальной инфекцией (Marino et al., 2015). В табл. 2.1 суммированы современные данные о роли ключевых цитокинов при туберкулёзе.

**Табл. 2.1.** Роль основных цитокинов в регуляции туберкулёзного воспаления

Цитокин	Основной источник	Роль при туберкулёзном воспалении
TNF- $\alpha$	M1 макрофаги	Иницирует и координирует продукцию множества провоспалительных цитокинов, необходим для формирования гранулёмы, низкий уровень может способствовать реактивации латентного ТБ, высокий уровень вызывает повреждение тканей (Saunders et al., 2005; Robert and Miossec, 2021; van Loo and Bertrand, 2023).
IFN $\gamma$	CD4 <sup>+</sup> Т-лимфоциты (Th1), CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, NK клетки	Участвует в формировании гранулёмы, его дефицит связан с повышенным риском развития активных форм ТБ, активирует фагоциты, ограничивает моноцитарную и нейтрофильную инфильтрацию в зоны воспаления (Smith et al., 1997; Kim et al., 2011).
TGF $\beta$	Миофибробласты, эпителиодные клетки, макрофаги	Участвует в формировании гранулёмы, подавляет продукцию IFN $\gamma$ ; высокий уровень вызывает чрезмерное образование рубцовой ткани и фиброз; необходим для заживления тканей в постинфекционном периоде (DiFazio et al., 2016; Gem et al., 2021; Cronan et al., 2021a)

Цитокин	Основной источник	Роль при туберкулёзном воспалении
IL1 $\beta$	Дендритные клетки, макрофаги	Активирует фагоцитоз, необходим для установления контроля над патогеном, сдерживает репликацию бактерий, способствует нейтрофильной инфильтрации паренхимы лёгких (Jayaraman et al., 2013; Silvério et al., 2021)
IL10	T-регуляторные лимфоциты, M2 макрофаги	Блокирует созревание фагосом в макрофагах, презентацию антигена в дендритных клетках, ингибирует индукцию Th1 ответа лимфоцитами и IFN $\gamma$ -опосредованную активацию макрофагов (Oswald et al., 1992), но также необходим для ремоделирования тканей и заживления в постинфекционном периоде (Domingo-Gonzalez et al., 2016)
IL6	Миелоидные и лимфоидные типы клеток	Обеспечивает ранний иммунитет против <i>M. tuberculosis</i> , критически важен при высокой бактериальной нагрузке, способствует рекрутированию моноцитов в зону воспаления, вызывает «цитокиновый шторм» (Ladel et al., 1997; Bost et al., 2020; Boni et al., 2022).

Таким образом, за последние годы значительно расширились не только представления о клеточном составе гранулём, но и о спектре и роли цитокинов, продуцируемых этими клетками. Развитие этой области знаний способствовало интенсивному формированию патогенетического направления в терапии туберкулёза лёгких – терапии, направленной на пациента или «терапии, направленной на хозяина» (HDR, от англ. Host-directed therapy). Цель этой терапии – поиск диагностических и прогностических маркеров, а также мишеней в организме пациента, через воздействие на которые возможно влиять на развитие и исход заболевания.

### Белки МЛУ при туберкулёзном воспалении

В развитии разных респираторных заболеваний, и прежде всего туберкулёза, роль белков МЛУ не всегда удаётся идентифицировать. Это связано с разнообразным клеточным составом и сложной архитектурной организацией лёгких как в норме, так и при развитии патологических процессов. Например, для разных вариантов рака лёгкого продемонстрирована связь между высокими уровнями экспрессии генов МЛУ и снижением эффективности проводимой противоопухолевой химиотерапии. Повышение уровня экспрессии генов *ABCB1* и *ABCC1* (в статье *MRP1*, *MDR1*) и их белков коррелирует с инвазивным потенциалом, метастазированием и частотой рецидивов таких опухолей. Высокие уровни экспрессии генов и белков МЛУ свидетельствуют о неблагоприятном прогнозе течения заболевания (Trussardi-Regni et al., 2007).

В иммунных клетках на уровень экспрессии гена *ABCB1* белка P-gp могут оказывать влияние различные факторы, которые присутствуют при туберкулёзном воспалении.

Так, показано, что *провоспалительные цитокины* повышают уровень экспрессии гена *ABCB1* в иммунных клетках:

–  $IFN\gamma$  увеличивает уровень экспрессии *ABCB1* в макрофагах (Puddu et al., 1999);

– в мононуклеарах периферической крови цитокины IL2, IL6, IL12, TGF $\beta$ , TNF- $\alpha$  и  $IFN\gamma$  повышают экспрессию *ABCB1* (Liptrott et al., 2009);

– в клеточных линиях ССRF-СЕМ (острая лимфобластная лейкемия) и ТНР-1 (острый моноцитарный лейкоз) уровень экспрессии *ABCB1* увеличивается под воздействием как ЛПС, так и таких цитокинов, как TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 и IL17 (Liu et al., 2015);

– в лимфоцитах TNF- $\alpha$  и IL17 оказывают наиболее сильные стимулирующие эффекты, увеличивая уровень экспрессии *ABCB1* в 5,9 раз и 4,2 раза соответственно;

– в моноцитарных клетках наиболее сильный эффект оказывал ЛПС, который увеличивал уровень экспрессии гена *ABCB1* в 15,2 раза, а TNF – в 7,1 раза.

Необходимо принимать во внимание не только используемые экспериментальные модели, но и временные рамки проведения исследований. Так, Harts и соавторы продемонстрировали изменение функциональной активности Р-гр в зависимости от сроков эксперимента. Под действием TNF- $\alpha$  и эндотелина-1 в капиллярах головного мозга крыс в течение нескольких минут происходит инактивация Р-гр (Hartz et al., 2006). Однако результаты исследования долгосрочных последствий воздействия TNF- $\alpha$  и эндотелина-1 показали, что снижение активности Р-гр не сопровождается снижением транскрипционной активности *Abcb1*: после 2–3-часового плато низкой активности Р-гр наступало резкое увеличение как его транспортной активности, так и экспрессии гена. И эти показатели превысили в 2 раза показатели контрольной группы (Baueer et al., 2007).

*Патогенные внутриклеточные микроорганизмы* также могут влиять на экспрессию генов ABC-транспортёров:

– продемонстрировано влияние *M. tuberculosis* на изменение уровня экспрессии *ABCB1* в клеточной линии промоноцитов U1 (субклон линии U937 хронически инфицированных вирусом ВИЧ). Было показано, что в макрофагах с персистирующим ВИЧ повышается экспрессия гена *ABCB1* при заражении *M. tuberculosis* (Gollapudi et al., 1994);

– показана индукция транскрипции гена *ABCB1* в моноцитах ТНР-1 при их инфицировании *Listeria monocytogenes* (Sigal et al., 2015);

– исследовано влияние *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* на экспрессию *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2* (в статье MDR1, MRP1 и BCRP) в эпителиальных клетках HC11 (эпителий молочных желез), и обнаружено повышение уровня экспрессии гена *ABCB1*. Для генов *ABCC1* и *ABCG2* такого эффекта показано не было. Стоит также отметить, что авторы работы обнаружили сильную корреляцию между экспрессией *ABCB1* и гена цитокина IL6 в ответ на инфицирование (Yagdiran et al., 2016);

– экспрессия *ABCB1* увеличивается в макрофагах человека, полученных из моноцитов периферической крови, на поздних стадиях их инфицирования *M. tuberculosis* (Wu et al., 2019).

– На экспрессию P-gr может влиять гипоксия, которая, как было продемонстрировано современными методами исследования, выражена в лёгких пациентов с туберкулёзом лёгких (Belton et al., 2016);

– на культуре клеток LS513 (карцинома толстой кишки человека) показано, что гипоксия индуцирует экспрессию HIF1 $\alpha$  и *ABCBI*, а ингибирование HIF1 $\alpha$ , в свою очередь, приводит к снижению экспрессии *ABCBI* (Ding et al., 2010);

– на клеточной линии немелкоклеточной карциномы лёгкого человека продемонстрировано, что ингибирование HIF1 $\alpha$  приводит к снижению уровня экспрессии гена *ABCBI* и уровня P-gr в клетках (Chen et al., 2016)

Отмечается роль BCRP в формировании механизмов защиты клеток против гипоксии (Sarkadi et al., 2004).

Одним из механизмов защиты микобактерий туберкулёза от внутриклеточных механизмов макрофагов является изменение пути их активации с провоспалительного M1 на противовоспалительный – M2 (Зенков и др., 2015). Одной из причин выживаемости возбудителя в M2 макрофагах может быть более высокая активность P-gr: в макрофагах с фенотипом M2 функциональная активность P-gr выше, чем в M1-макрофагах (Cory et al., 2016).

**Таким образом, в исследованиях, в первую очередь, уделяется внимание роли P-gr при воспалении и продемонстрировано, что на его экспрессию и функциональную активность могут оказывать влияние различные факторы воспаления.**

Не только различные факторы воспаления влияют на экспрессию P-gr, но и P-gr может оказывать влияние на выраженность и специфику воспалительного ответа.

Так, мыши с тройным нокаутом по генам *Abcc1/Abcb1a/Abcb1b* демонстрировали сниженный воспалительный ответ на воздействие сигаретным дымом. У таких мышей выявлено снижение уровня провоспалительных цитокинов, уменьшение числа воспалительных инфильтратов в лёгких, меньше макрофагов и В-лимфоцитов (van der Deen et al., 2007).

На модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита как на острой, так и на прогрессирующей стадии было показано, что мыши с двойным нокаутом по генам *Abcb1a/Abcb1b* демонстрируют снижение клинических признаков заболевания по сравнению с животными дикого типа. Наблюдаемые различия в клинических признаках связаны с более низким уровнем демиелинизации нейронов в головном мозге нокаутных мышей и гораздо меньшим количеством макрофагов в воспалительных инфильтратах. Кроме того, у нокаутных мышей практически не было Т-лимфоцитов в воспалительных инфильтратах как в острой (15 дней), так и в прогрессирующей (29 дней) фазах заболевания (Kooij et al., 2009).

Предполагается, что P-gr участвует в транспорте провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL2, IL4, IL12, IFN $\gamma$ ) из Т-лимфоцитов, так как ингибирование P-gr уменьшает их секрецию (Drach et al., 1996).

P-gr участвует в цитотоксической эффекторной функции как CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Gupta et al., 1992), так и NK-клеток (Klimecki et al., 1994). Эффекторные ответы NK-клеток человека были снижены в присутствии ингибиторов, блокирующих функции P-gr. Хотя позже в работе Schinkel с соавторами

(1997) было показано, что НК-клетки мышей с двойным нокаутом по генам *Abcb1a* и *Abcb1b* проявляют цитотоксические эффекты, сравнимые с таковыми у НК-клеток мышей дикого типа (Schinkel et al., 1997).

P-гр может быть необходим для созревания и активации дендритных клеток. Ингибирование функциональной активности P-гр венлафаксином препятствует созреванию и активации дендритных клеток, что подтверждается низкой экспрессией костимулирующих молекул (CD80, CD86, МНСI, МНСII) и снижением уровня секреции цитокинов IL1a, IL10 и IL12 в ответ на стимуляцию ЛПС (Lee et al., 2011). Ингибирование функциональной активности P-гр также влияет на функции дендритных клеток, уменьшая их способность стимулировать аллогенную пролиферацию Т-клеток.

**Таким образом, белки МЛЮ выявляются в клетках, играющих ключевую роль при воспалении. Факторы воспаления, такие как возбудитель, провоспалительные цитокины, гипоксия индуцируют активность белков МЛЮ. Необходимо отметить, что все эти факторы присутствуют при туберкулёзном воспалении и могут быть индукторами активности белков МЛЮ. С другой стороны, многочисленные исследования *in vitro* и *in vivo* подтверждают иммуномодулирующую роль в первую очередь P-гр и его влияние на выраженность и активность воспалительной реакции, что подчёркивает актуальность их изучения при туберкулёзном воспалении.**

## **2.2 Морфологическая характеристика туберкулём, визуализация *M. tuberculosis* и анализ экспрессии генов белков МЛЮ**

В нашем исследовании мы использовали резекционные образцы лёгких, полученные исключительно от пациентов с диагнозом «туберкулёма». Туберкулёма лёгкого – форма туберкулёза, при которой в лёгком формируется инкапсулированный казеозно-некротический очаг, обычно округлой формы (Авербах М.М., 1964; Лепеха и др., 2017). Если в середине прошлого века доля туберкулём среди других форм туберкулёза лёгких составляла 1% (Авербах М.М., 1964), то к настоящему времени их доля увеличилась до 20% (Giller et al., 2018).

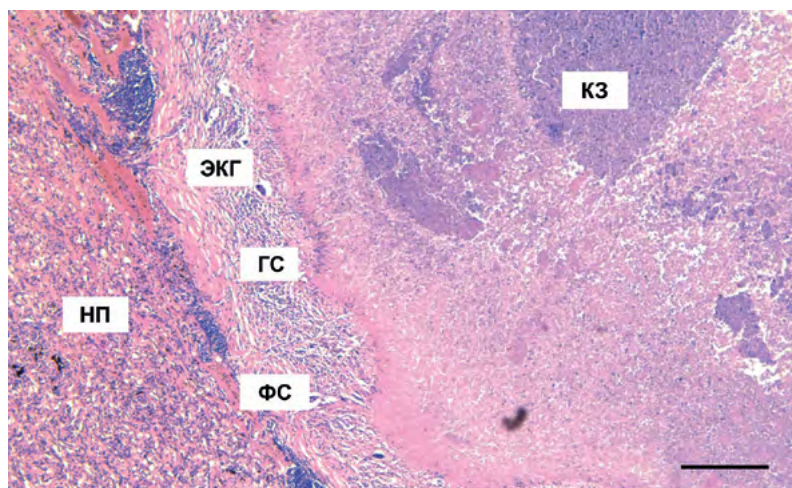
Ориентация только на эту клиническую форму позволила:

- 1) стандартизировать образцы для анализа и исключить влияние факторов, связанных с другими формами туберкулёза;
- 2) выделить для анализа отдельно группы с высокой и умеренной активностью специфического воспаления.

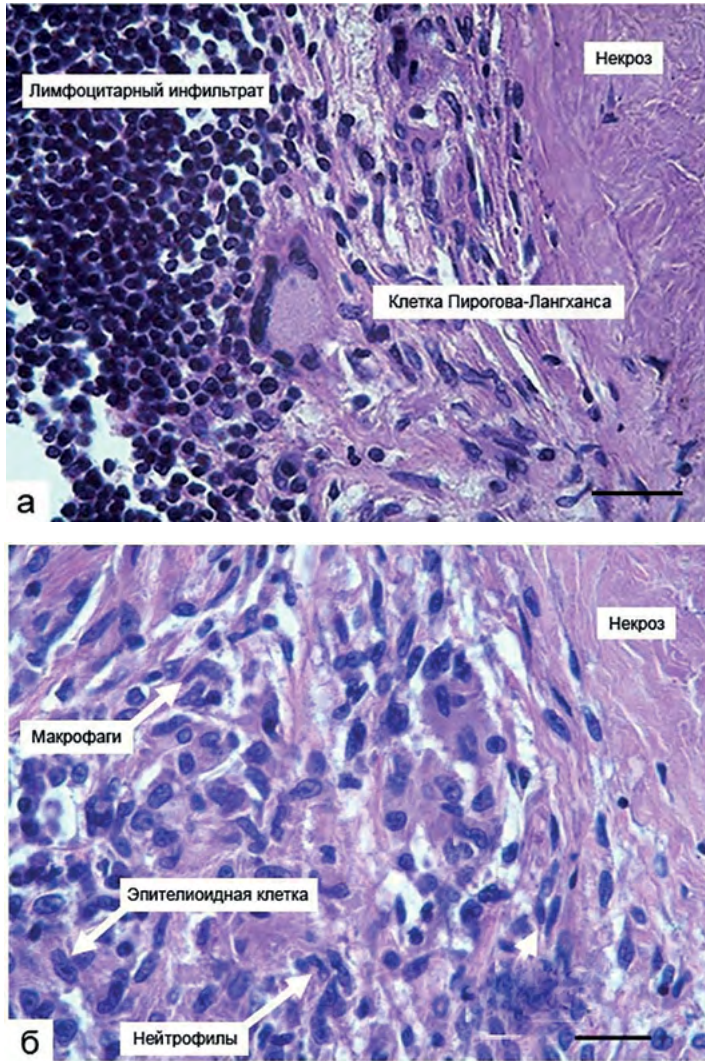
Классическая туберкулёма представляет собой объёмное образование диаметром более 12 мм. В центре туберкулёмы располагается область казеозного некроза, отграниченного капсулой от зоны альвеол. Капсула туберкулёмы имеет 2 слоя: наружный фиброзный слой, состоящий из коллагеновых волокон, и внутренний грануляционный слой, состоящий преимущественно из макрофагов, эпителиоидных клеток и клеток Пирогова – Лангханса, а также сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов (Холодок и др., 2014; Giller et al., 2018). Сам процесс формирования туберкулём может находиться на разной стадии.

## Морфологическая характеристика туберкулём

Для туберкулём с высокой активностью воспалительного процесса характерно наличие рыхлого казеозного некроза с участками расплавления в его центре или по периферии. Он окружен непрерывным грануляционным слоем, обильно инфильтрированным лимфоцитами и макрофагами, среди которых определяются нейтрофильные лейкоциты и их небольшие скопления (рис. 2.2). Макрофаги формируют многоядерные формы, в том числе в виде характерных клеток Пирогова – Лангханса. Также имеются отдельные эпителиоидные клетки и формирующиеся эпителиоидно-клеточные гранулёмы. Фиброзный слой, более тонкий, чем грануляционный, состоит преимущественно из волокнистых структур. Он также может быть инфильтрирован клеточными элементами воспаления, которые распространяются на окружающую легочную ткань с формированием зон неспецифической пневмонии (рис. 2.3, 2.4).

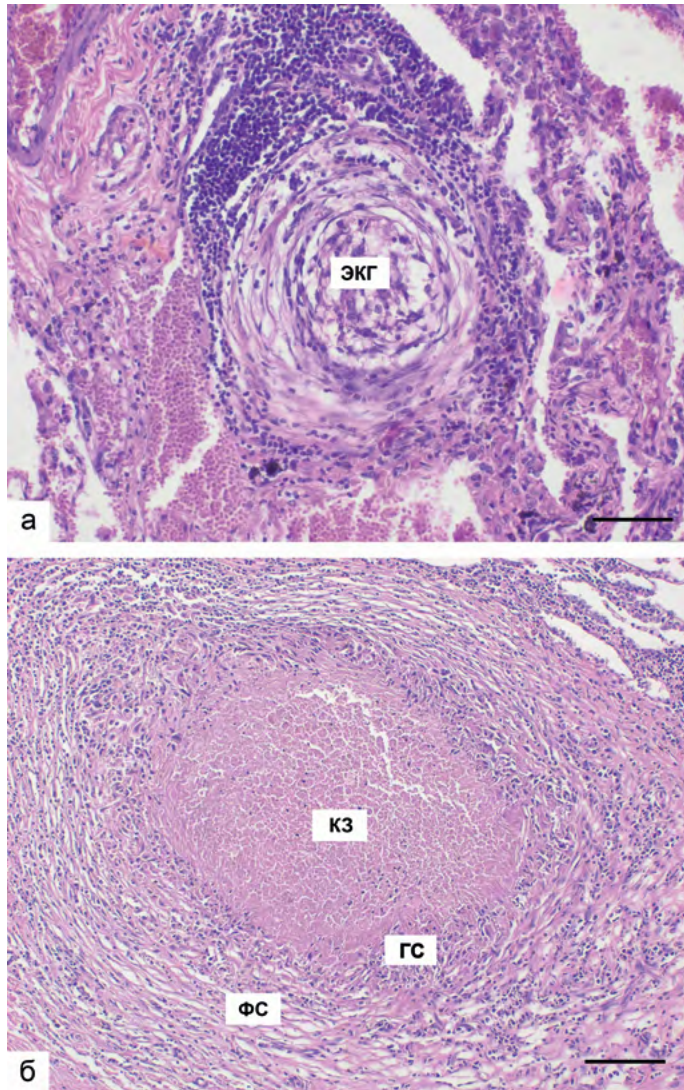


**Рис. 2.2.** Туберкулема легкого с признаками высокой активности воспалительного процесса. Казеозный некроз (КЗ) с участками расплавления в центре окружен капсулой, состоящей из широкого грануляционного слоя (ГС), содержащего формирующиеся эпителиоидно-клеточные гранулёмы (ЭКГ), и узкого фиброзного слоя (ФС); перифокальная зона с фрагментами неспецифической пневмонии (НП). Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок 100 мкм



**Рис. 2.3.** Особенности клеточного состава грануляционного слоя туберкулёмы с высокой активностью воспалительного процесса: а – участок лимфоцитарного инфильтрата, клетки Пирогова – Лангханса; б – нейтрофильные лейкоциты среди макрофагов и эпителиоидных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабные отрезки а, б = 40 мкм

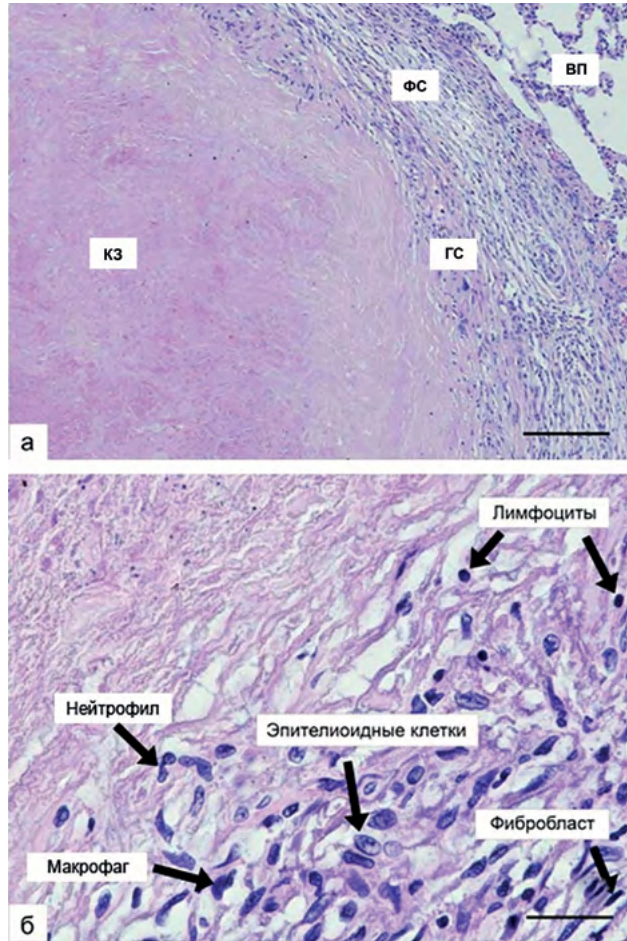
Характерной особенностью туберкулём с высокой активностью воспалительного процесса является наличие свежих очагов отсева, которые выявляются как в перифокальной зоне, так и в более отдалённой лёгочной ткани. Чаще всего они носят лимфогематогенный характер, имеют вид формирующихся или полностью сформированных эпителиоидно-клеточных гранулём с некрозом или без (рис. 2.4а). Повсеместно определяются небольшие участки казеозного некроза, обычно окруженные непрерывным слоем грануляционной ткани и фиброзным слоем различной степени выраженности (рис. 2.4б).



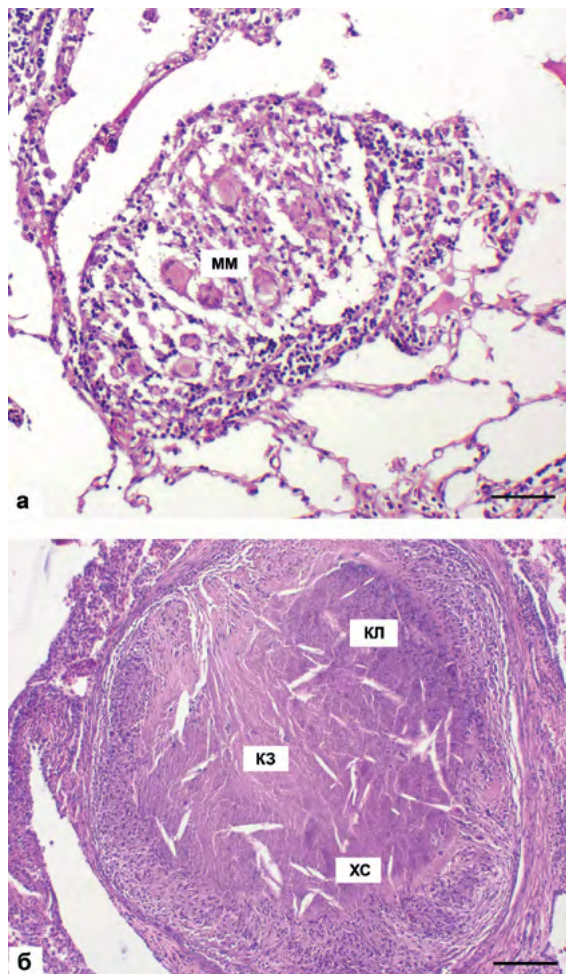
**Рис. 2.4.** Очаги отсева туберкулёмы лёгкого с признаками высокой активности воспалительного процесса: а – эпителиоидно-клеточная гранулёма (ЭКГ) с некрозом; б – очаг казеозного некроза (КЗ), окруженный грануляционным (ГС) и фиброзным слоями (ФС). Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок а, б = 200 мкм

При умеренной активности воспалительного процесса туберкулёмы лёгкого имеют уплотненный казеозный некроз без выраженных признаков расплавления. Он по-прежнему окружён двуслойной капсулой, состоящей из грануляционного и фиброзного слоёв, но последний значительно шире, содержит сформированные пучки соединительно-тканых волокон (рис. 2.5).

**Рис. 2.5.** Туберкулёма с признаками умеренной активности воспалительного процесса: *а* – фрагмент туберкулёмы, преобладает фиброзный слой (ФС), сформированный волокнами и фибробластами, сохраняются участки грануляционной ткани (ГС), перифокально определяется воздушная паренхима (ВП); *б* – фрагмент туберкулёмы с увеличением, область казеозного некроза (КЗ) и клетки грануляционного слоя, среди которых умеренное количество лимфоцитов и макрофагов, отдельные нейтрофилы, эпителиоидные клетки и фибробласты. Окраска гематоксилином и эозином.  
*а* = 200 мкм,  
*б* = 40 мкм



Грануляционный слой чаще всего фрагментирован, содержит клеточные элементы воспаления, среди которых преобладают макрофаги и лимфоциты, определяются отдельные нейтрофилы, многоядерные макрофаги «типа инородных тел» и/или Пирогова – Лангханса. В отдельных случаях здесь же выявляются формирующиеся эпителиоидно-клеточные гранулёмы без некроза. В перифокальной зоне туберкулём на значительном протяжении сохраняется воздушная паренхима, можно видеть небольшие скопления лимфоцитов, в том числе с формированием отдельных лимфонодулей. Здесь же определяются немногочисленные эпителиоидно-клеточные гранулёмы продуктивного типа (рис. 2.6а), а также очаги казеозного некроза с признаками организации (рис. 2.6б).



**Рис. 2.6.** Очаги отсева при туберкулёме лёгкого с признаками умеренной активности воспалительного процесса: а – эпителиоидно-клеточная гранулёма продуктивного типа с многоядерными макрофагами (ММ); б – очаг казеозного некроза (КЗ) с признаками организации, отложениями холестерина (ХС) и солей кальция (КЛ). Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок: а = 200 мкм, б = 100 мкм

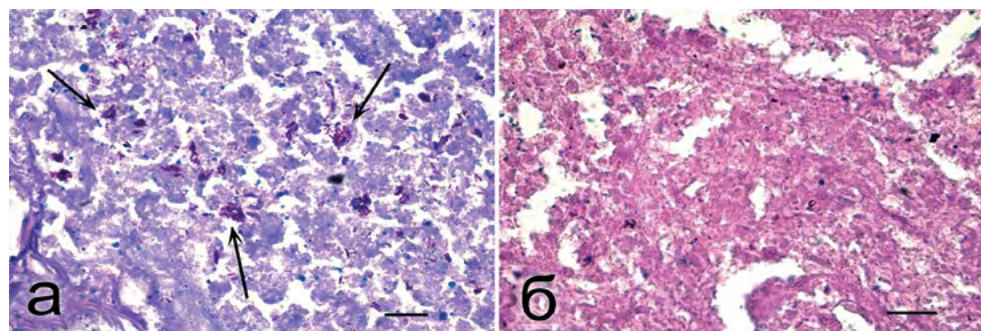
Последние содержат равномерно уплотнённый казеоз, окружённый небольшими фрагментами грануляционной ткани и зрелым фиброзным слоем.

Для высокой активности воспаления характерна инфильтрация перифокальной зоны клетками воспаления и образование гранулём без очагов некроза, а также очагов отсева. Мы предположили, что эти инфильтраты могут включать иммунные клетки с высокой экспрессией *ABC*-транспортёров и проанализировали их экспрессию в области прилегающей к капсуле туберкулёмы, так называемой перифокальной области (ПФО). Ткани лёгких, окружающие туберкулёмы, сенсибилизированы и высокочувствительны к туберкулину даже при его инъекции в отдалённые от специфического туберкулёзного воспаления области лёгких (Hunter, 2020). В связи с этим мы предположили, что анализ экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1* и *ABCG2* в перифокальной области будет в большей степени отражать системный характер воспаления и параметры иммунной системы, чем непосредственно внутри туберкулёма.

## Иммунофлуоресцентная визуализация *M. tuberculosis*

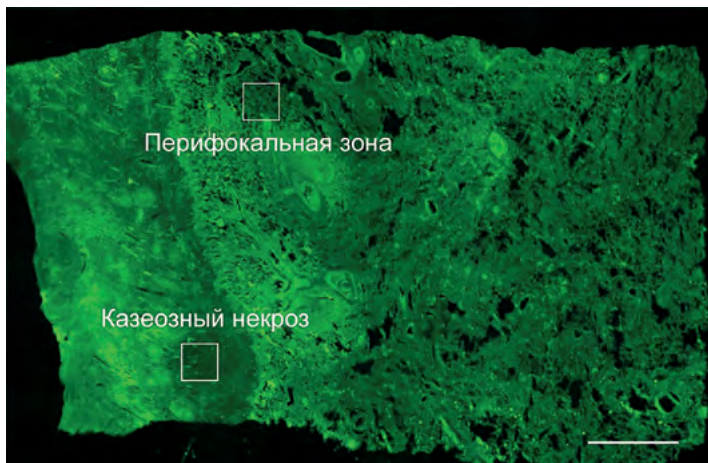
В настоящее время при диагностике туберкулёза использование световой микроскопии более распространено, чем использование флуоресцентной микроскопии. В то же время, появление лазерной конфокальной микроскопии значительно расширяет возможности анализа гистологических препаратов.

В целях оценки присутствия и распределения *M. tuberculosis* в разных зонах туберкулёма была разработана технология их иммуногистохимической верификации (совместно с д.б.н. Е.Е. Воронежской и д.б.н. Л.П. Незлиным, ИБР им. Н.К.Кольцова РАН). Традиционным морфологическим методом, который применяется для выявления *M. tuberculosis* при помощи световой микроскопии, является окрашивание по методу Циля – Нильсена: на рис. 2.7а представлены многочисленные скопления *M. tuberculosis* в зоне некроза, выявленные данным методом. Следует отметить, что методика окрашивания *M. tuberculosis* по методу Циля – Нильсена имеет ряд ограничений: метод не является строго специфичным для туберкулёзных микобактерий, так как вызывает окрашивание и других кислотоустойчивых микроорганизмов (Muller and Taylor, 1972; Henriksen and Pohlenz, 1981). С учётом того, что размеры одиночных микобактерий находятся на пределе оптического разрешения микроскопа, вероятность их идентификации в ткани при низкой плотности распределения резко снижается (рис. 2.7б). В случае низкой плотности распределения *M. tuberculosis* выявляются в виде трудно идентифицируемых редких одиночных колоний, состоящих из 2–3 палочковидных микобактерий (размер бактерии 1 мкм), или в виде одиночных округлых бактерий (размером до 0,5 мкм), (рис. 2.7в-е), что затрудняет верификацию диагноза. В связи с этим, для более специфичного выявления и оценки распределения *M. tuberculosis* на гистологических срезах был разработан иммуногистохимический метод выявления *M. tuberculosis* с использованием поликлональных антител (получены В.Г. Авдиенко, отдел иммунологии ЦНИИТ) с последующим их флуоресцентным маркированием и визуализацией при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (Erokhina et al., 2016, 2019).



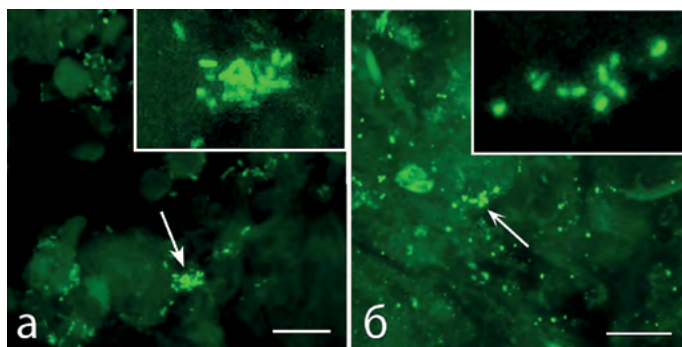
**Рис. 2.7.** Окрашивание *M. tuberculosis* по методу Циля – Нильсена в туберкулёмах лёгких. Скопление *M. tuberculosis* в области казеозного некроза в образце с высокой (а) и умеренной (б) активностью воспалительного процесса. Масштабный отрезок = 10 мкм

Для этого сначала при среднем увеличении микроскопа с использованием техники автоматической сшивки соседних изображений получали обзорный снимок участка ткани площадью до 10 мм<sup>2</sup> и толщиной 50 мкм. После этого определяли на нём различные зоны туберкулёзного воспаления – область казеозного некроза и перифокальную зону (рис. 2.8).



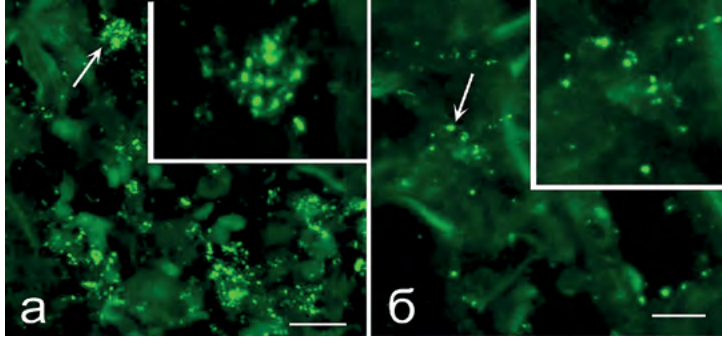
**Рис. 2.8.** Иммуногистохимическое выявление *M. tuberculosis* в туберкулёмах лёгких (общий вид среза). Обзорное изображение гистологического среза толщиной 50 мкм (FV10i, объектив10x/0.4, автоматическая сшивка 20 последовательных изображений) с морфологической идентификацией области казеозного некроза и перифокальной зоны. Масштабный отрезок = 1 мм. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Анализ области казеозного некроза показал, что в ней выявляются как крупные скопления, так и единичные бактерии (рис. 2.9). При большом увеличении микобактерии туберкулёза были обнаружены в виде агрегатов из палочковидных бактерий и их округлых форм (рис. 2.9а,б), выявлены характерные колонии из 3–7 бактерий и одиночные палочковидные формы длиной от 1 до 2 мкм.



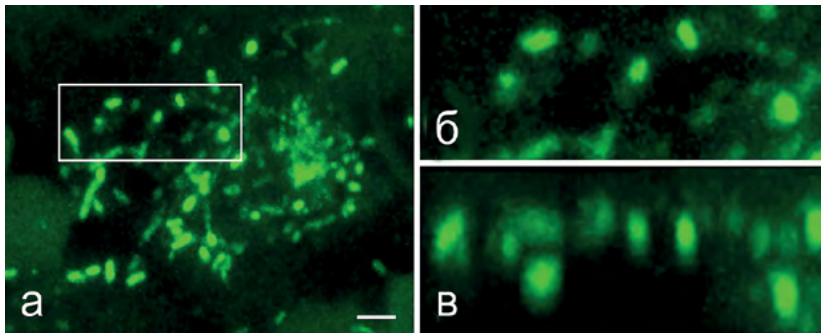
**Рис. 2.9.** Иммунофлуоресцентное выявление *M. tuberculosis* в туберкулёме лёгкого (казеозный некроз). обнаружены группы (а) и небольшие скопления *M. tuberculosis* (б). Вставки: увеличение структур, отмеченных стрелками. Масштабный отрезок = 10 мкм. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Обзорные изображения, полученные с перифокальной зоны, показали, что *M. tuberculosis* формируют крупные скопления (рис. 2.10а), имеют дисперсное распределение (рис. 2.10б) или образуют одиночные колонии, в которых бактерии имеют палочковидную форму и размеры от 0,5 до 1 мкм.



**Рис. 2.10.** Иммунофлуоресцентное выявление *M. tuberculosis* в туберкулёме лёгкого (перифокальная зона). *M. tuberculosis* представлены в виде крупных (а) или мелких скоплений (б). Вставки: увеличенное изображение структур, показанных стрелками. Масштабный отрезок = 10 мкм. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

3D-реконструкция позволяет проанализировать структуру отдельных бактерий и их агрегатов в проекциях XY и XZ (рис. 2.11). 3D-анализ подтвердил, что округлые бактерии сохраняют свою форму во всех проекциях, что доказывает наличие атипичных, округлых форм бактерий в тканях лёгких при туберкулёзе.



**Рис. 2.11.** Иммунофлуоресцентное выявление *M. tuberculosis* в перифокальной области туберкулёма: а – скопление *M. tuberculosis* округлой и вытянутой формы; б – вид *M. tuberculosis* при большом увеличении в области, отмеченной прямоугольником; в – проекция XZ после деконволюции показывает, что структуры действительно округлой формы, масштабный отрезок = 2 мкм. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

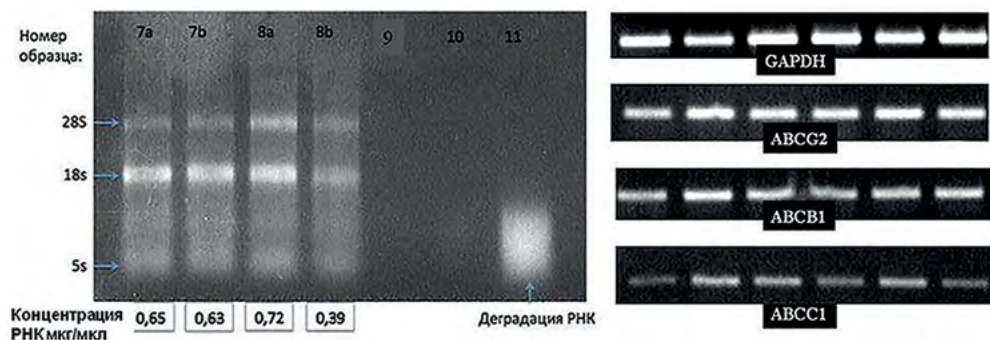
Полученный результат демонстрирует преимущества использования гистологических срезов толщиной 50 мкм и полученных с них оптических срезов (20 мкм и более) перед стандартными гистологическими срезами для выявления массива

*M. tuberculosis*. Одиночные *M. tuberculosis*, их скопления и колонии выявляются как в зоне казеозного некроза, так и в перифокальной области. Использование метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии позволило подтвердить наличие видоизменённых форм *M. tuberculosis*, имеющих округлую форму и размеры 0,5 мкм в клиническом материале. Иммуногистохимическое маркирование с использованием поликлональных антител и методических возможностей конфокальной микроскопии подтвердило присутствие *M. tuberculosis* как в зонах казеозного некроза, так и в перифокальной области во всех клинических образцах туберкулём лёгкого, выбранных для дальнейшего анализа на экспрессию генов белков МЛУ.

### Анализ экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2* ABC-транспортёров (P-gp, MRP1, BCRP) в перифокальной зоне туберкулём

Для проведения молекулярно-генетического анализа экспрессии генов белков МЛУ при туберкулёзном воспалении была разработана методология забора образцов из разных зон специфического воспаления для определения наиболее информативной из них. Методология была разработана с участием к.б.н. Екатерины Юрьевны Рыбалкиной на базе лаборатории генетики опухолевых клеток НИИ Канцерогенеза.

В целях разработки методологии анализа экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2* материал брался из некротического очага, зоны капсулы и, как правило, из 2 участков перифокальной области (на расстоянии примерно 0,5 см от капсулы). Первоначальная оценка качества выделения общей рНК из 12 образцов показала, что в областях некротического очага рНК сильно разрушена и в 1% агарозном геле реперные участки, соответствующие рибосомной рНК, не регистрируются (рис. 2.12).



**Рис. 2.12.** Примеры оценки качества общей рНК, выделенной из образцов перифокальной зоны (7а, 7б), капсулы (8а, 8б, 9, 10) и области некроза (11). Указаны полосы, соответствующие рНК 28S, 18S и 5S (рис. слева). На рис. справа показан пример экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2* в перифокальной зоне туберкулёмы (полуколичественный метод ОТ-ПЦР)

В связи с этим было решено не брать в анализ область капсулы, так как материал капсулы в результате забора оказывался гетерогенным, иногда с преобладанием участков некроза. Это сказывалось на результатах анализа сохранности рНК. Соответственно, для дальнейшего анализа экспрессии генов МЛУ был ис-

пользован только материал, полученный из перифокальной зоны туберкулём. В дальнейшем в реакцию обратной транскрипции брали только образцы с общей РНК высокого качества.

Молекулярно-генетический анализ экспрессии генов был сделан в период 2017–2018 гг. (выборка 1) и 2021–2022 гг. (выборка 2) методом ПЦР в реальном времени. В главе представлены результаты обоих исследований (выборки составили 26 и 35 пациентов соответственно).

Анализ полученных данных показал, что в выборке 1 во всех образцах туберкулём (перифокальные зоны) регистрируется экспрессия 3 основных генов МЛУ человека: *ABCBI*, *ABCCI* и *ABCG2*. При этом наблюдается значительная вариабельность в уровнях экспрессии анализируемых генов: наиболее высокие значения характерны для гена *ABCBI*, низкие – для генов *ABCCI* и *ABCG2* (табл. 2.2). Разница в уровне экспрессии между геном *ABCBI* (наиболее высокая экспрессия) и геном *ABCCI* (самый низкий уровень экспрессии) различается в 270 раз при умеренной активности воспалительного процесса и в 299 раз – при высокой активности.

**Табл. 2.2.** Анализ экспрессии генов *ABCBI*, *ABCCI*, *ABCG2* в туберкулёмах с разной активностью воспаления (выборка 1)

гены \ группы	туберкулёмы с умеренной активностью	туберкулёмы с выраженной активностью
<i>ABCBI</i>	29,70 (21,40–36,30)	215,00* (132,0–236,00)
<i>ABCCI</i>	0,11 (0,057–0,14)	0,72* (0,345–1,15)
<i>ABCG2</i>	2,5 (0,8–3,1)	7,3* (5,1–9,0)

Даны значения медианы и квартили 1–3 (25–75%).  $N(VA) = 14$ ;  $N(VA) = 12$ , где  $N$  – число пациентов; \* –  $p < 0,01$

Выявлено, что медианы уровней экспрессии генов *ABCBI*, *ABCCI* и *ABCG2* демонстрируют более высокие значения при высокой активности туберкулёзного воспаления (в 7,2, 6,5 и 2,9 раз соответственно) по сравнению с умеренной активностью воспалительного процесса. Наиболее существенное увеличение экспрессии идентифицировано для гена *ABCBI*: с 29,7 у.е. при умеренной активности воспаления до 215 у.е. при высокой активности воспалительного процесса. Данные статистически значимы при  $p < 0,05$  (U-критерий Манна – Уитни).

В выборке 2 наблюдалась значительная вариабельность в уровне экспрессии анализируемых генов: для *ABCBI* выявлены самые высокие значения относительного уровня экспрессии – 36,34 (23,02–118,81) у.е., средние значения для *ABCG2* – 3,75 (1,36–7,96) у.е. и самые низкие значения для *ABCCI* – 0,14 (0,08–0,58) у.е. Значения экспрессии генов для групп туберкулём с разной активностью воспаления приведены в табл. 2.3.

**Табл. 2.3.** Анализ экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2* в туберкулёмах с разной активностью воспаления (выборка 2)

гены \ группы	туберкулёмы с умеренной активностью	туберкулёмы с высокой активностью
<i>ABCB1</i>	25,00 (23.87–47.95)	102.65* (38.43–148.12)
<i>ABCC1</i>	0,2 (0,1–1,0)	0,2 (0,1–0,5)
<i>ABCG2</i>	3 (1,0–7,5)	6 (2,0–12,0)

Даны значения медианы и квартили 1–3 (25–75%).  $N(VA) = 15$ ;  $N(BA) = 20$ , где  $N$  – число пациентов; \* –  $p < 0,01$

Данные, полученные на клиническом материале – туберкулёмах, согласуются с полученными нами ранее результатами об уровнях экспрессии генов *ABCB1* (*MDR1*), *ABCG2* (*BCRP*), *ABCC1* (*MRP1*) в лёгких при фиброзно-кавернозном туберкулёзе (Ерохина и др., 2016). В перифокальной зоне при этом варианте туберкулёзного процесса наиболее высокий уровень экспрессии был характерен для генов *ABCB1* и *ABCG2*.

В туберкулёмах лёгких при активном воспалительном процессе увеличивается число лимфоцитов в прилежащей к капсуле перифокальной области (Холодок и др., 2014). По данным проекта GeneAtlas (<http://biogps.org>), для  $CD8^+$  Т-лимфоцитов характерен высокий уровень мРНК гена *ABCB1* (71,05 у.е.). Для  $CD4^+$  Т-лимфоцитов он составляет 37,7 у.е. Высокий уровень экспрессии *ABCB1* характерен также для НК-клеток (128,65 у.е.) и В-лимфоцитов (152,25 у.е.). По одним научным данным для моноцитов не свойственна экспрессия гена *ABCB1*, по другим – в моноцитах может регистрироваться его экспрессия на очень низком уровне.

Сравнительные значения экспрессии генов белков Р-gp, *MRP1*, *BCRP* приведены в табл. 2.4.

**Табл. 2.4.** Уровень экспрессии генов белков МЛУ в клетках человека (сделано на основе ресурса GeneAtlas (<http://biogps.org>))

Гены МЛУ	Клетки			
	Лёгкие/эпителий бронхов	$CD8^+$ (Т-лимфоциты)	$CD56^+$ (НК-клетки)	$CD14^+$ (моноциты)
<i>ABCB1</i>	9.4/7.7	71.05	128.65	7.65
<i>ABCC1</i>	8.85/23.05	11.95	11.6	15.65
<i>ABCG2</i>	208.55/10.30	6.3	8.6	7.15

Таким образом, увеличение в перифокальной зоне туберкулёмы присутствия CD8<sup>+</sup> Т-, В-лимфоцитов или NK-клеток может внести существенный вклад в увеличение значений медианы уровня экспрессии этого гена у пациентов с активными туберкулёмами. Другая гипотеза предполагает, что индукция экспрессии *ABCBI* в иммунных клетках и в клетках эпителия может происходить под влиянием *M. tuberculosis*, провоспалительных цитокинов, гипоксии.

Анализ разных зон туберкулём позволил установить, что для определения уровня экспрессии генов белков МЛЮ в операционном материале необходимо брать перифокальную зону как наиболее информативную в целях проведения молекулярно-генетического анализа. Исходя из данных ПЦР-анализа экспрессии генов *ABCBI*, *ABCC1*, *ABCG2* основных белков МЛЮ Р-гр, MRP1, BCRP, в качестве дальнейшего гена интереса был выбран ген *ABCBI* белка Р-гр. Экспрессия этого гена значительно выше в образцах туберкулём с высокой активностью специфического воспаления. Это поставило вопрос о ее взаимосвязи с факторами туберкулёзного воспаления, опосредующими высокую активность воспалительного процесса при туберкулёзе лёгких. Этот вопрос был изучен путём включения в анализ генов ключевых цитокинов, регулирующих воспаление при туберкулёзе лёгких, таких как *IL6*, *IL10*, *IFNG*, *TGFB1*, *TNF*, *IL1B*, *HIF1A*.

### 2.3 Взаимосвязь экспрессии генов Р-гр и цитокинов при разной активности туберкулёзного процесса

Сравнение экспрессии генов анализа выявило более высокий уровень экспрессии в группе туберкулём с высокой активностью (ВА) специфического воспаления для генов *ABCBI*, *IL1B*, *TNF*, *TGFB1*, *IL6*, по сравнению с группой умеренной активности (УА) (табл. 2.5). При этом для генов *ABCBI*, *IL1B*, *IL6* в группе ВА показан также и наибольший разброс диапазона данных, что свидетельствует о значительной гетерогенности туберкулём этой группы по данному параметру. Наиболее высокий разброс данных характерен для гена *IL6* – от минимальных значений, сравнимых с группой УА, до максимальных значений в группе ВА, которые возрастают более чем в 400 раз по сравнению с группой УА.

Табл. 2.5. Сравнительный анализ экспрессии генов в туберкулёмах с умеренной и высокой активностью

Гены \ Группы	Все образцы туберкулём	Туберкулёмы с умеренной активностью	Туберкулёмы с высокой активностью
<i>ABCBI</i>	63.5 (34.25–125.78)	25.00 (23.87 – 47.95)	102.65* (38.43 – 148.12)
<i>IL1B</i>	23.70 (13.7– 67.2)	13.48 (9.86–25.0)	41.98* (21.51–99.9)

Гены \ Группы	Все образцы туберкулём	Туберкулёмы с умеренной активностью	Туберкулёмы с высокой активностью
<i>IL6</i>	4.94 (1.7–54.7)	2.89 (1.79–6.19)	33.64** (1.6–265.65)
<i>IL10</i>	1.14 (0.67–2.2)	1.01 (0.74–1.73)	1.68 (0.67–4.24)
<i>IFNG</i>	3.84 (2.43–5.68)	3.16 (2.30–5.94)	3.96 (2.83–5.24)
<i>TNF</i>	10.02 (7.40–16.36)	8.03 (5.49–10.24)	11.83* (9.25–18.78)
<i>TGFB1</i>	78.40 (66.9–112.4)	69.20 (52.3–81.95)	86.48* (70.3–128.2)
<i>HIF1A</i>	144.48 (110.36–224.53)	138.02 (95.88–178.59)	174.47 (93.17–319.48)

Даны значения медианы и квартили 1–3 (25–75%).  $N(УА) = 15$ ;  $N(ВА) = 20$ , где  $N$  – число пациентов. Статистически значимые различия между группами туберкулём с разной активностью воспаления: \* –  $p < 0,01$ ; \*\* –  $p < 0,05$

Относительный уровень экспрессии генов *IL1B*, *TGFB1* и *TNF* был выше в лёгких больных группы АВ, чем в группе УВ (рис. 2.13).

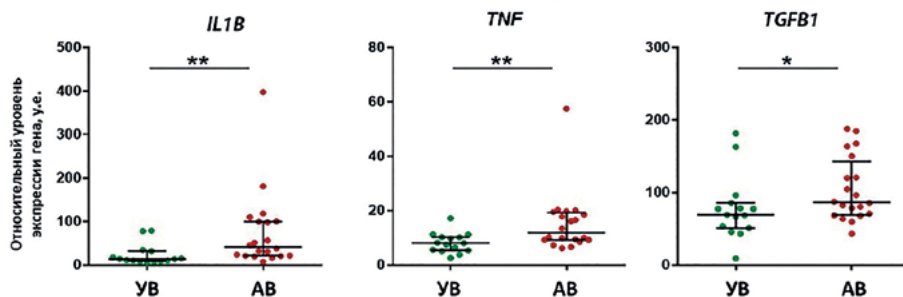


Рис. 2.13. Гистограммы, демонстрирующие статистически значимый высокий уровень экспрессии генов *IL6*, *IL1B*, *TGFB1* в туберкулёмах с высокой активностью специфического воспаления

Проведённый корреляционный анализ показал, что наибольшее значение коэффициентов положительной корреляции экспрессии выявлено между генами *IL6* и *HIF1A* ( $r = 0,90$ ); *IL6* и *IL10* ( $r = 0,83$ ) и генами *ABCB1* и *IL6* ( $r = 0,78$ ), (рис.2.14). Экспрессия *ABCB1* имеет также положительную умеренную корреляцию с *HIF1A* ( $r = 0,65$ ), *IL10* ( $r = 0,55$ ) и умеренно отрицательную с *IFNG* ( $r = -0,41$ ). Слабая корреляция характерна для гена *ABCB1* с генами *IL1B* и *TGFB1* ( $r = 0,29$  и  $r = 0,34$ ), (рис. 2.14).

Гены	<i>ABCB1</i>	<i>IL1B</i>	<i>IL6</i>	<i>IL10</i>	<i>IFNG</i>	<i>TNF</i>	<i>TGFB1</i>
<i>ABCB1</i>	1						
<i>IL1B</i>	0,29	1					
<i>IL6</i>	0,78	0,44	1				
<i>IL10</i>	0,55	0,56	0,83	1			
<i>IFNG</i>		0,33			1		
<i>TNF</i>					0,20	1	
<i>TGFB1</i>	0,34		0,33	0,27		0,27	1
<i>HIF1A</i>	0,65	0,46	0,90	0,69			

**Рис. 2.14.** Матрица значимых коэффициентов корреляции Спирмена ( $r$ ) между относительными уровнями экспрессии генов в лёгких больных с диагнозом «множественные туберкулёзы». Значение коэффициента  $r = 0,2-0,39$  – слабая,  $0,40-0,59$  – умеренная,  $0,6-0,79$  – сильная и  $0,8-1,0$  – очень сильная корреляция. Цвет ячеек указывает на достоверные различия:  $p < 0,01$  – зелёный,  $p < 0,001$  – тёмно-зелёный

Выявлено, что: (1) ген *ABCB1* белка P-gp демонстрирует наивысший уровень экспрессии в туберкулёмах с высокой активностью специфического воспаления; (2) экспрессия *ABCB1* в наибольшей степени коррелирует с экспрессией гена *IL6*; (3) группа туберкулём ВА характеризуется большей гетерогенностью значений экспрессии генов анализа, чем группа УА; (4) в группе ВА для гена *IL6* характерен выраженный разброс значений. Наибольшая взаимная корреляция характерна для группы генов *ABCB1*, *IL6*, *IL10*, *HIF1A*.

Для цитокина IL6 показано, что его повышенные уровни выявляются в плазме крови у больных туберкулёзом, у которых в лёгких регистрируются обширные зоны туберкулёзных очагов (Báez-Saldaña et al., 2013). В данной статье авторы не приводят клинические формы туберкулёза лёгких, а оперируют показателем «площади поражения лёгких» по данным рентгенологического исследования. Полученные ими результаты согласуются с нашими данными о том, что повышенные уровни экспрессии *IL6* характерны для высокой активности воспаления. Повышенный уровень IL6 у пациентов с туберкулёзом лёгких характеризует преобладание в зоне специфического очага макрофагов воспаления, рекрутируемых из моноцитов и продуцирующих IL6, а не резидентных макрофагов (гистиоцитов). Эти данные были получены методом транскриптомного анализа отдельных клеток (single cell RNA seq), выделенных из образцов бронхоальвеолярного лаважа (Bost et al., 2020). Следует отметить, что использование ингибиторов IL6 изучается для борьбы с «цитокиновым штормом» при туберкулёзе (Bonì et al., 2022).

Животные с дефицитом IL6 и инфицированные *M. tuberculosis* демонстрируют повышение бактериальной нагрузки, что указывает на важную роль IL6 в обеспечении защитной реакции организма к инфицированию *M. tuberculosis*

(Saunders et al., 2000). Заражение *M. tuberculosis* мышей с нокаутом генов белков IL1 $\alpha$  и IL1 $\beta$  или их рецептора IL1R1 приводит к увеличению бактериальной нагрузки, развитию обширных зон воспаления в лёгких и высокой смертности (Bohreg et al., 2018). Повышенные концентрации цитокинов IL6 и IL1 $\beta$  в лёгких также в значительной степени коррелируют с прогрессированием туберкулёза у генетически восприимчивых к нему мышей (Lyadova et al., 2010). В нашей работе обнаружена повышенная экспрессия генов *IL6* и *IL1B* в туберкулёмах с высокой активностью воспаления, что позволяет предположить, что у пациентов с туберкулёзом совместное действие IL6 и IL1 $\beta$  способствует развитию и поддержанию активного специфического воспаления.

Основными источниками IL1 $\beta$  после инфицирования *M. tuberculosis* являются клетки врождённого иммунитета: моноциты, макрофаги и дендритные клетки. Вклад нейтрофилов в выработку IL1, по-видимому, значительно ниже. Альвеолярные макрофаги также продуцируют IL1 $\beta$  (Cohen et al., 2018).

Терапевтическая блокада IL1 связана с риском развития туберкулёза, что подтверждает защитную роль IL1 при туберкулёзе (He et al., 2013). Однако было показано, что повышенные уровни IL1 $\beta$  связаны с преобладанием некротических очагов у пациентов с туберкулёзом. У пациентов с двусторонним или кавернозным поражением лёгких наблюдались достоверно более высокие уровни цитокинов TNF- $\alpha$  и IL1 $\beta$  в плазме крови по сравнению с больными с односторонними или очаговыми поражениями (Tsaο et al., 2000, Kumar et al., 2019). Это согласуется с обнаруженной нами повышенной экспрессией генов *IL1B* и *TNF* при высокой активности специфического воспаления.

Секреция IL1 $\beta$  может модулироваться также и самим возбудителем. Обнаружено, что белок *M. tuberculosis*, кодируемый геном *zmp1*, предотвращает выработку IL1 $\beta$  в макрофагах инфицированных мышей. Мыши, инфицированные нокаутными по *zmp1* микобактериями, демонстрируют более высокие уровни выработки IL1 $\beta$ , более низкую бактериальную нагрузку на лёгкие и более быстрое прекращение бактериовыделения по сравнению с инфицированием обычными *M. tuberculosis*. У нечеловекообразных приматов применение ингибитора IL1 $\beta$  анакирна через 2 недели после их заражения *M. tuberculosis* в качестве дополнения к лечению линезолидом уменьшило интенсивность воспаления и повреждений тканей лёгких (Winchell et al., 2020).

IL10 вырабатывают Th2, Th17, В-клетки, нейтрофилы, макрофаги и дендритные клетки. Регуляторные Т-клетки (Treg) в контексте инфекционных заболеваний также служат источником IL10 (Saraiva et al., 2010). IL10 подавляет способность макрофагов и дендритных клеток активировать Т-хелперы 1-го типа и приводит к ослаблению иммунного ответа и развитию хронического воспаления, что характерно для туберкулёзной инфекции (Mooge et al., 2001).

Выработка IL10 макрофагами после фагоцитоза ими микобактерий происходит как ответ организма-хозяина на инфицирование или может быть индуцирована самим возбудителем, так как IL10 блокирует образование фаголизозом.

сом, что способствует внутриклеточному выживанию возбудителя (Master et al., 2008). У пациентов с туберкулёзом лёгких уровень IL10 повышен в клетках бронхоальвеолярного лаважа, в мокроте, плазме и сыворотке крови (Almeida et al., 2009, Verbon et al., 1999, Bonecini-Almeida et al., 2004, Huard et al., 2003).

Опираясь на сильные противовоспалительные свойства *IL10*, стоило бы ожидать повышения его экспрессии в группе с умеренной активностью воспаления. Однако в нашей работе уровень экспрессии гена *IL10* статистически значимо не отличался в группах с высокой и умеренной активностью воспаления. Согласно данным, полученным на больных COVID-19, повышение соотношения IL6/IL10 в сторону первого говорило о более негативном прогнозе и высокой вероятности летального исхода (Azaiz et al., 2022). Среди полученных нами результатов необходимо отметить высокую корреляцию между экспрессией *IL6* и *IL10*, что также может свидетельствовать в пользу того, что при специфическом туберкулёзном воспалении важно учитывать соотношение значений экспрессии их генов или цитокинов в организме пациента.

На сегодняшний день данных о роли белка P-гр (ген *ABCB1*) при туберкулёзном воспалении исключительно мало. Показано, что экспрессия гена *ABCB1* в лёгких пациентов с туберкулёзом по сравнению с генами других МЛТУ белков находится на более высоком уровне (Pavlova et al., 2023). Экспрессия *ABCB1* возрастает в макрофагах человека при инфицировании штаммами *M. tuberculosis* (Wu et al., 2019), действии провоспалительных цитокинов IL6, IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (Liu et al., 2015) или противотуберкулёзного препарата рифампицина (Pavlova et al., 2022).

В экспериментах *in vitro* с использованием лимфоцитов периферической крови показано, что в присутствии ингибитора P-гр верапамила секреция ими цитокинов прекращается (Drach et al., 1996). Эти данные напрямую указывают на способность P-гр транспортировать цитокины и на его роль как регулятора и модулятора воспалительной реакции.

Проведённый на здоровых мышах линии C57BL/6 эксперимент продемонстрировал, что экзогенное введение мышинного IL6 подавляет экспрессию ABC-переносчиков, в том числе *ABCB1*, в клетках печени (Abualsunun et al., 2019). В материале утверждается, что данный эффект может происходить посредством активации NF- $\kappa$ B с помощью STAT3. Однако обнаруженная в нашей работе корреляция между экспрессией *IL6* и *ABCB1* является положительной, что может говорить об изменениях в иммунной регуляции в случае специфического туберкулёзного воспаления.

Методом секвенирования РНК в образцах аденокарциномы молочной железы было обнаружено, что экспрессия мРНК *ABCB1* коррелирует с метастазированием в лимфатические узлы и низкой выживаемостью пациентов с раком молочной железы. Высокая экспрессия *ABCB1* коррелировала с повышенной экспрессией *IL6*, *CSF1*, *CSF3* (Chen et al., 2023). Полученные авторами данные о корреляции экспрессии *IL6* и *ABCB1* согласуются с нашими и говорят в пользу присутствия влияния P-гр на экспрессию цитокинов при воспалении, в том числе продуктивном, к которому можно отнести туберкулёзное воспаление и патологии молочной железы.

В исследованиях, посвящённых роли *ABCB1* в развитии нейродегенеративных заболеваний, показано, что блокирование Р-гр предотвращает специфическую пролиферацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток и сопровождается снижением секреции провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  (Kooij et al., 2009), что также указывает на роль Р-гр в воспалении.

Гипоксия является характерной особенностью воспаления в лёгких пациентов с туберкулёзом (Belton et al., 2016). Работы последних лет показали, что роль фактора гипоксии HIF1 $\alpha$  при туберкулёзе неоднозначна: он способствует антимикробной активности макрофагов человека против *M. tuberculosis*, но также может нарушать дифференцировку CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, способствуя прогрессированию воспаления (Liu et al., 2022; Suresh et al., 2023). Выявленная высокая корреляция между генами *ABCB1* и *HIF1A* указывает на наличие тесной взаимосвязи в регуляции экспрессии этих двух генов. Основная роль в индукции экспрессии гена *ABCB1* в гипоксических условиях принадлежит транскрипционным факторам HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) и Sp1 (specificity protein 1), которые имеют сайты связывания на промоторе гена *ABCB1*, стимулируют экспрессию гена *ABCB1* (Якушева и др., 2016). В свою очередь, ингибирование HIF1 $\alpha$  приводит к снижению уровня экспрессии гена *ABCB1* и уровня Р-гр в целом (Chen et al., 2016 КП).

Пациенты, у которых был получен операционный материал туберкулём для анализа экспрессии генов белков МЛУ, проходили химиотерапию в течение нескольких месяцев, в комбинацию препаратов которой был включён и рифампицин, который является индуктором экспрессии гена *ABCB1* за счёт связывания с транскрипционным фактором PXR (прегнановый рецептор), его активации и связывания с промоторной областью гена *ABCB1* (Magnarin et al., 2004).

**Таким образом, выявлено, что наибольшая взаимная корреляция характерна для группы генов *ABCB1*, *IL6*, *IL10*, *HIF1A*. При этом в туберкулёмах с высокой активностью специфического воспаления ген *ABCB1* белка Р-гр демонстрирует наивысший уровень экспрессии и в наибольшей степени коррелирует с экспрессией гена *IL6*. Полученные результаты указывают на группу генов *ABCB1*, *IL6* и *IL10* как наиболее перспективных для оценки активности специфического воспаления и его тенденции к прогрессированию или заживлению. Мы предполагаем, что в группе ВА высокие уровни экспрессии гена *IL6* могут свидетельствовать о прогрессировании воспаления, а низкие – о снижении активности воспаления и тенденции к заживлению, что может быть биомаркером активности туберкулёзного воспаления в рамках разработки подходов для персонализированной медицины.**

## 2.4 Заключение к главе 2

Воспаление – сложно организованный многокомпонентный процесс. Некоторые из факторов воспаления при туберкулёзе – возбудитель, клетки воспаления, продуцируемые ими цитокины, гипоксия, – влияют на экспрессию белков МЛУ.

При этом и сами белки МЛУ оказывают регуляторное воздействие на развитие и выраженность воспалительного ответа. Такие данные важны не только для изучения патогенеза туберкулёза, но и являются актуальными для оптимизации лечения туберкулёза лёгких. Проведение биомедицинских исследований в данной области необходимо для создания теоретической и методической базы в целях разработки практических рекомендаций для использования в клинике.

В нашем исследовании мы использовали резекционные образцы лёгких, полученных исключительно от пациентов с диагнозом «туберкулёма» – к настоящему времени их доля среди форм туберкулёза лёгких составляет около 20% и продолжает увеличиваться. Ориентация на эту клиническую форму позволила выделить группы с высокой и умеренной активностью специфического воспаления, исходя из данных морфологического анализа гистологических срезов. Дополнительное использование технологии комбинированного иммунохимического маркирования *M. tuberculosis* с последующим 3D-анализом при помощи лазерной конфокальной микроскопии подтвердило присутствие возбудителя в зоне некроза и перифокальной области туберкулём.

Генетический анализ разных зон туберкулём позволил установить, что для определения уровня экспрессии генов белков МЛУ в операционном материале необходимо брать перифокальную зону, как наиболее информативную, и это легло в основу создания методологии изучения белков МЛУ при туберкулёзном воспалении.

Сравнительный анализ экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2* основных белков МЛУ P-gr, MRP1, BCRP выявил, что экспрессия гена *ABCB1* белка P-gr по сравнению с экспрессией других генов анализа статистически значимо выше в образцах туберкулём с высокой активностью специфического воспаления. Обнаружена положительная корреляция между экспрессией генов ключевых про/противовоспалительных цитокинов и *ABCB1*.

Зависимость экспрессии от активности воспаления и корреляция с ведущими цитокинами туберкулёзного воспаления указывает на важную роль белка P-gr в патогенезе туберкулёза лёгких и регуляции активности воспаления.

## ГЛАВА 3

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СИГНАТУРЫ, СВЯЗАННЫЕ С БЕЛКОМ-ТРАНСПОРТЁРОМ P-GR

Группа дифференциально-экспрессируемых генов, характеризующих клинический фенотип, называется молекулярно-генетической подписью (сигнатурой). В сигнатуры могут входить наборы генов, транскриптов мРНК, белков, которые используются в качестве диагностических или прогностических маркеров определенного клинического фенотипа (рис. 3.1).

#### Применение молекулярно-генетических сигнатур



Рис. 3.1. Схема, иллюстрирующая определение и применение молекулярно-генетических сигнатур

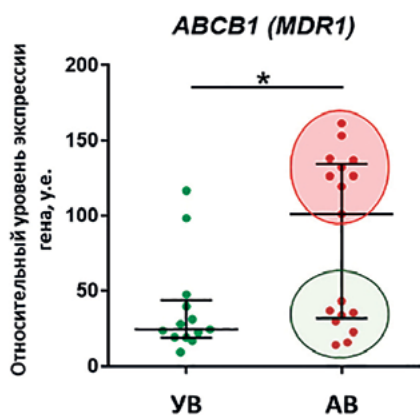
Поиск генетических сигнатур, характеризующих разные аспекты развития туберкулёзного воспаления, идет с 2012 года. Как правило, в исследованиях используются образцы цельной крови, полученной от пациентов с туберкулёзом лёгких и здоровых добровольцев. В образцах проводится анализ транскриптомов на микрочипах. Статистический мета-анализ пяти баз данных таких транскриптомов позволил включить ген *ABCBI* белка P-gr в перечень 20 генов (из 2038), экспрессия которых наиболее значимо ( $p < 0,001$ ) отличается при активном туберкулёзном процессе в сравнении с латентным туберкулёзом и группой здоровых добровольцев. Большинство из этих генов связаны с состоянием иммунной системы, включая фагоцитоз (Ponnusamy and Arumugam, 2022). Эти данные подчёркивают важность роли белка P-gr как регулятора воспаления.

#### 3.1 Расширенный молекулярно-генетический анализ как характеристика воспаления при туберкулёме лёгкого

В главе 2 на примере двух выборок продемонстрировано, что экспрессия гена *ABCBI* белка P-gr характеризуется высокими уровнями экспрессии в об-

разцах туберкулём с выраженной активностью специфического воспаления. Также была выявлена связь между экспрессиями гена *ABCB1* и генами ключевых цитокинов воспаления, что указывает на важную регуляторную роль белка P-гр в патогенезе туберкулёза лёгких и воспаления.

По результатам генетического анализа мы обратили внимание на гетерогенность экспрессии гена *ABCB1* в группе туберкулём с высокой активностью воспаления (АВ): были идентифицированы 2 подгруппы с разными уровнями экспрессии *ABCB1*. Подгруппа с высокой экспрессией *ABCB1* (фигура с красной заливкой), значения относительного уровня экспрессии в которой значительно превышали таковые в группе умеренной активности (УВ). И подгруппа с низкой экспрессией (фигура с зелёной заливкой), в которой значения относительного уровня экспрессии гена совпали со значениями в группе УВ (рис. 3.2).



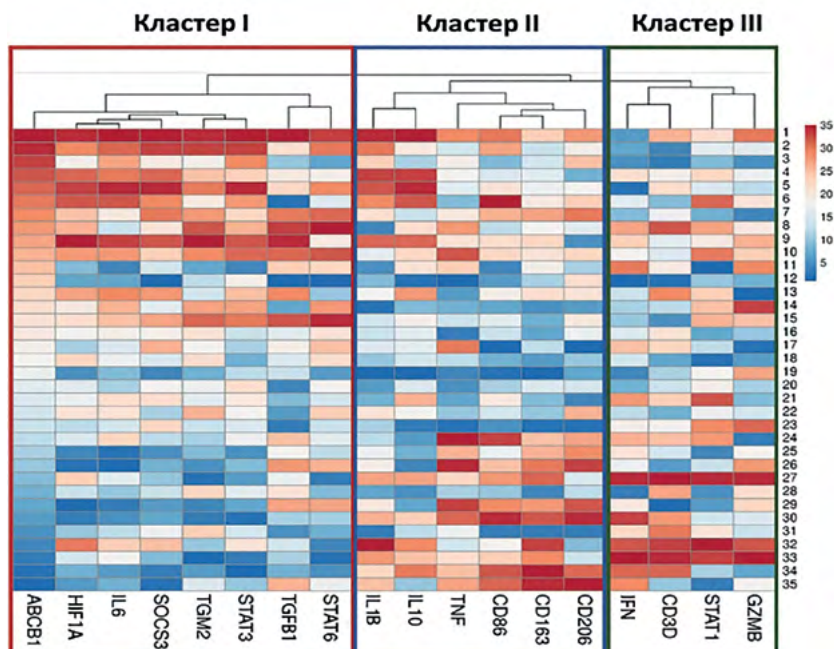
**Рис. 3.2.** Относительный уровень экспрессии гена *ABCB1*: в группе с высокой активностью воспаления выделяются две подгруппы: с высокой экспрессией (фигура с красной заливкой) и низкой экспрессией (фигура с зелёной заливкой) гена. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25 и 75%). Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали как  $2^{-\Delta Ct} \cdot 10^3$  и выражали в условных единицах (у.е.). Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни. Достоверные различия между группами: \* –  $p < 0,05$

Это позволило предположить, что экспрессия *ABCB1* при высокой активности воспаления может зависеть от различных факторов. Для их оценки был проведен расширенный молекулярно-генетический и иерархический кластерный анализ между экспрессией гена *ABCB1* и тремя группами генов, регулирующими туберкулёзное воспаление: (i) транскрипционными факторами STAT1-3-6, SOCS3 и HIF1A; (ii) ключевыми цитокинами при туберкулёзе IL6, IL10, IFN $\gamma$ , TGF $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ ; (iii) маркерами провоспалительных (M1) и противовоспалительных (M2) макрофагов, CD86, CD206, CD163, TGM2, а также маркерами Т-лимфоцитов CD3D, GZMB. **Выбранный подход позволил выделить две молекулярно-генетические сигнатуры, ассоциированные с геном *ABCB1* и характеризующие высокую активность туберкулёзного воспаления.**

### 3.2 Молекулярно-генетические сигнатуры, связанные с высокой и низкой экспрессией гена P-гр

Одним из статистических подходов, позволяющих вычлнить такие сигнатуры из набора данных экспрессии разных генов, является иерархический кластерный анализ с применением трехцветной тепловой карты, где синий цвет обозначает низкий, белый – средний, а красный – высокий от-

носительный уровень экспрессии генов. Иерархический кластерный анализ позволяет сгруппировать гены, экспрессия которых взаимосвязана и имеет общие регуляторные пути или механизмы. В данном исследовании тепловая карта кластерного анализа создавалась с использованием веб-инструмента ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) на основе значений относительной экспрессии генов с их ранговым преобразованием. Применение вышеназванного подхода выявило, что гены интереса формируют три больших кластера, представленных на рис. 3.3.



**Рис. 3.3.** Тепловая карта коэкспрессии генов.  
Экспрессия гена *ABCB1* ранжирована в порядке убывания

Кластер I, включающий ген *ABCB1*, содержит преимущественно гены факторов транскрипции, такие как *STAT3*, *SOCS3*, *HIF1A*, ген цитокина *IL6*, а также *TGM2*. Кластер II включает в себя преимущественно гены макрофагальных маркеров *CD86*, *CD206* и *CD163*, которые наиболее тесно коррелируют с экспрессией гена цитокина *TNF*. Кластер III представлен в основном генами маркеров Т-лимфоцитов. Данные корреляционного анализа приведены на рис. 3.4.

<i>r</i>	<i>ABCB1</i>	<i>HIF1A</i>	<i>IL1B</i>	<i>IL6</i>	<i>IL10</i>	<i>IFN</i>	<i>TNF</i>	<i>TGFB1</i>	<i>CD86</i>	<i>CD163</i>	<i>CD206</i>	<i>TGM2</i>	<i>STAT1</i>	<i>STAT3</i>	<i>STAT6</i>
<i>ABCB1</i>															
<i>HIF1A</i>	0.65														
<i>IL1B</i>		0.46													
<i>IL6</i>	0.65	0.90	0.46												
<i>IL10</i>		0.69	0.63	0.59											
<i>IFN</i>	-0.54														
<i>TNF</i>						0.49									
<i>TGFB1</i>							0.56								
<i>CD86</i>			0.65		0.41		0.49								
<i>CD163</i>			0.62			0.55	0.67	0.34	0.76						
<i>CD206</i>							0.47		0.68	0.62					
<i>TGM2</i>	0.68	0.70		0.67		-0.48		0.34		-0.41					
<i>STAT1</i>		0.46		0.49	0.40										
<i>STAT3</i>	0.76	0.78		0.83		-0.55						0.82			
<i>STAT6</i>	0.52							0.60				0.65		0.47	
<i>SOCS3</i>	0.71	0.84		0.82	0.57			0.34				0.72		0.79	0.49
<i>CD3D</i>					0.46	0.55							0.40		
<i>GZMB</i>													0.37		

**Рис. 3.4.** Матрица значимых коэффициентов корреляции Спирмена ( $r$ ) между относительными уровнями экспрессии генов в лёгких больных с диагнозом «множественные туберкулёзы». Цвет клеток указывает на достоверные различия:  $p < 0,05$  – жёлтый,  $p < 0,01$  – зелёный,  $p < 0,001$  – темно-зелёный. Значение коэффициента  $r = 0,2-0,39$  – слабая (чёрный курсив),  $0,40-0,59$  – умеренная (чёрный жирный),  $0,6-0,79$  (белый жирный) – сильная и  $0,8-1,0$  (жёлтый жирный) – очень сильная корреляция

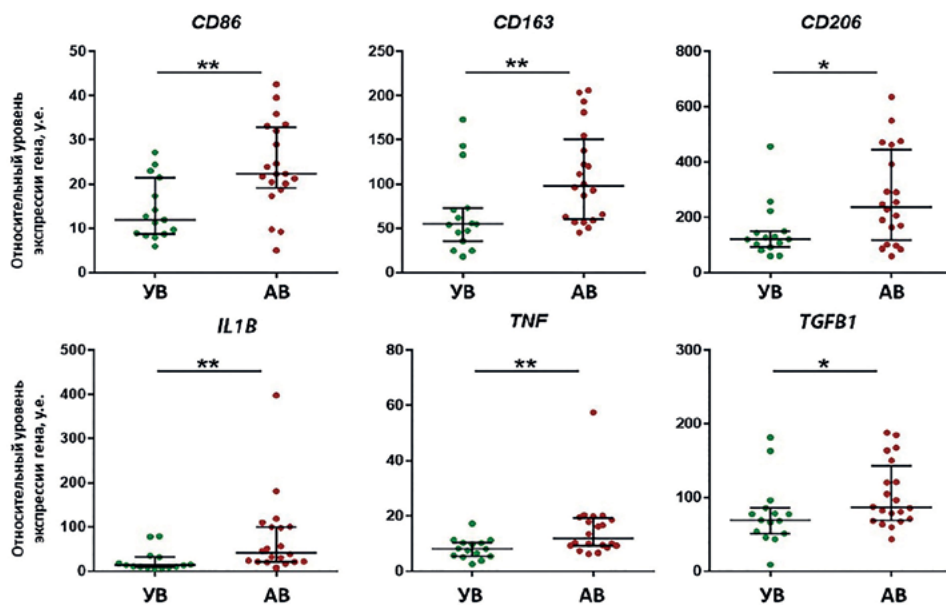
В **Кластере I** экспрессия гена *IL6* имеет очень сильную корреляцию с *HIF1A* ( $r = 0,91$ ), *STAT3* ( $r = 0,83$ ) и *SOCS3* ( $r = 0,82$ ) и умеренную с *IL10* ( $r = 0,59$ ). В свою очередь экспрессия *STAT3* сильно коррелирует с экспрессией *SOCS3* ( $r = 0,79$ ). Экспрессия гена *TGM2* имеет очень сильную корреляцию со *STAT3* ( $r = 0,82$ ) и сильную корреляцию с *SOCS3* ( $r = 0,72$ ). *HIF1A*, помимо перечисленных выше генов, сильно коррелирует с *STAT3* ( $r = 0,78$ ) и *IL10* ( $r = 0,69$ ). Также в этом кластере выделяется отдельный подкластер *STAT6* и *TGFB1*, экспрессия генов которых наиболее тесно коррелирует друг с другом ( $r = 0,60$ ). В то же время, *STAT6* имел сильную корреляцию с *TGM2* ( $r = 0,65$ ) и умеренную корреляцию с *ABCB1* ( $r = 0,52$ ) и *STAT3* ( $r = 0,47$ ).

В **Кластере II** экспрессия гена *CD163*, который является преимущественно маркером M2 макрофагов, в большей степени коррелирует с экспрессией гена белка-маркера M1 макрофагов *CD86* ( $r = 0,77$ ), чем с экспрессией гена другого белка-маркера M2 макрофагов – *CD206* ( $r = 0,62$ ). *CD163* также имеет сильную корреляцию с *TNF* ( $r = 0,67$ ) и *IL1B* ( $r = 0,62$ ). Но не было обнаружено значимой корреляции между экспрессией *IL1B* и *TNF*. В этом кластере гены *IL1B* и *IL10* образуют отдельный подкластер, и их экспрессия сильно коррелирует друг с другом ( $r = 0,63$ ). Несмотря на то, что *IL10*, согласно данным кластерного анализа, включен в Кластер II, экспрессия *IL10* имеет сильную или умеренную корреляцию с генами из Кластера I: *HIF1A*, *SOCS3* и *IL6*.

**Кластер III представлен в основном генами маркеров Т-лимфоцитов.** Экспрессия гена-маркера цитотоксических лимфоцитов *GZMB* объединена в один подкластер со *STAT1* несмотря на то, что между ними выявлена слабая корреляция ( $r = 0,37$ ), а *CD3D* и *IFN* умеренно коррелировали друг с другом ( $r = 0,55$ ). Следует отметить, что экспрессия гена *IFN*, входящего

в этот кластер, кроме гена *ABCB1*, также имеет умеренные отрицательные корреляции со *STAT3* ( $r = -0,55$ ) и *TGM2* ( $r = -0,49$ ). Кластеры II и III иерархически связаны друг с другом, но не с Кластером I.

Относительный уровень экспрессии генов цитокинов, таких как *IL1B*, *TGFB1* и *TNF*, и маркеров макрофагов *CD86*, *CD163* и *CD206* был выше в легких больных туберкулёзом из группы АВ, чем в группе УВ (рис. 3.5). Статистически значимых различий в уровнях экспрессии остальных генов интереса обнаружено не было.

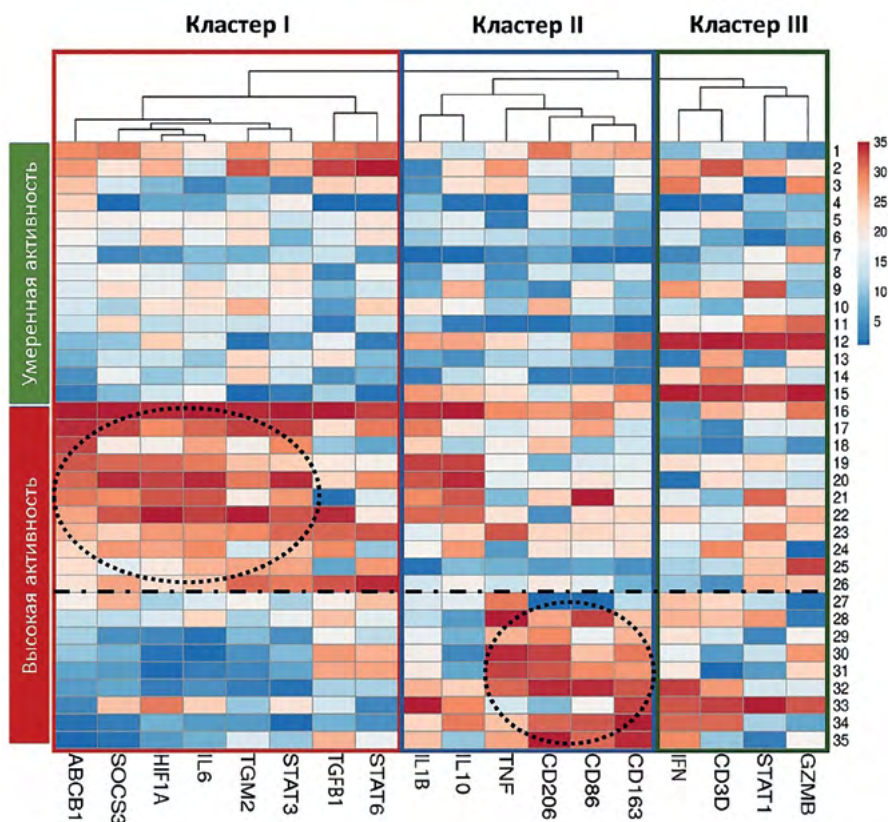


**Рис. 3.5.** Статистически значимые различия в уровнях экспрессии генов в лёгких больных с туберкулёзами между образцами с умеренной (УВ) и высокой активностью (АВ) воспаления. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25 и 75%). Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали как  $2^{-\Delta Ct} \cdot 10^4$  и выражали в условных единицах (у.е.).

Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна – Уитни; \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$

**Таким образом, для высокой активности воспаления в лёгких пациентов с туберкулёзом в целом характерна высокая экспрессия генов маркеров макрофагов *CD86*, *CD163* и *CD206* и таких цитокинов, как *IL1B*, *TNF* и *TGFB1*.**

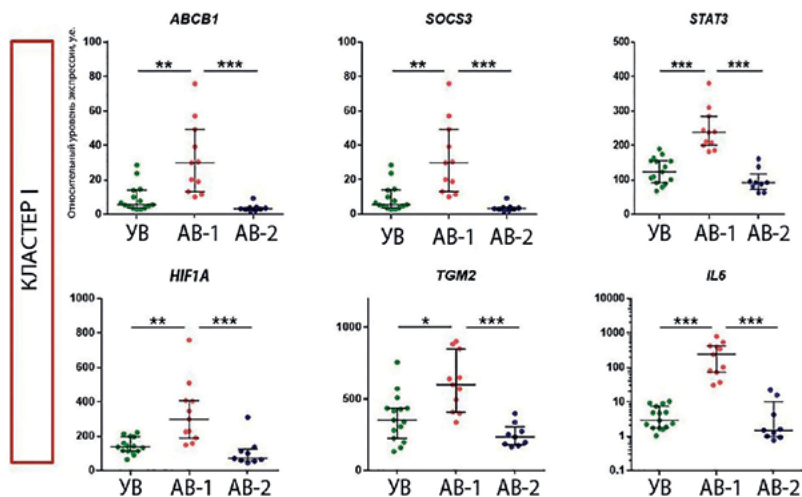
Для того чтобы определить гены, характеризующие отличия между двумя подгруппами, выделенными на основе анализа экспрессии гена *ABCB1* при высокой активности специфического воспаления, был проведён кластерный анализ для группы АВ в отдельности, исходя из ранжирования экспрессии гена *ABCB1*. Благодаря этому подходу были выявлены гены, высокий уровень экспрессии которых ассоциирован с высоким или низким уровнем экспрессии *ABCB1* (рис. 3.6).



**Рис. 3.6.** Иерархический кластерный анализ и тепловая карта, демонстрирующая неоднородность генетической сигнатуры в группе туберкулём с высокой активностью воспаления. Относительный уровень экспрессии гена *ABCB1* ранжирован в порядке убывания в каждой группе с умеренной и высокой активностью воспаления

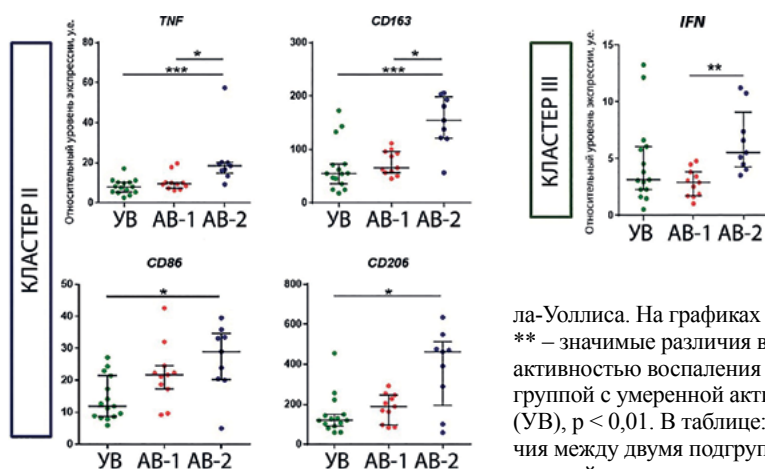
На основании профиля экспрессии генов, прежде всего по уровню экспрессии *ABCB1*, группа образцов с высокой активностью воспаления была разделена на две подгруппы: в первую подгруппу АВ-1 вошли образцы с номерами строк 16–26 ( $n = 11$ ), во вторую – АВ-2 – образцы с номерами строк 27–35 ( $n = 9$ ).

Сравнительный анализ экспрессии генов в Кластере I выявил, что медиана относительного уровня экспрессии генов *ABCB1*, *IL6*, *SOCS3*, *STAT3*, *HIF1A* и *TGM2* в подгруппе АВ-1 выше, чем в подгруппе АВ-2 и в группе УВ. При этом экспрессия этих генов в подгруппе АВ-2 статистически значимо не отличается от группы УВ (рис. 3.7).



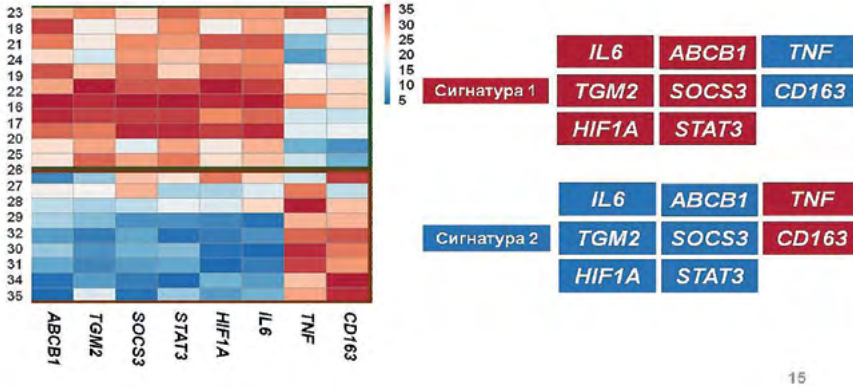
**Рис. 3.7.** Уровни экспрессии генов в Кластере I. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25 и 75%). Статистический анализ проводили с использованием критерия Краскела – Уоллиса. На графиках значимые различия: \*\* – значимые различия в группе с высокой активностью воспаления (AB) по сравнению с группой с умеренной активностью воспаления (УВ),  $p < 0,01$ . В таблице: # – значимые различия между двумя подгруппами AB-1 и AB-2 с высокой активностью воспаления,  $p < 0,05$

В Кластере II экспрессия генов *TNF* и *CD163* в подгруппе AB-2 выше, чем в подгруппе AB-1, а медиана экспрессии этих генов в подгруппе AB-2 достоверно выше, чем в группе УВ. Экспрессия генов *CD86* и *CD206* в подгруппе AB-2 достоверно превышает значения в группе УВ. Однако статистически значимых различий в экспрессии этих генов между подгруппами AB-1 и AB-2 обнаружено не было. В Кластере III различия обнаружены только по уровню экспрессии гена *IFN* между подгруппами AB-1 и AB-2. В то же время, разница между этими двумя подгруппами с группой УВ не выявлена (рис. 3.8).



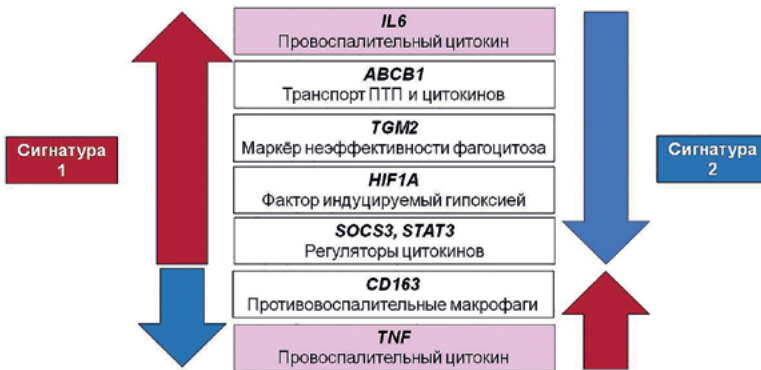
**Рис. 3.8.** Уровни экспрессии генов в Кластерах II и III. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25 и 75%). Статистический анализ проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса. На графиках значимые различия: \*\* – значимые различия в группе с высокой активностью воспаления (AB) по сравнению с группой с умеренной активностью воспаления (УВ),  $p < 0,01$ . В таблице: # – значимые различия между двумя подгруппами AB-1 и AB-2 с высокой активностью воспаления,  $p < 0,05$

Таким образом, различия в уровне экспрессии генов между двумя подгруппами с высокой активностью воспаления и их сравнение с группой с умеренной активностью воспаления позволили выявить две разные генетические сигнатуры, связанные с высокой активностью воспаления (рис. 3.9).



**Рис. 3.9.** Две молекулярно-генетические сигнатуры, ассоциированные с высокой или низкой экспрессией гена *ABCB1* белка P-гр при высокой активности туберкулёзного воспаления у пациентов с туберкулёзом лёгких

Первая сигнатура генов включает высокие экспрессии генов *ABCB1*, *HIF1A*, *SOCS3*, *STAT3*, *IL6* и *TGM2*, а вторая – *CD163* и *TNF*. При высокой активности воспаления, как показывает анализ, в лёгких пациентов с туберкулёзом преобладает либо одна, либо другая сигнатура. Возможная роль каждого из маркёров приведена на рис. 3.10.



**Рис. 3.10.** Молекулярная характеристика туберкулёз с высокой активностью воспаления

В нашем исследовании мы использовали резекционные образцы туберкулёз лёгких. Ориентация только на эту клиническую форму позволила стандартизировать материал для анализа и исключить влияние факторов, связанных с другими формами туберкулёза. Такой подход показал свою эффективность: позволил выявить референсные гены анализа в туберкулёзах с умеренной и высокой активностью специфического воспаления, что было сделано впервые (Pavlova et al., 2023).

Результаты, полученные в этом исследовании, демонстрируют тот факт, что при схожей морфологической картине туберкулёзного воспаления имеются два разных клинических молекулярно-генетических фенотипа. **Первая сигнатура связана с пролонгированной острой фазой воспаления, гипоксическим повреждением тканей, сниженным фагоцитозом *M. tuberculosis* и недостаточным проявлением противовоспалительных процессов. Вторая сигнатура, наоборот, демонстрирует снижение гипоксии и поляризацию макрофагов по противовоспалительному фенотипу, что может свидетельствовать о преобладании противовоспалительных процессов и динамике заживления. Но высокие уровни экспрессии генов *TNF* и *CD163*, как правило, связаны с более тяжёлым течением заболевания у пациентов с туберкулёзом лёгких. При этом высокий и низкий уровни экспрессии гена белка P-гр являются важной характеристикой, связанной с активностью специфического воспаления и оценкой возможности его снижения.** Использование материала перифокальной области туберкулём позволяет получить расширенный молекулярно-генетический ответ о процессах активации или заживления и эффективности проводимого лечения пациента. В дальнейшем данный раздел требует расширенного анализа, включающего в себя сопоставление сигнатур с данными молекулярно-генетической характеристики мононуклеаров периферической крови, уровнем белка P-гр и режимами химиотерапии. Это позволит сопоставить данные об уровнях экспрессии как генов анализа, так и самого P-гр с эффективностью противотуберкулёзных препаратов. Предполагается, что функциональная активность P-гр и полиморфизмы в гене *ABCB1* могут снижать накопление противотуберкулёзных препаратов в очагах туберкулёзного воспаления (Rodríguez-Castillo et al., 2015, Pontual et al., 2017) и приводить к селекции лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* (Te Brake et al., 2018).

В нашем исследовании мы анализировали экспрессию генов в перифокальной области: ткани лёгких, окружающие туберкулёмы, сенсibilизированы и высокочувствительны к туберкулину (Hunter, 2020), и их анализ даёт дополнительную информацию о туберкулёзном воспалении, отражает системный характер воспаления и параметры иммунной системы. Как было продемонстрировано в главе 2, для высокой активности специфического воспаления характерна инфильтрация перифокальной области клетками воспаления, которые, как мы предполагаем, могут состоять и из иммунных клеток с высокой экспрессией *ABCB1*: экспрессия *ABCB1* характерна для многих типов иммунных клеток (Bossennec et al., 2018).

CD4<sup>+</sup> Т-клетки являются ключевыми клетками в контроле инфицирования *M. tuberculosis*, поскольку они опосредуют защиту от патогена, регулируя иммунный ответ. В CD4<sup>+</sup> Т-клетках P-гр является важным компонентом их жизнеспособности и участвует в экспорте цитокинов (Drach et al., 1996; Gollapud and Gupta, 2001). Повышенная экспрессия и функциональная активность P-гр характерны для CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти у пациентов с латентным туберкулёзом (Burel et al., 2018). Клетки Th1 и Th17 являются эффекторами CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Они опосредуют продукцию хемокинов и цитокинов в резидентных иммунных клетках, а также способствуют привлечению нейтрофилов в зону воспаления, что может сопровождаться значительным повреждением тканей (Lyadova and Pantelev, 2015).

Индукторами экспрессии гена *ABCB1* выступают различные цитокины туберкулёзного воспаления: IL1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  и TGF $\beta$  (Ho and Piquette-Miller, 2006; Liptrott et al., 2009). Факторы транскрипции NF-kB и STAT3 являются ключевыми регуляторами воспаления при туберкулёзе, так как напрямую связываются с промоторной областью гена *ABCB1* и индуцируют его экспрессию (Zhang et al., 2011; Chen et al., 2014; Liu et al., 2015). Примечательно, что HIF1 $\alpha$ , транскрипционный фактор, участвующий в реакциях на гипоксию, также имеет сайт связывания в промоторной области гена *ABCB1* (Comerford et al., 2002).

Повышенная экспрессия P-gp обнаружена в CD8<sup>+</sup> эффекторных клетках и клетках памяти. Предполагается, что высокая экспрессия P-gp в CD8<sup>+</sup> Т-клетках способствует их цитотоксической функции (Chen et al., 2020). Также высокая экспрессия P-gp является особенностью инвариантных Т-клеток, ассоциированных со слизистыми оболочками (MAIT), и необходима для их защиты от токсинов и ксенобиотиков (Fergusson et al., 2018) в иммунитете против *M. tuberculosis* (Gold et al., 2010).

Мы не обнаружили корреляции между экспрессией *ABCB1* и генами маркеров лимфоцитов или макрофагов и полагаем, что необходим дальнейший анализ с использованием мультиплексной транскриптомики (например, секвенирование РНК отдельных клеток, single-cell transcriptomic) или протеомики, чтобы идентифицировать специфические типы иммунных клеток, связанных с высокой экспрессией гена *ABCB1*.

Обнаружено, что в целом уровни экспрессии генов макрофагальных маркеров CD86, CD163 и CD206 выше в группе с высокой активностью воспаления по сравнению с группой с умеренной активностью воспаления. Это согласуется с данными, что высокие уровни белков CD206 и CD163 в лёгких коррелируют с их уровнем в сыворотке крови и характерны для пациентов с активным туберкулёзом (Suzuki et al., 2017, 2018; Liu et al., 2019).

Наибольшую экспрессию гена *CD163* мы выявили в группе туберкулём, характеризующихся низкой экспрессией гена *ABCB1* и высокой экспрессией гена *TNF*. По нашим данным, экспрессия гена *TNF* продемонстрировала сильную корреляцию с экспрессией гена *CD163*. Более того, другие гены маркеров макрофагов (CD86 и CD206) были сгруппированы в один кластер генов, также коэкспрессирующийся с *TNF*. В группе с высокой активностью воспаления уровни экспрессии генов *TNF*, *IL1B* и *TGFB1* в целом были выше по сравнению с группой с умеренной активностью воспаления. Повышенные уровни TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  и TGF $\beta$  в сыворотке крови характерны для более тяжёлого течения туберкулёза и более выраженного поражения лёгких, согласно данным компьютерной томографии (Chowdhury et al., 2014; Fiorenza et al., 2005). У пациентов с туберкулёзом с двусторонним или кавернозным поражением лёгких наблюдались достоверно более высокие уровни TNF- $\alpha$  и IL1 $\beta$  по сравнению с больными с односторонними или очаговыми поражениями (Kumar et al., 2019; Beig et al., 2023).

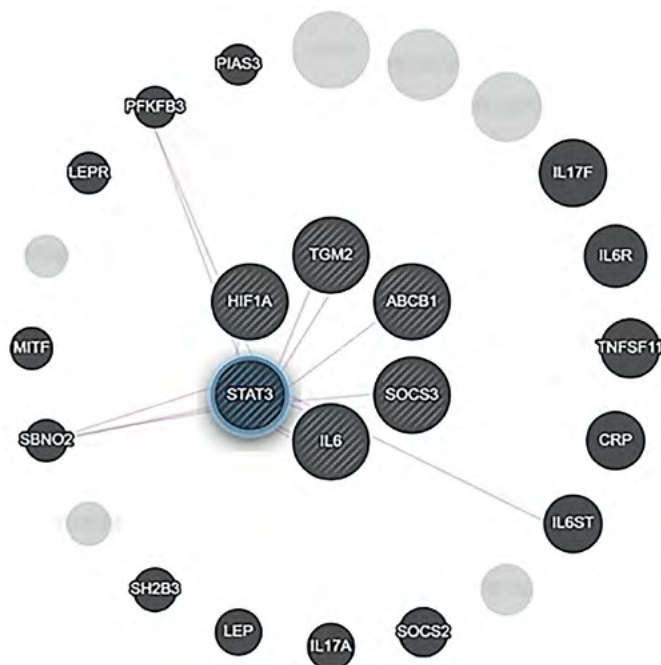
Хотя *TGFB1* умеренно коррелировал с экспрессией *TNF* ( $r = 0,56$ ), мы выявили сильную корреляцию между экспрессией *TGFB1* и *STAT6* ( $r = 0,60$ ), при этом *STAT6* умеренно коррелировал со *STAT3* ( $r = 0,47$ ). Считается, что защитный иммунитет против *M. tuberculosis* требует активации IFN-зависимого сигнального

пути как I, так и II типа (Ghanavi et al., 2021). Повышенный уровень экспрессии *TGFB1* в лёгких пациентов с туберкулёзом с высокой активностью воспаления может быть связан с преобладанием сигнального пути II типа. В ходе корреляционного анализа мы обнаружили умеренную отрицательную корреляцию между экспрессией генов *STAT3* и *IFN*, что может подтверждать данную гипотезу.

Известно, что TNF- $\alpha$  вырабатывается различными иммунными клетками, преимущественно макрофагами, в ответ на микобактериальную инфекцию и необходим для контроля патогена, формирования гранулёмы и активирует канонический путь NF- $\kappa$ B. Однако высокий уровень секреции TNF- $\alpha$  может привести к повреждению тканей и активации воспаления (van Loo and Bertrand, 2023). Показано, что низкие уровни TNF- $\alpha$  могут регистрироваться в сыворотке крови у пациентов с туберкулёзом с лимфоаденопатией и зонами некроза в лёгких (Beig et al., 2023). Это позволяет предположить наличие других факторов, помимо TNF- $\alpha$ , обуславливающих высокую активность воспаления, что согласуется и с нашими данными.

Повышенные уровни IL6 в плазме наблюдались у пациентов с туберкулёзом с более тяжёлыми клиническими формами заболевания, что было отмечено разными авторами (Guzmán-Beltrán et al., 2021; Tang et al., 2013). Высокие уровни IL6, так же, как и TNF- $\alpha$ , могут приводить к повреждению тканей и активации воспаления (Boni et al., 2022). Показано, что передача сигналов IL6 в основном происходит через путь JAK/STAT, преимущественно через STAT3 (Heinrich et al., 2003).

Используя ресурс GeneMANIA.org, мы построили сеть взаимодействий между генами анализа. Обнаружено, что *STAT3* представляет собой основной ген, который объединяет все проанализированные в нашем исследовании гены (рис. 3.11).



**Рис. 3.11.** Сеть взаимодействия между генами, основанная на их совместной экспрессии, полученная GeneMANIA. Два гена связаны, если уровни их экспрессии одинаковы в разных условиях исследования экспрессии генов (Pavlova et al., 2023)

Известно, что STAT3 (преобразователь сигналов и активатор транскрипции) играет важную роль в патогенезе туберкулёза (Rottenberg and Carow, 2014). Однонуклеотидные полиморфизмы этого гена коррелируют с тяжестью заболевания (Wang et al., 2021). Кроме того, STAT3 являются компонентом IL6-активируемого комплекса фактора фазы острого ответа (APRF), который стимулирует выработку врожденных иммунных медиаторов (Zhong et al., 1994). В клетках он может находиться в нефосфорилированной (uSTAT3) и фосфорилированной (pSTAT3) формах. IL6 стимулирует фосфорилирование STAT3, что приводит к повышению его уровня в цитоплазме и вызывает вторую волну экспрессии *IL6* (Yang et al., 2007).

SOCS3 (супрессор цитокиновой сигнализации 3) ингибирует фосфорилирование STAT3 путем связывания с субъединицей gp130 рецептора IL6. Хотя SOCS3 обычно является отрицательным регулятором передачи сигналов IL6, в некоторых случаях он регулирует воспалительные реакции, ингибируя STAT3 и, по-видимому, принимает участие в патогенезе различных воспалительных заболеваний, в том числе туберкулёза (Gao et al., 2018).

IL6, IL10, STAT3 и SOCS3 также идентифицированы в качестве референсных генов, характерных для пациентов с туберкулёзом, в отличие от здоровых людей (Adankwah et al., 2021). В нашем исследовании мы обнаружили умеренную корреляцию между экспрессией *IL10* и *IL6* ( $r = 0,59$ ) и *SOCS3* ( $r = 0,57$ ).

Первоначально TGM2 был включён в наше исследование в качестве маркера M2 макрофагов. TGM2 представляет собой фермент, участвующий в различных биологических процессах: посттрансляционных модификациях белков, гибели клеток, передаче сигналов (Piacentini et al., 2014). TGM2 активирует сигнальный путь IL6/JAK/STAT3, а подавление экспрессии *TGM2* снижает фосфорилирование STAT3 (Wang et al., 2022). При туберкулёзном воспалении TGM2 играет значительную роль, способствуя выживанию *M. tuberculosis* в инфицированных макрофагах: его инактивация усиливает бактерицидные свойства макрофагов. Кроме того, TGM2 конститутивно активирует промотор гена *HIF1A* (Kumar and Mehta, 2012). Была отмечена умеренная отрицательная корреляция между экспрессией *TGM2* и *CD163* ( $r = -0,41$ ). Предполагается, что TGM2 может быть потенциальной мишенью в рамках патогенетической терапии или «терапии, направленной на организм хозяина» при туберкулёзе (Palucci et al., 2019).

Гипоксия является характерной особенностью воспаления при туберкулёзе, а фактор, индуцируемый гипоксией 1 (HIF1), представляет собой фактор транскрипции, состоящий из субъединиц HIF1 $\alpha$  и HIF1 $\beta$ . Ингибирование STAT3 блокирует экспрессию *HIF1A* (Xu et al., 2005), что также указывает на роль STAT3 при туберкулёзе. Роль HIF1 $\alpha$  при туберкулёзе неоднозначна: он способствует антимикробной активности макрофагов человека против *M. tuberculosis*, но также нарушает активацию и дифференцировку CD4<sup>+</sup> Т-клеток, что приводит к повышению восприимчивости к инфекции *M. tuberculosis* и прогрессированию специфического воспаления (Liu et al., 2022; Suresh et al., 2023). Эти данные дополнительно подчеркивают важность изучения регуляции экспрессии гена *ABCBI* и функциональной активности P-gp у пациентов с туберкулёзом лёгких.

### 3.3 Заключение к главе 3

Таким образом, при анализе экспрессии генов в перифокальной области туберкулёзом мы обнаружили, что, несмотря на сходство морфологических проявлений высокой активности воспаления, молекулярно-генетический профиль образцов различается. Это исследование предоставляет новые свидетельства того, что высокая активность воспалительного процесса может быть обусловлена различными факторами. Это может быть развитие патологического процесса, обусловленного как высоким уровнем экспрессии *IL6* и *STAT3*, так и высоким уровнем экспрессии *TNF* и, возможно, инфильтрацией лёгких CD163-позитивными макрофагами. Мы идентифицировали сигнатуру, характеризующуюся повышенной экспрессией генов *HIF1A*, *TGM2*, *IL6*, *SOCS3* и *STAT3*, которая не только ассоциирована с высокой активностью воспаления, но также коррелирует с экспрессией *ABCB1*. Мы предполагаем, что повышенная экспрессия *ABCB1* в тканях лёгких пациентов с туберкулёзом потенциально опосредована активацией сигнального пути *STAT3*. Другая генная сигнатура, связанная с высокой активностью воспаления, характеризовалась повышенными уровнями экспрессии генов *TNF* и *CD163*. В дальнейшем обнаруженные нами молекулярно-генетические сигнатуры могут улучшить понимание иммунопатологии туберкулёза и потенциально быть полезными при разработке подходов для повышения эффективности противотуберкулезной терапии. Продемонстрированные в данном разделе результаты расширяют имеющиеся данные об активности туберкулёзного воспаления и задействованных в нём молекулярных механизмов. Дальнейшее уточнение функций P-gp при туберкулёзном воспалении может быть важным шагом в разработке новых подходов лечения туберкулёза в персонализированной химиотерапии.

## ГЛАВА 4

### БЕЛКИ МЛУ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЁЗНОМ ВОСПАЛЕНИИ И ЕГО ХИМИОТЕРАПИИ

В данном разделе представлены результаты исследований, которые отвечают на вопрос: как развитие туберкулёзного воспаления влияет на экспрессию генов белков МЛУ отдельно и совместно с разными вариантами противотуберкулёзных препаратов?

Генетика играет важную роль в проявлении устойчивости или чувствительности организма хозяина к туберкулёзной инфекции. Восприимчивость к туберкулёзной инфекции, развитие и течение ответного воспалительного процесса в организме-хозяина являются полигенно контролируемые признаками. Анализ экспрессии генов ABC-транспортёров в операционном материале больных туберкулёзом лёгких продемонстрировал, что ген *ABCBI* транспортёра Р-гр является референсным геном активности туберкулёзного воспаления. При этом было выявлено, что его экспрессия является гетерогенной в группе больных с высокой активностью специфического воспаления. Это поставило вопрос о необходимости изучения факторов влияния туберкулёзного воспаления на экспрессию гена *ABCBI* в адекватных экспериментальных условиях *in vivo*. Важно было получить экспериментальное туберкулёзное воспаление, развитие которого позволило бы по морфологическим признакам выделить разные стадии его активности в лёгких и сопоставить их с уровнем экспрессии генов белков МЛУ – Р-гр, MRP1, BCRP.

Исследование проводили на базе виварного комплекса ЦНИИТ (руководитель к.б.н. И.В. Бочарова), имеющего необходимую сертификацию для постановки и изучения моделей экспериментального туберкулёза. Инбредные линии мышей *C57BL/6* и *Balb/c* являются наиболее признанным модельным объектом для исследования патогенеза туберкулёзного воспаления. Тем более, что выявленная гомология геномов мыши и человека составляет около 85%. На сегодняшний день показано достаточно сильное сходство почти всех аспектов иммунного ответа на *M. tuberculosis* у человека и мыши (Apt and Kramnik, 2009; Apt, 2011). Моделирование экспериментального туберкулёза на мышях широко используется в доклинических испытаниях (Kondratyeva et al, 2024; Linge et al, 2023; Nikonenko et al, 2023).

Для ответа на вопрос о модуляции экспрессии генов белков МЛУ при туберкулёзном воспалении в лёгких в работе были получены следующие экспериментальные модели *in vivo*: 1) прогрессирующее течение туберкулёзного воспаления в лёгких инфицированных мышей; 2) развитие туберкулёзного воспаления в лёгких мышей, инфицированных в условиях действия химиотерапии основными противотуберкулёзными препаратами – рифампицином или изониазидом.

Одним из критериев выбора экспериментальной модели был уровень экспрессии генов ABC-транспортёров в лёгких здоровых неинфицированных

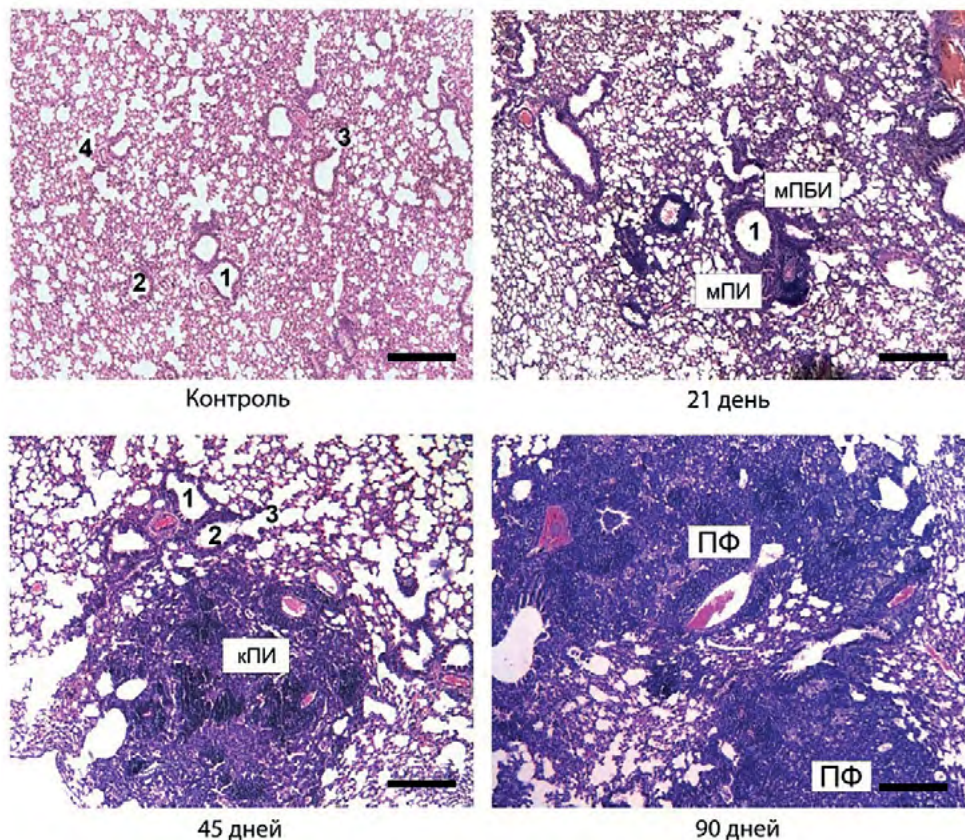
животных. С целью его определения был предварительно проведён анализ уровней экспрессии генов МЛУ в лёгких мышей разных инбредных линий. В результате были выбраны мыши линии *Balb/c*, которые характеризовались достаточно низким уровнем экспрессии генов анализа, что позволило в дальнейшем выявить индукцию экспрессии генов *Abcb1a/b*, *Abcc1*, *Abcg2*.

Для получения модели экспериментального туберкулёза использовали классическую модель инфицирования мышей (Nikonenko et al., 1985; Erokhina et al., 2017). Мышей инбредной линии *Balb/c* содержали в специализированном виварии ФГБНУ «ЦНИИТ» в соответствии с постановлением Министерства здравоохранения Российской Федерации № 755 и протоколу National Institute of Health по обеспечению безопасности животных (OLAW) № A5502. Вода и еда были предоставлены *ad libitum*. Все экспериментальные процедуры были одобрены комитетом по уходу за животными ФГБНУ «ЦНИИТ» (протоколы IACUC № 4). Мыши были инфицированы аэрогенным путём из расчёта 100 жизнеспособных КОЕ на лёгкое с использованием специализированной камеры (Glas-Col, Terre Haute, IN). Штамм *M. tuberculosis* H37Rv был первоначально получен из Института Пастера (Париж, Франция). Всего в эксперименте было использовано 70 мышей. Эффективность инфицирования отражало нарастание количества КОЕ *M. tuberculosis* на лёгкое мыши, которое составило ( $M \pm SD$  ( $\log_{10}$ )):  $5,2 \pm 0,21$  (21 день),  $7,64 \pm 0,58$  (45 дней),  $10,2 \pm 0,41$  (90 дней). Эти же сроки были использованы для гистологической оценки прогрессирующего (активности) туберкулёзного процесса у нелеченных животных.

Введение лекарственных препаратов (с питьевой водой) экспериментальным животным было начато на 25-й день после их инфицирования и продолжалось в течение 65 дней рифампицином (10 мг/кг) или изониазидом (25 мг/кг). Выбор экспериментальных концентраций препаратов обусловлен их концентрацией в крови пациентов с туберкулёзом лёгких при проведении химиотерапии. Экспрессию генов *Abcb1a/b*, *Abcc1*, *Abcg2* определяли при помощи полуколичественного метода ПЦР с обратной транскрипцией и последующим анализом изображений продуктов амплификации в программе Image Pro Plus и их сравнения с амплификацией гена «домашнего хозяйства» *Actb*. Гистологическое исследование проводилось по стандартной методике.

#### 4.1 Гистологическая характеристика туберкулёзного воспаления у мышей в динамике развития и после химиотерапии

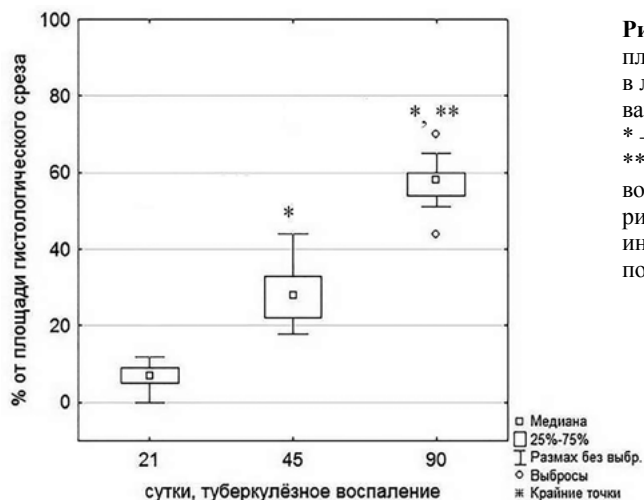
Как показало гистологическое исследование, лёгкие интактных животных характеризуются «воздушной» паренхимой, сформированной хорошо расправленными альвеолами (рис. 4.1), выстланными однослойным плоским эпителием. Просматриваются продольные и поперечные срезы внутрилёгочных бронхов (1), терминальных (2) и респираторных (3) бронхиол, альвеолярных ходов (4). Имеются единичные локальные участки кровоизлияния (геморрагии), что, очевидно, является результатом проведения цервикальной дислокации.



**Рис. 4.1.** Морфологические изменения в лёгких при прогрессировании туберкулёзного воспаления у нелеченных мышей. В процессе развития туберкулёзного воспаления происходит увеличение зоны, занимаемой периваскулярными и перибронхиальными инфильтратами, их слияние в пневмонические фокусы (1 – средние и мелкие бронхи, 2 – терминальная бронхиола, 3 – респираторная бронхиола, 4 – альвеолярные ходы); мПИ – мелкие периваскулярные инфильтраты, кПИ – крупные периваскулярные инфильтраты, мПБИ – мелкий перибронхиальный инфильтрат, ПФ – пневмонический фокус. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок = 100 мкм

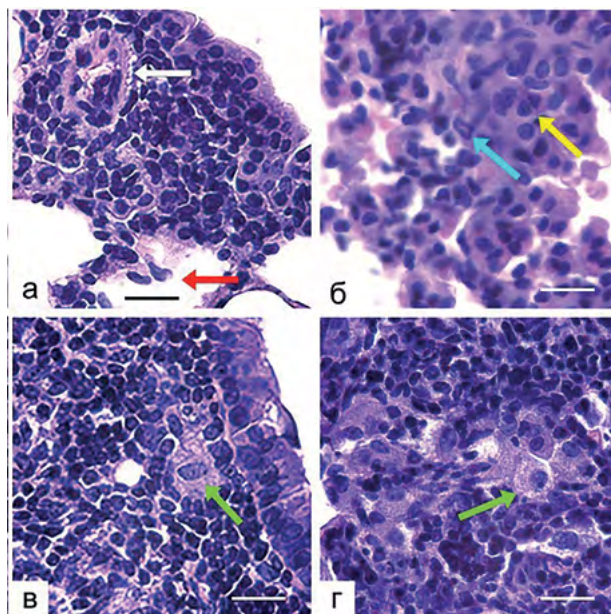
Через 21, 45 и 90 дней после аэрогенного инфицирования у нелеченных животных наблюдаются характерные изменения в лёгких, свидетельствующие о наличии и прогрессировании специфического воспаления. На начальной стадии его развития (21 день) в лёгочной паренхиме появляются отдельные мелкие перибронхиальные и периваскулярные клеточные инфильтраты. При прогрессировании процесса (45 дней) эти области сливаются между собой. На поздней стадии (90 дней) в лёгком формируются крупные пневмонические фокусы.

Динамика увеличения площади инфильтративных изменений представлена на рис. 4.2: значения медианы размеров пневмонических фокусов возрастают в 3,6 раза через 45 дней и 7,3 раза через 90 дней, что значительно превышает этот показатель для начальной стадии развития туберкулёзного воспаления.



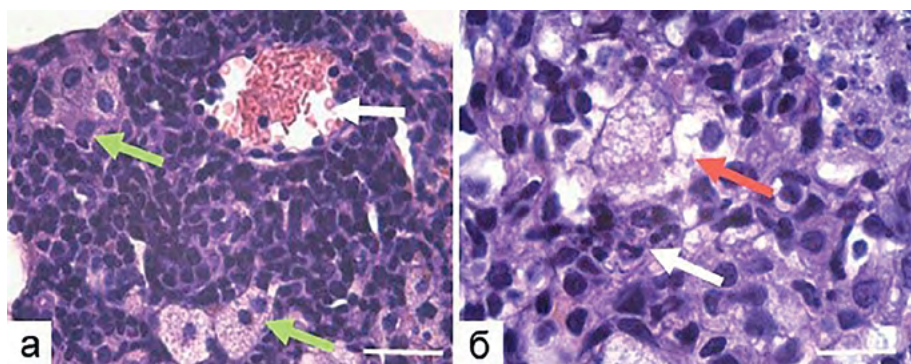
**Рис. 4.2.** Гистограмма увеличения площади пневмонических фокусов в лёгких мышей при прогрессировании туберкулёзного воспаления. \* – в сравнении с 21-ми сутками и \*\* 45-ми сутками туберкулёзного воспаления,  $p = 0,00001$ , t-критерий Стьюдента. Анализ площади инфильтратов проводился при помощи программы Image J

Анализ клеточного состава инфильтратов показал, что через 21 день после инфицирования в них преобладают моноциты/макрофаги, выявляются единичные нейтрофилы и отдельные макрофаги с пенистой цитоплазмой (размер клеток 15–17 мкм), которые локализуются поодиночке или формируют небольшие скопления (рис. 4.3а–г).



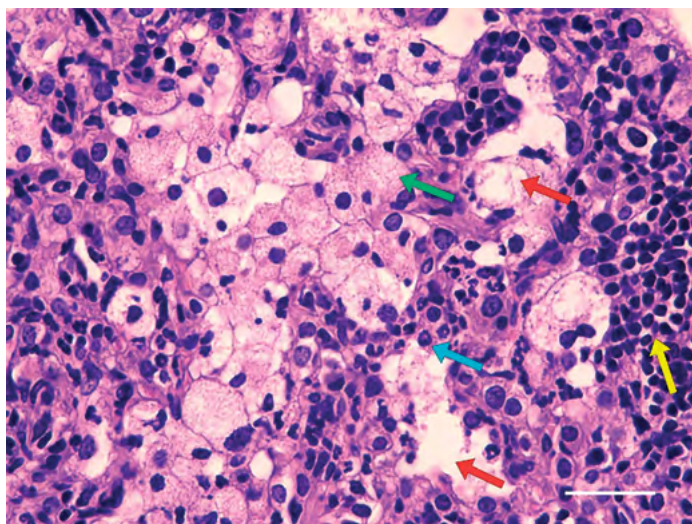
**Рис. 4.3.** Особенности клеточного состава инфильтратов в лёгких мышей через 21 день после инфицирования: а – периваскулярный инфильтрат (белой стрелкой показан кровеносный сосуд, красной – макрофаги в просвете альвеолы; б – перибронхиальный инфильтрат (голубая стрелка указывает на нейтрофил, жёлтая – на скопление макрофагов); в – одиночный пенистый макрофаг (зелёная стрелка) в области формирования перибронхиального инфильтрата; г – небольшое скопление пенистых макрофагов (показаны зелёной стрелкой). Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок = 20 мкм

Через 45 дней после инфицирования в лёгких определяются пневмонические фокусы, содержащие скопления пенистых макрофагов, среди которых встречаются отдельные клетки с признаками деструктивных изменений. Вокруг них локализуются нейтрофилы, формирующие небольшие скопления из 3–5 клеток (рис. 4.4 а,б).



**Рис. 4.4.** Особенности клеточного состава пневмонических фокусов в лёгких мышей через 45 дней после инфицирования: а – периваскулярный инфильтрат (белой стрелкой показан кровеносный сосуд, зелёной – пенистые макрофаги); б – пенистый макрофаг с признаками деструкции цитоплазмы (красная стрелка) и рядом расположенные нейтрофилы (белая стрелка). Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок 20 мкм

Через 90 дней в составе пневмонических фокусов формируются крупные скопления пенистых макрофагов: клетки со светлой вакуолизированной цитоплазмой, достигающие в размере 20–25 мкм. В составе таких скоплений выявляются нейтрофильные лейкоциты, формируются локальные зоны микронекроза (рис. 4.5).

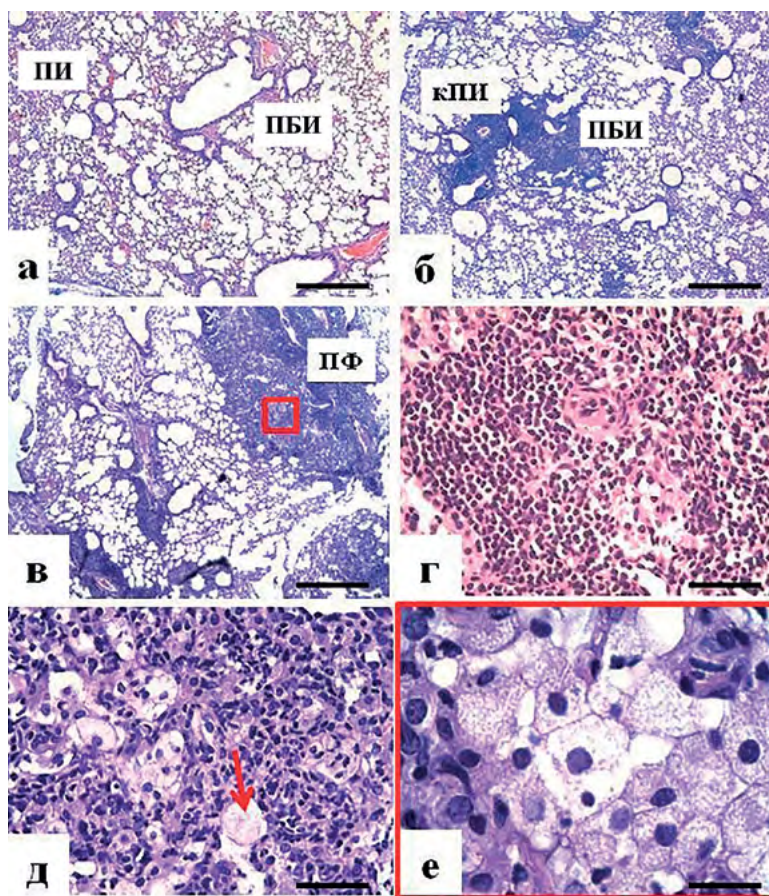


**Рис. 4.5.** Особенности клеточного состава пневмонических фокусов в лёгких мышей через 90 дней после инфицирования. Зелёная стрелка – скопление пенистых макрофагов, жёлтая стрелка – лимфоциты и их скопления, красная стрелка – микронекрозы, содержащие нейтрофилы (голубая стрелка). Масштабный отрезок = 20 мкм

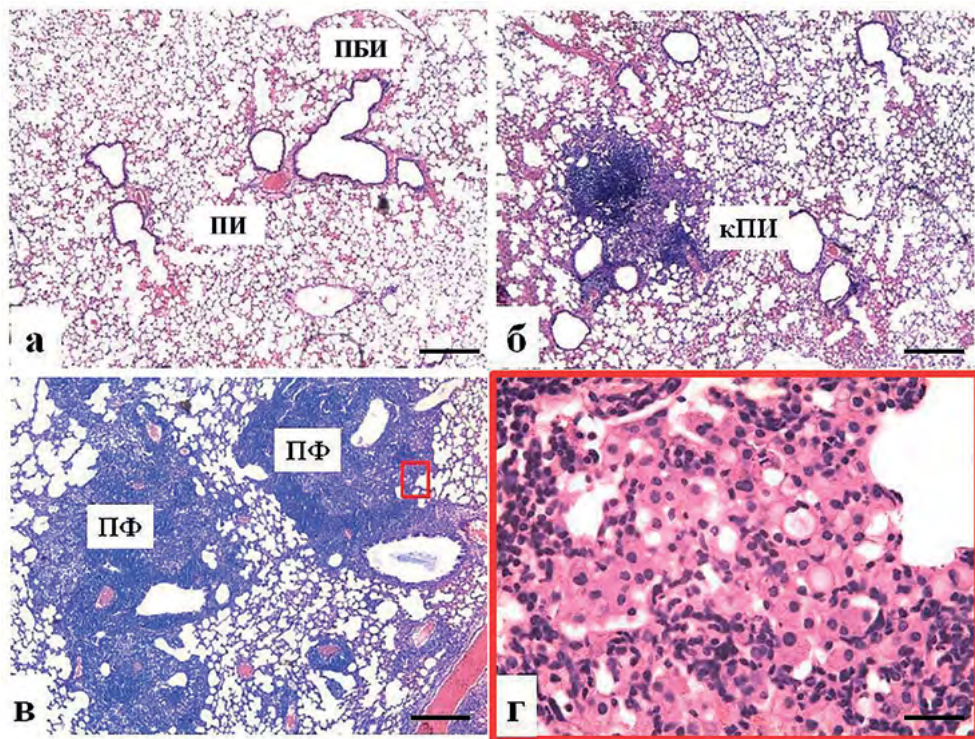
Таким образом, на основании морфологического исследования лёгких у инфицированных *M. tuberculosis* мышей линии *Balb/c* экспериментальную модель туберкулёза можно разделить на три стадии: начальную (21 сутки), промежу-

точную (45 суток) и позднюю (90 суток). Прогрессирование туберкулёзного воспаления сопровождается инфильтрацией альвеолярной паренхимы лимфоцитами и макрофагами, в том числе с пенистой цитоплазмой, разрушение которых приводит к концентрации в этих зонах нейтрофилов и формированию микронекрозов.

После химиотерапии экспериментального туберкулёза в лёгких выявляются отдельные зоны с мелкими и, значительно реже, крупными периваскулярными и перибронхиальными воспалительными инфильтратами (рис. 4.6а–в и 4.7а–в). У мышей, леченых рифампицином, инфильтраты содержат скопления лимфоцитов и пенистых макрофагов с признаками деструкции (рис. 4.6г–е). Для животных, леченых изониазидом, характерны инфильтраты преимущественно с макрофагами без признаков деструкции (рис. 4.7г).



**Рис. 4.6.** Туберкулёзное воспаление в лёгких мышей после химиотерапии рифампицином: а – мелкие периваскулярные и перибронхиальные инфильтраты, б – крупный периваскулярный инфильтрат, в – пневмонические фокусы, г – лимфоцитарный инфильтрат, д – лимфоцитарный инфильтрат с отдельными пенистыми макрофагами (красная стрелка), е – скопление пенистых макрофагов с признаками деструкции. ПИ и ПБИ – периваскулярные и перибронхиальные инфильтраты. ПФ – пневмонические фокусы. Красной рамкой показан один и тот же участок среза при разном увеличении. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок 100 мкм (а, б, в), 50 мкм (г, д) и 20 мкм (е).



**Рис. 4.7.** Туберкулёзное воспаление в лёгких мышей после химиотерапии изониазидом:

а – мелкие периваскулярные и перибронхиальные инфильтраты,  
 б – крупный периваскулярный инфильтрат, в – пневмонические фокусы,  
 г – скопление макрофагов. ПИ и ПБИ – периваскулярные и перибронхиальные  
 инфильтраты. ПФ – пневмонические фокусы. Красной рамкой показан один  
 и тот же участок среза при разном увеличении.

Окрашивание гематоксилином и эозином.

Масштабный отрезок 100 мкм (а, б, в) и 50 мкм (г).

## 4.2 Анализ экспрессии генов *P-gp*, *Mgp1*, *Vscrp*

Данные об уровне экспрессии генов ABC-транспортёров в лёгких на разных стадиях развития туберкулёзного процесса у мышей, в сравнении с интактными животными, приведены в табл. 4.1, статистический анализ – в табл. 4.2, 4.3. Анализ значений медиан показал, что уже на начальной стадии туберкулёзного воспаления (21 день) увеличивается уровень экспрессии генов *Abcb1a* и *Abcc1* по сравнению с интактными животными. Индукция экспрессии гена *Abcb1b* происходит на 45-й день, тогда как экспрессия гена *Abcg2* в среднем остается на одном и том же уровне на всех сроках эксперимента.

Табл. 4.1. Уровень экспрессии генов белков МЛУ на разных стадиях развития туберкулёзного воспаления и при его химиотерапии рифампицином или изониазидом

<i>Гены</i>	<i>Abcb1a</i>	<i>Abcb1b</i>	<i>Abcc1</i>	<i>Abcg2</i>
<i>Интактные животные</i>	53 (37–63)	51 (38–56,5)	35 (30–79,5)	77 (76–81)
<i>21 день ТБ</i>	91* (64–96,5)	53 (46,5–65,5)	92* (82–101)	91 (80–94)
<i>45 дней ТБ</i>	117* (87–138)	79*, ** (74–100)	130*, ** (95–157)	86 (80–104)
<i>90 дней ТБ</i>	128* (95–147)	72* (62–91)	135*, ** (129–148)	89 (80–109)
<i>90 дней ТБ + RIF</i>	200 (94–211)	56 (54–74)	111 (105–135)	83 (52–104)
<i>90 дней ТБ + IZN</i>	30 (29–63)	67 (58–81)	22 (16–33)	83 (68–108)

Даны значения медиан, в скобках указан квартиль распределения (25–75%); ТБ – туберкулёзное воспаление, RIF – рифампицин, IZN – изониазид.

\* – по сравнению с контрольными животными, \*\* – по сравнению с 21 сутками туберкулёзного воспаления статистически значимые различия в экспрессии генов относительно контрольных значений (интактных животных). Красным и синими кругами отмечены статистически значимые различия между группами сравнения при химиотерапии туберкулёзного воспаления

Табл. 4.2. Статистически значимые различия между группами сравнения в динамике развития туберкулёзного воспаления в лёгких мышей

ТБ (дни)	21 день ТБ	45 дней ТБ	90 дней ТБ
<i>Abcb1a</i>			
0 дней	0,032	0,001	0,005

Окончание таблицы 4.2.

ТБ (дни)	21 день ТБ	45 дней ТБ	90 дней ТБ
<i>Abcb1b</i>			
0 дней	–	0,004	0,028
21 день ТБ		0,02	–
<i>Abcc1</i>			
0 дней	0,001	0,004	0,005
21 день ТБ	–	0,048	0,015

Срок 0 дней соответствует интактным (неинфицированным) животным.  
U-критерий Манна – Уитни

**Табл. 4.3.** Статистически значимые различия между группами сравнения при химиотерапии экспериментального туберкулёза рифампицином или изониазидом

Группы сравнения	90 день ТБ	90 дней ТБ + IZN
<i>Abcb1a</i>		
90 дней ТБ + RIF	0,002	0,007
<i>Abcc1</i>		
90 дней ТБ + RIF	–	0,005

U-критерий Манна – Уитни

Экспрессия гена *Abcb1a* также возрастает в динамике развития туберкулёзного процесса, достигая максимума на срок в 90 дней (в 2,4 раза). Несмотря на столь значимое возрастание, уровень экспрессии гена *Abcb1a* в этой группе статистически достоверно выше только по сравнению с группой контроля (табл. 4.2). Уровень экспрессии гена *Abcb1b* остается на одном уровне с ранними сроками развития туберкулёзного воспаления, статистически значимое увеличение (в 1,5 раза) его экспрессии выявляется только на 45-й день и остаётся на достигнутом уровне до конца наблюдения.

Для гена *Abcc1* прослеживается устойчивая тенденция к повышению уровня его экспрессии при прогрессировании туберкулёзного процесса вплоть до поздней стадии (90 дней). Возрастание уровня экспрессии гена *Abcc1* на сроках 21 (в 2,6 раза), 45 (в 3,7 раза) и 90 (3,85 раза) дней статистически достоверно выше по сравнению с контролем (табл. 4.2).

В лёгких инфицированных мышей на фоне их лечения рифампицином регистрируется высокая экспрессия генов *Abcb1a* и *Abcc1*, которая выше в 6,7 и 5 раз соответственно, чем при химиотерапии изониазидом (табл. 4.1, 4.3).

В последнем случае уровень экспрессии вышеперечисленных генов сравним с их экспрессией в группе интактных животных (кроме гена *Abcc1*, экспрессия которого ниже). Различия в уровнях экспрессии генов *Abcg2* и *Abcb1b* не выявлены. Обращает на себя внимание и тот факт, что изониазид снижает экспрессию генов МЛУ даже по сравнению с контрольными животными.

Для ответа на вопрос о возможном влиянии рифампицина на экспрессию генов белков МЛУ в клетках самих лёгких, т. е. при отсутствии факторов туберкулёзного воспаления, были поставлены дополнительные эксперименты. С этой целью неинфицированных мышей (самки) линии *Balb/c* (по 7 животных в группе эксперимента и интактного контроля) длительно «лечили» рифампицином. Препарат добавляли в питьевую воду из расчёта 10 мг на килограмм веса мышки в течение 120 дней. Экспрессию генов белков МЛУ определяли при помощи полуколичественного метода ПЦР с обратной транскрипцией с последующим анализом изображений продуктов амплификации в программе Image-Pro Plus и их сравнения с амплификацией гена «домашнего хозяйства» *Actb*.

Анализ изменения уровня экспрессии генов анализа в лёгких здоровых животных показал, что под воздействием длительного приема рифампицина достоверно возрастает (в 2,6 раза) экспрессия гена *Abcb1a* (с 33 до 111) (табл. 4.4) при статистической значимости  $p = 0,019$ . Для гена *Abcb1b* можно говорить о тенденции к увеличению значения медианы его экспрессии в 1,5 раза (с 41 до 60), хотя эти изменения не являются статистически значимыми. Для других генов МЛУ изменения в уровне экспрессии при длительном воздействии рифампицином не выявлены.

**Табл. 4.4.** Изменение уровня экспрессии гена *Abcb1a* в лёгких здоровых мышей при длительном воздействии рифампицином

Гены	<i>Abcb1a</i>	<i>Abcb1b</i>	<i>Abcc1</i>	<i>Abcg2</i>
Интактные животные	39 (29–48)	41 (29–44)	21 (14–81)	71 (39–77)
+ RIF	105* (75–162)	60 (50–82)	25 (15–48)	71 (34–79)

Даны значения медиан, в скобках указан квартиль распределения (25–75%).

Звездочкой отмечено статистически значимое ( $p < 0,019$ ) различие в экспрессии гена *Abcb1a* при сравнении группы интактных животных и после длительного воздействия рифампицином.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что длительное воздействие рифампицином (в отсутствие туберкулёзного воспаления) индуцирует экспрессию гена *Abcb1a* (и в меньшей степени экспрессию гена *Abcb1b*) в лёгких у здоровых мышей. Клетки альвеолярного эпителия составляют подавляющее большинство (75–77%) в лёгких мышей (Stone et al., 1992; Лепеха

и др., 2017) и это позволяет предположить, что рифампицин является индуктором экспрессии гена *Abcb1a*, в первую очередь, в альвеолярном эпителии.

Сравнение значений медиан генов МЛУ при прогрессировании туберкулёзного воспаления показало, что для всех генов анализа характерен разный уровень экспрессии. Если уровень экспрессии гена *Abcg2* в процессе эксперимента не изменяется, то по сравнению с контрольной группой экспрессия гена *Abcb1a* увеличивается в 2,4 раза; *Abcb1b* – в 1,5 раза; *Abcc1* – в 3,85 раза. Возрастание уровней экспрессии генов происходит уже на начальной стадии инфицирования (кроме гена *Abcb1b*) и остаётся высокой при дальнейшем прогрессировании воспалительного процесса. При этом максимальные значения уровня экспрессии генов МЛУ достигаются на сроках 45 или 90 дней туберкулёзного воспаления. Только для двух генов – *Abcb1a* и *Abcc1* – характерны высокие уровни их экспрессии (с тенденцией к увеличению) на всех стадиях туберкулёзного процесса.

Согласно нашим данным, уже на ранней стадии туберкулёзного воспаления (21 день) наблюдается значимое (в несколько раз) увеличение экспрессии генов *Abcb1a* и *Abcc1*. На более поздних сроках эксперимента для гена *Abcb1a* выявлена динамика в увеличении его экспрессии, но она статистически достоверно различается только с данными интактной группы животных. Экспрессия гена *Abcc1* на более поздних сроках туберкулёзного воспаления продолжает статистически значимо возрастать, тем более экспрессии этого гена в легких мышей выше, чем *Abcb1a* и *Abcg2* по сравнению с другими органами (Bleasby et al., 2006).

Результаты, полученные нами при изучении экспериментального туберкулёза, согласуются с данными Lee и соавторов, которые использовали модель аэрогенно инфицированных мышей линии C57BL/6 штаммом H<sub>37</sub>Rv (Lee et al., 2009). Работа данных авторов – одна из немногих, где была сделана глобальная попытка выявить индуцибельность экспрессии генов двадцати белков-транспортёров, относящихся к семейству АТФ-связывающих белков в разных паренхиматозных органах при туберкулёзе. Наиболее значимые изменения в экспрессии анализируемых генов были выявлены в печени, почке и кишечнике, более дифференцированные – в селезёнке и лёгких. Отмечается, что прогрессирование туберкулёзного процесса в лёгких коррелирует с экспрессией генов следующих цитокинов: IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IFN $\gamma$  через 4 недели, а IL6, 10, 12 – через 8 недель после инфицирования. Наличие баланса между про- и противовоспалительными цитокинами указывает на наступление хронической стадии туберкулёзного процесса. На этом же сроке воспаления (8 недель) наблюдалось увеличение экспрессии генов практически всех проанализированных белков-транспортёров. В клетках лёгкого достоверно возростала экспрессия генов *Abcb1a*, *Abcc1*, *Abcg2*, тогда как экспрессия *Abcb1b* не изменялась. В нашем исследовании были использованы значительно более длительные сроки наблюдения (22,5 недели), которые позволили проследить динамику повышения экспрессии всех этих генов от начальной стадии инфицирования (21 день), образования первых выраженных периваскулярных/перибронхиальных инфильтратов (45 дней) до поздней стадии развития туберкулёзного воспаления, на которой уже выявляются области деструкции и микронекрозов (90 дней). Особенно выраженно возростала

экспрессия гена *Abcc1*, что позволяет предполагать его участие в противомикробной защите лёгких, что подтверждается исследованиями последних лет (Zukauskas et al., 2018).

В нашем исследовании рифампицин в лёгких неинфицированных животных вызывает индукцию экспрессии гена *Abcb1a*. В проведённых ранее исследованиях других авторов показано, что рифампицин вызывает индукцию гена *ABCBI* в энтероцитах, гепатоцитах, эпителии почечных канальцев человека (Greiner et al., 1999; Geick et al., 2001; Magnarin et al., 2004). Один из механизмов, который может приводить к увеличению уровня экспрессии гена *ABCBI* – это активация прегнанового рецептора PXR, который относится к суперсемейству ядерных рецепторов (Kim et al., 2015). Рифампицин является лигандом для PXR (Sinz et al., 2006). После связывания рифампицина с PXR прегнановый рецептор активируется, транслоцируется в ядро и связывается с промоторной областью гена *ABCBI*, что индуцирует его экспрессию. У мышей PXR регулирует экспрессию как *Abcb1a*, так и *Abcb1b* генов (Cui et al., 2009).

### 4.3 Заключение к главе 4

Полученные на экспериментальных моделях *in vivo* результаты позволяют констатировать как вклад факторов воспалительной реакции, так и фармакологического воздействия рифампицина на экспрессию генов белков МЛУ. При этом следует отметить, что развитие туберкулёзного воспаления у мышей характеризуется рядом особенностей. В гранулемах лёгких мышей нет области центрального некроза (могут возникать отдельные области деструкции и микронекрозов), вокруг туберкулёзных очагов не формируется фиброзная капсула, расположение макрофагов и Т-лимфоцитов в туберкулёзных очагах у мышей и людей не идентичны друг другу. В гранулематозных зонах лёгких мышей нет гипоксии. Данные особенности необходимо учитывать при сравнении результатов, полученных на клиническом и экспериментальном материале.

Продемонстрирована динамика повышения экспрессии генов *Abcb1a/b* и *Abcc1* в клетках лёгких на разных стадиях развития экспериментального туберкулёзного воспаления у мышей. Возрастание уровня экспрессии особенно характерно для генов *Abcc1* и *Abcb1a*, кодирующих наиболее универсальный из белков МЛУ – Pgp. Уровень *Abcb1a* также значительно возрастает при химиотерапии рифампицином неинфицированных и инфицированных *M. tuberculosis* мышей, что подчёркивает роль рифампицина как индуктора *Abcb1a*. Этот результат свидетельствует о том, что из-за активности белков-транспортёров клеток лёгкого при развитии туберкулёзного процесса уже создаётся платформа для возможного снижения эффективности специфической химиотерапии.

## ГЛАВА 5

### МОДЕЛИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ Р-GR В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ *in vitro*

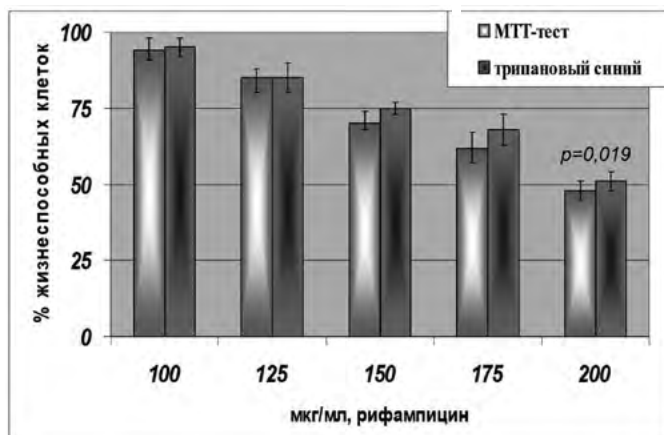
Рифампицин является гидрофобным препаратом и легко проникает в клетки и ткани: его внутриклеточная концентрация может превышать внеклеточную концентрацию в 4-5 раз (Burman, 1997). В последние годы появляется всё большее число исследований, изучающих «вторичные» эффекты препарата, не связанные с его антибактериальной активностью.

Говоря об исследовании активности Р-гр под влиянием рифампицина, важно определить эффекты воздействия препарата на митохондрии в клетках человека (млекопитающих). Известно, что в клетках бактерий мишенью для рифампицина является  $\beta$ -субъединица РНК-полимеразы, и взаимодействие с ней этого препарата блокирует удлинение молекулы РНК (Campbell et al., 2001). В ранних работах, посвящённых изучению свойств рифампицина, было продемонстрировано, что в клетках млекопитающих рифампицин способен ингибировать митохондриальную РНК-полимеразу (Gadaleta et al., 1970) и блокировать синтез РНК в митохондриях (Buss et al., 1978). Это означает, что одной из потенциальных мишеней для рифампицина в клетках человека являются митохондрии. Р-гр – АТФ-зависимый белок, и для корректной оценки действия рифампицина на его функциональную активность необходимо ответить на вопрос о характере влияния препарата на митохондрии.

В разделе 4 было установлено, что рифампицин вызывает индукцию экспрессии гена *Abcb1a/Mdr1a* в лёгких здоровых и инфицированных *M. tuberculosis* мышей. В респираторном отделе лёгких эпителиальные клетки составляют 75–77% у мыши и 69–71% у человека. Клетки интерстиция (гистиоциты, дендритные клетки, фибробласты) – 21–22,6% и 26–28,4%, а альвеолярные макрофаги – 2,3–2,4% и 3–3,2% соответственно (Stone et al., 1992; Лепеха, 2017). Исходя из клеточного состава респираторного отдела лёгких, очевидно, что клетки эпителия составляют подавляющее большинство (более 70%). Мы предположили, что индукция экспрессии гена *Abcb1a* рифампицином происходит в клетках эпителия и в макрофагах. В связи с этим была поставлена задача проанализировать влияние рифампицина на функциональную активность Р-гр в клетках эпителиального происхождения и в провоспалительных макрофагах человека, а также выявить влияние рифампицина на митохондрии. В разделе 5 представлены данные, характеризующие влияние рифампицина на активность Р-гр в клетках эпителиального происхождения и на митохондрии. Эксперименты проводились на клеточной линии СПЭВ (почка эмбриона свиньи). Выбор этой линии объяснялся изначально более низким уровнем в клетках активности Р-гр по сравнению с клетками эпителиального происхождения других линий. Этот факт позволил выявить значительное возрастание функциональной активности Р-гр после длительного воздействия рифампицином.

## 5.1 Модулирование функциональной активности Р-гр

Для того чтобы получить линию клеток с индуцированным Р-гр, необходимо было на первом этапе исследования определить рабочие концентрации рифампицина. Для этого был проведён анализ выживаемости клеток в среде с возрастающими концентрациями препарата (72 часа, МТТ-тест). Результаты исследования показали, что клетки линии СПЭВ чувствительны к действию антибиотика, и значения  $IC_{50}$  (гибнет 50% клеточной популяции) находятся в диапазоне  $190 \pm 10$  мкг/мл (рис. 5.1). При данной концентрации число клеток статистически значимо ниже на 50%, чем в контроле ( $p = 0,019$ ). Полученные результаты также подтверждаются методом подсчёта нежизнеспособных клеток, окрашенных 0,1% трипановым синим:  $IC_{50} = 200 \pm 9,7$  мкг/мл рифампицина ( $p = 0,019$ ).



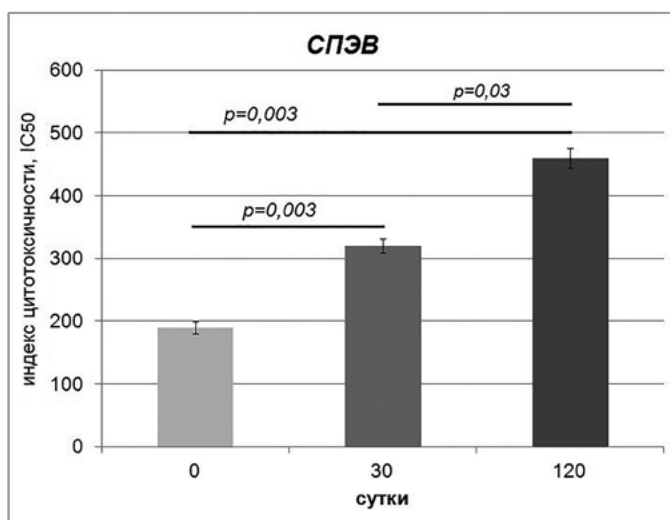
**Рис. 5.1.** Динамика выживаемости клеток линии СПЭВ при культивировании в возрастающих концентрациях рифампицина (72 часа). МТТ-тест и окрашивание клеток 0,1% трипановым синим. Гистограммы построены при сравнении с контрольными значениями жизнеспособности клеток, которые приняты за 100%. Приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение по результатам 5 экспериментов

Таким образом, были выявлены нетоксичные, субтоксичные и токсичные концентрации рифампицина, которые в дальнейшем использовались для модулирования функциональной активности Р-гр и выявления его воздействия на митохондрии. Для этого были решены следующие задачи:

- 1) получить резистентную к рифампицину линию клеток СПЭВ;
- 2) проанализировать в резистентных клетках ультраструктуру митохондрий методами цитохимического окрашивания и трансмиссионной электронной микроскопии;
- 3) оценить в резистентных сублиниях методом проточной цитометрии функциональную активность Р-гр по тесту на выброс флуоресцентного красителя родамина 123.

Для получения резистентной сублинии клеток СПЭВ были выбраны концентрации рифампицина в диапазоне от 10 до 100 мкг/мл. В течение 120 дней клетки культивировали в возрастающих концентрациях препарата, увеличивая её каждые 7–10 дней на 10 мкг/мл. В присутствии 100 мкг/мл клетки вели в течение 4 недель. Промежуточные значения индекса цитотоксичности  $IC_{50}$

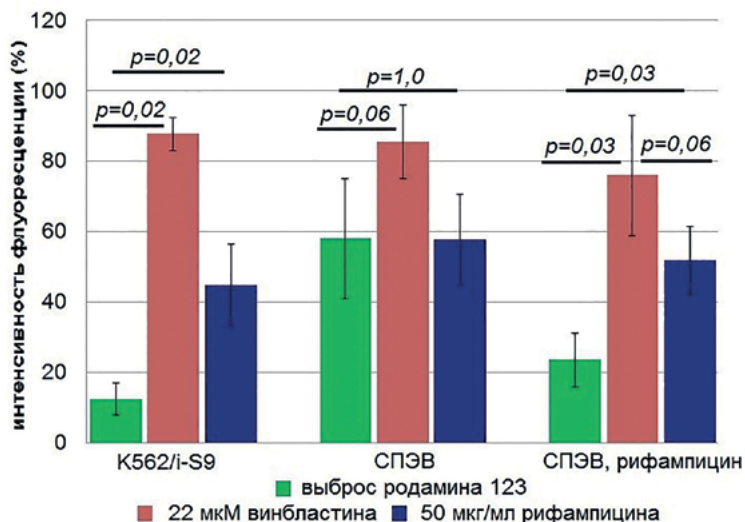
(гибнет 50% клеток), которые были получены через 30 дней культивирования эпителиальных клеток в присутствии рифампицина, возрастали в среднем в 1,68 раза: с  $190,0 \pm 10,2$  мкг/мл до  $320,0 \pm 11,4$  мкг/мл. Через 120 дней культивирования происходило увеличение  $IC_{50}$  в 2,9 раза, по сравнению с контролем, и  $IC_{50}$  достигал значений  $460,0 \pm 15,8$  мкг/мл (рис. 5.2). Данные статистически значимы. Таким образом, в клетках СПЭВ происходит формирование механизмов резистентности в результате их культивирования в присутствии возрастающих концентраций рифампицина – это выражается в возрастании значений индекса цитотоксичности препарата в 3 раза. Мы предположили, что механизм такой резистентности связан с возрастающей активностью Р-гр, который активно экспортирует рифампицин из цитоплазмы клеток во внеклеточную среду, не давая препарату связываться с мишенями внутри клеток.



**Рис. 5.2.** Изменение показателя  $IC_{50}$  при длительном (120 дней) культивировании клеток СПЭВ в присутствии возрастающих концентраций рифампицина от 10 до 100 мкг/мл. Приведены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение по результатам 4 экспериментов. МТТ-тест

Для оценки функциональной активности Р-гр использовали тест на выброс родамина 123 – флуоресцентного красителя и специфического субстрата для Р-гр. Если активность Р-гр возрастает под действием рифампицина, то выброс родамина 123 становится более выраженным, чем в исходных клетках.

Анализ методом проточной цитометрии показал, что в клетках резистентной к рифампицину сублинии СПЭВ интенсивность выброса родамина 123, по сравнению с исходными клетками, значительно возрастает. В этих клетках средние значения флуоресценции составляют  $23,5 \pm 7,7\%$ , что сравнимо с выбросом родамина 123 в клетках с высокой активностью Р-гр линии K562/i-S9 с трансфицированным геном *ABCB1* (использована в качестве положительного контроля) (рис.5.3). Винбластин – специфичный ингибитор Р-гр – блокирует выброс родамина 123, и интенсивность флуоресценции в его присутствии возрастает до  $76,5 \pm 15,7\%$ .

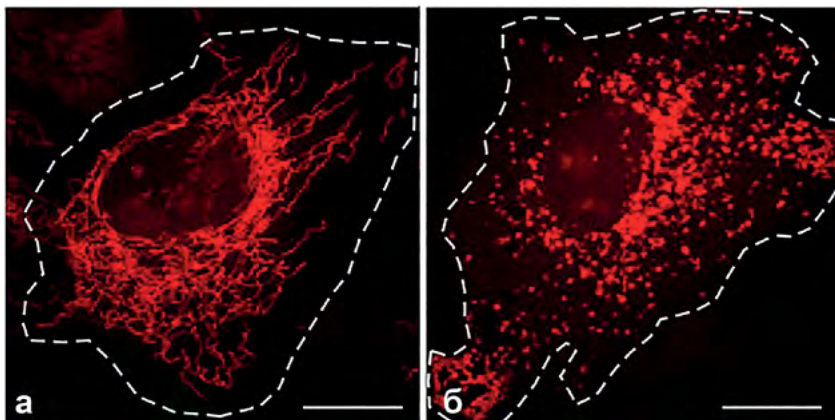


**Рис. 5.3.** Гистограмма выброса родамина 123 в клетках СПЭВ после длительной селекции в возрастающих концентрациях рифампицина. Вертикальная ось – (отношение средней флуоресценции на клетку при выбросе родамина 123 / средняя флуоресценция на клетку при накоплении родамина 123) x 100 (%)

Отдельно изучен выброс родамина 123 в присутствии 100 мкг/мл рифампицина – интенсивность флуоресценции статистически значимо возрастает до  $51,75 \pm 9,7\%$ . Таким образом, продемонстрировано, что рифампицин стимулирует возрастание активности выброса родамина 123 – специфического субстрата для Р-гр в клетках эпителия.

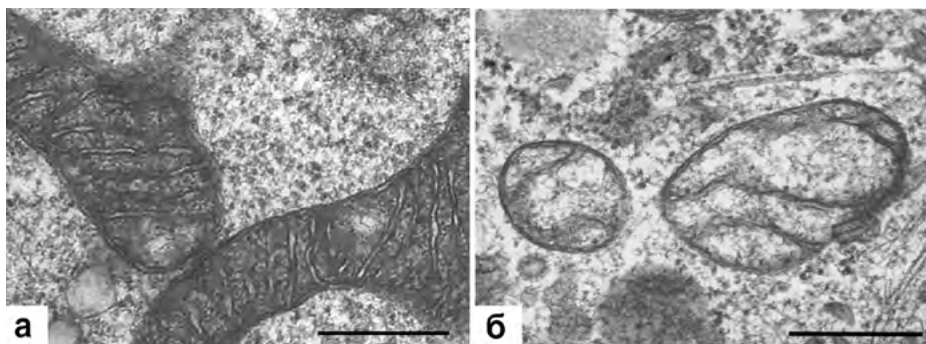
## 5.2 Митохондрии, тест для оценки активности Р-гр

Для оценки структурного и функционального состояния митохондрий в клеточной линии СПЭВ под воздействием токсических (200 мкг/мл) концентраций рифампицина проведено окрашивание клеток потенциал-зависимым красителем – Mitotracker Orange и ультраструктурное исследование митохондрий. Цитохимическое окрашивание Mitotracker Orange показало, что в контрольных клетках СПЭВ митохондрии выявляются в виде сети (рис. 5.4а). На периферии клеток сеть имеет рыхлое расположение и представлена в виде одиночных длинных митохондрий. При действии 200 мкг/мл рифампицина происходит реорганизация хондриома: единая сеть распадается на отдельные митохондрии округлой формы, которые распределяются дисперсно по цитоплазме (рис. 5.4 б), образуют скопления в окооядерном регионе, на периферии клеток и в отростках. В длинных тонких отростках отдельных клеток происходит формирование крупных скоплений митохондрий, что предполагает их дальнейшую экстрезию.



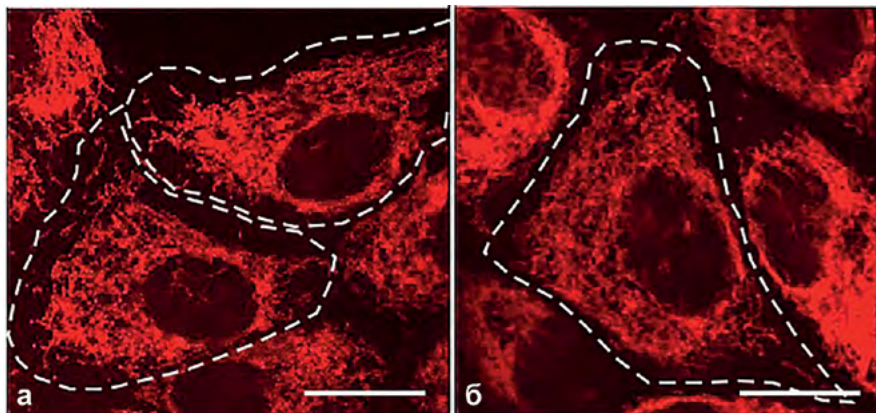
**Рис. 5.4.** Перестройка сети митохондрий в клетках культуры СПЭВ при воздействии рифампицином: а – контроль, общий вид, б – 200 мкг/мл рифампицина, 72 часа, фрагментация сети митохондрий, Mitotracer Orange. Контуры клеток нанесены по DIC-изображениям. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Масштабный отрезок 15 мкм.

Исследования методом просвечивающей электронной микроскопии были проведены с использованием оборудования ЦКП «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ им. М.В. Ломоносова (УНУ «Трёхмерная электронная микроскопия и спектроскопия») при участии зав. кафедрой клеточной биологии и гистологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, профессора, д.б.н. Галины Евгеньевны Онищенко. **Согласно электронно-микроскопическому анализу** в контрольных клетках митохондрии имеют вытянутую форму (рис. 5.5а). Внутри митохондрий выявляются кристы и матрикс с гомогенным содержанием. Кристы расположены параллельно друг другу и имеют плотную локализацию. После воздействия в течение 72 часов рифампицином в концентрации 200 мкг/мл в цитоплазме клеток появляются митохондрии округло-овальной или неправильной формы с признаками деструктивных изменений: митохондрии, в которых выявляются единичные кристы или кристы кольцевидной формы. Матрикс митохондрий светлый, однородной консистенции (рис. 5.5б).



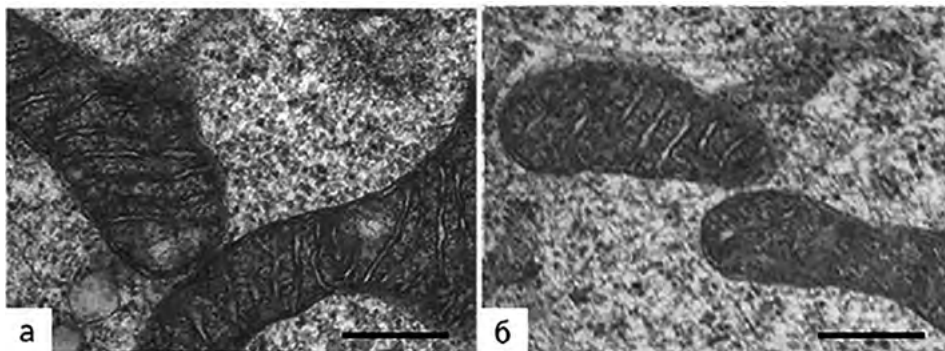
**Рис. 5.5.** Ультраструктура митохондрий в клетках культуры СПЭВ при воздействии рифампицина: а – контроль, б – рифампицин, 200 мкг/мл, 72 часа. Масштабные отрезки: а, б = 1 мкм; Трансмиссионная электронная микроскопия

В резистентных к рифампицину клетках СПЭВ при цитохимическом окрашивании Mitotracker Orange выявляется сеть, образованная нитчатыми митохондриями (рис. 5.6), не отличающимися от митохондрий в контроле.



**Рис. 5.6.** Митохондрии в клетках резистентной к рифампицину сублинии: а – контроль, б – резистентные клетки, Mitotracer Orange. Контуры клеток и ядра нанесены по DIC-изображениям. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Масштабный отрезок 15 мкм

**При ультраструктурном исследовании** в клетках резистентной сублинии СПЭВ митохондрии имеют идущие параллельно друг другу кристы и плотный матрикс с гомогенным содержанием (рис. 5.7).



**Рис. 5.7.** Ультраструктура митохондрий в резистентных к рифампицину клетках СПЭВ: а – контроль, б – резистентные клетки. Масштабный отрезок = 0,5 мкм. Трансмиссионная электронная микроскопия

Такие митохондрии по своей ультраструктуре не отличаются от митохондрий в контрольных клетках СПЭВ.

Рифампицин, потенциальной мишенью для которого в клетках млекопитающих является РНК-полимераза митохондрий, вызывает эффекты, схожие с действием митохондриальных ядов. Так, при обработке клеток ингибиторами или

разобшителями дыхательной цепи происходит фрагментация хондриома, которая предшествует деэнергизации митохондрий (Lyamzaev et al., 2008). Схожие эффекты наблюдаются при повреждении митохондриальной ДНК и при индукции окислительного стресса перекисью водорода и свидетельствуют о запуске программы апоптоза. На гепатоцитах мыши показано, что рифампицин снижает активность ферментов, отвечающих за удаление избытка АФК из митохондрий – каталазы, супероксиддисмутазы, глутатион-пероксидазы, – и вызывает перекисное окисление липидов (Chowdhury et al., 2006). Индукция окислительного стресса и запуск митохондриального пути апоптоза были показаны при совместном воздействии рифампицина и изониазида, которые также индуцировали некроз гепатоцитов и развитие фиброза в печени (Kalra et al., 2007; Bhagyaraj et al., 2016).

При развитии окислительного стресса основным источником АФК являются митохондрии. Избыток молекул АФК формируется при повреждении дыхательной цепи митохондрий, вызывает их фрагментацию и изменения в ультраструктуре митохондрий. Фрагментация митохондриальной сети необходима для элиминации отдельных повреждённых митохондрий, предотвращения повреждения всей «энергетической сети» и может предшествовать гибели клеток (Severina et al., 1988; Skulachev et al., 1999; Attri et al., 2000). Процесс элиминации повреждённых митохондрий сопровождается локализацией митохондрий около ядра, образованием крупных агрегатов и их последующим удалением из клетки механизмом, сходным с экзоцитозом. Применение митохондриально-направленных антиоксидантов на основе SkQ предотвращает данные процессы (Зоров и др., 2005).

### 5.3 Заключение к главе 5

Показано, что токсичные концентрации рифампицина вызывают фрагментацию митохондрий во всей популяции исходных эпителиальных клеток. В некоторых клетках регистрируется образование крупных агрегатов митохондрий вокруг ядра, а также присутствие таких агрегатов в отростках клеток. Эти изменения свидетельствуют о повреждении митохондриальной сети и попытке клеток «избавиться» от повреждённых митохондрий.

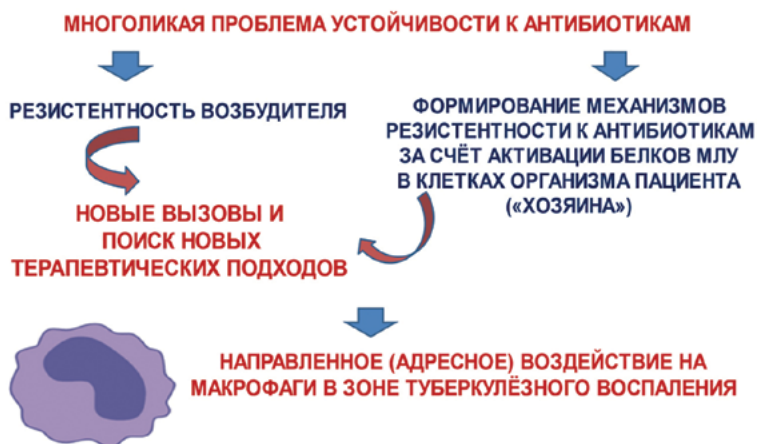
Митохондрии в резистентных к рифампицину эпителиальных клетках сохраняют свою структуру и функциональную активность. Резистентная к рифампицину сублиния клеток характеризуется активным выбросом родамина 123, который является маркёром белка МЛУ – Р-гр, и его активность значительно возрастает. Данные эксперименты показывают, что в эпителиальных клетках фактически развивается резистентность к высоким концентрациям рифампицина и этот процесс связан с функциональной активностью Р-гр. Митохондрии в таких клетках являются биомаркером резистентности.

**Эти результаты также демонстрируют, что в случае высокой активности Р-гр рифампицин не достигает внутриклеточных мишеней, что является чрезвычайно актуальным при внутриклеточной локализации *M. tuberculosis*.**

## ГЛАВА 6

### СРАВНИТЕЛЬНОЕ ВЛИЯНИЕ РИФАМПИЦИНА ИЛИ БЕДАКВИЛИНА НА БЕЛОК МЛУ Р-GP

При туберкулёзе лёгких макрофаги воспаления выполняют ключевые функции как клетки, формирующие защитную гранулёматозную реакцию, регулирующие характер воспалительного процесса и осуществляющие фагоцитоз *M. tuberculosis*. От их функциональной активности зависит успешность элиминации внутриклеточных форм *M. tuberculosis*. Изучение молекулярных и клеточных механизмов, через которые возможно терапевтически «улучшить» или изменить потенции макрофагов, в настоящее время рассматривается в качестве одной из перспективных стратегий повышения эффективности лечения пациентов с туберкулёзом лёгких. Это требует более глубокого понимания взаимодействия патогена с организмом «хозяина» и открытия новых мишеней для терапевтического воздействия в макрофагах (рис.6.1).



**Рис. 6.1.** Макрофаги как перспективная мишень для разработки новых терапевтических стратегий для химиотерапии туберкулёза

Рифампицин был открыт в 1964 году и до сих пор остаётся одним из важнейших препаратов для лечения туберкулёза. Бедаквилин является первым препаратом с новым механизмом действия на *M. tuberculosis*, одобренным для лечения туберкулёза за последние 50 лет (Worley and Estrada, 2014). Несмотря на то, что он используется в клинике только 10 лет, уже выявлены клинические изоляты *M. tuberculosis* с устойчивостью к данному антибиотику, в том числе и в России (Zimenkov et al., 2017). Так как рифампицин давно используется в терапии туберкулёза, его клеточные мишени изучены лучше, чем бедаквилина. Однако иммуномодулирующие характеристики этих препаратов ещё требуют своего изучения.

## 6.1 Активность P-gr в провоспалительных макрофагах человека в условиях действия противотуберкулёзных препаратов

### Оценка экспрессии гена *ABCB1* и активности P-gr при дифференцировке провоспалительных макрофагов

В связи с особой ролью макрофагов при развитии туберкулёзного воспаления является актуальным выявление активности белка МЛУ P-gr в провоспалительных (M1) макрофагах человека: активность P-gr может являться тем фактором, который будет снижать внутриклеточное накопление антибактериальных препаратов. Вопросы изменения активности *ABCB1*/P-gr как в процессе дифференцировки M1-макрофагов, так и при воздействии противотуберкулёзных препаратов являются актуальными и имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Важным является выбор адекватных экспериментальных подходов и моделей, отражающих изменение экспрессии гена *ABCB1* и функциональной активности P-gr. Реализация задач исследования осуществлялась на линиях клеток миелоцитарного происхождения с разными характеристиками активности P-gr (табл. 6.1).

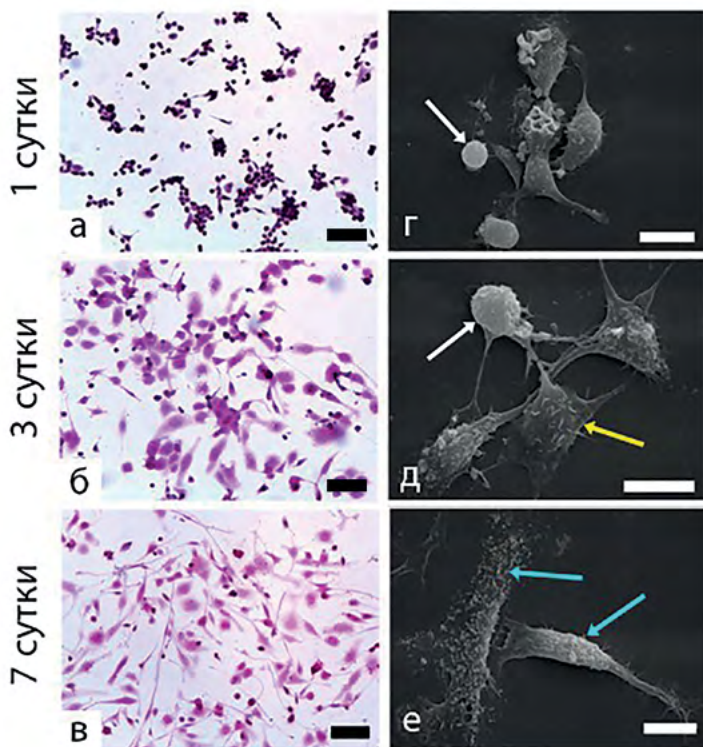
**Табл. 6.1.** Линии клеток миелоцитарного происхождения с разными характеристиками активности P-gr

Название линии	Характеристика уровня экспрессии <i>ABCB1</i> и функциональной активности P-gr
ТНР-1	промоноцитарная лейкемия, клетки с низким уровнем экспрессии <i>ABCB1</i>
ТНР-1	промоноцитарная лейкемия, индуцированные к макрофагальной дифференцировке клетки при помощи форболового эфира
К562	миелобластная лейкемия, ген <i>ABCB1</i> не экспрессирован в клетках, но его экспрессия индуцируется при фармакологическом воздействии
К562/i-S9	миелобластная лейкемия, клетки с трансфицированным геном <i>ABCB1</i> и высокой активностью P-gr

Клеточные линии с гиперэкспрессией P-gr являются традиционными модельными объектами для тестирования функциональной активности P-gr с целью скрининга возможных субстратов и ингибиторов данного транспортёра (Zahra et al., 2020).

В условиях *in vitro* классическим индуктором макрофагальной дифференцировки является форболовый эфир (100 нМ). Индукция дифференцировки сопровождается адгезией клеток к субстрату, распластыванием и приобретением макрофагального фенотипа. Выбор концентрации форболового эфира определён полученными данными, что при макрофагальной дифференцировке, индуцированной 100 нМ форболового эфира, регистрируется секреция провоспалительных цитокинов и хемокинов клетками ТНР-1, а также активация рецепторного фагоци-

тоза через Fc-рецепторы (Kurynina et al, 2018). Для изучения фенотипа макрофагов моноцитарные клетки человека линии THP-1 представляют собой удобную и широко используемую модельную систему (Лепеха и др., 2011; Mittar et al., 2011; Genin et al., 2015; Курынина и др., 2018). Морфологическая картина изменения макрофагов THP-1 в процессе дифференцировки представлена на рис. 6.2.



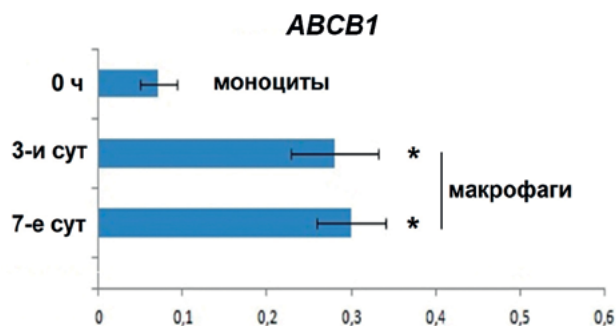
**Рис. 6.2.** Смена морфологических типов клеток при индуцируемой макрофагальной дифференцировке клеток THP-1: а, б, в – окрашивание гематоксилином и эозином; г, д, е – сканирующая электронная микроскопия. Стрелки указывают на разные морфологические типы клеток. Масштабный отрезок = 25 мкм

Появление разных морфологических типов макрофагов сопровождается изменениями в их фагоцитарной активности: на 3-и сутки дифференцировки клетки характеризуются реализацией конститутивного пути фагоцитоза и фагоцитоза через Fc-рецепторы, на 7-е сутки происходит активация рецепторного фагоцитоза через маннозный рецептор (ManR). Также наблюдаются изменения в секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов: на 3-и и 7-е сутки дифференцировки клетки секретируют в среду культивирования такие факторы, как MCP-1 (CCL2), IL-6 и IL-12, характерные для провоспалительного типа макрофагов (M1) и не секретируют противовоспалительный фактор IL-10 (Kurynina et al, 2018). Исходя из полученной характеристики макрофагов THP-1, оценка активности P-gr была проведена на 3-и и 7-е сутки их дифференцировки при помощи метода ОТ-ПЦР в реальном времени, оценки уровня иммуноцитохимического выявления белка P-gr

и определения фактора активности Р-gr ( $\text{FA}_{\text{P-gr}}$ ). Для исследования влияния рифамицина и бедаквилина на макрофаги как самостоятельно, так и при фармакологическом ингибировании Р-gr препараты добавляли совместно с форболовым эфиром, а также на 3-и и 5-е сутки дифференцировки. Анализировали уровень экспрессии генов, секреции цитокинов и фагоцитарную активность на 3-и и 7-е сутки макрофагальной дифференцировки.

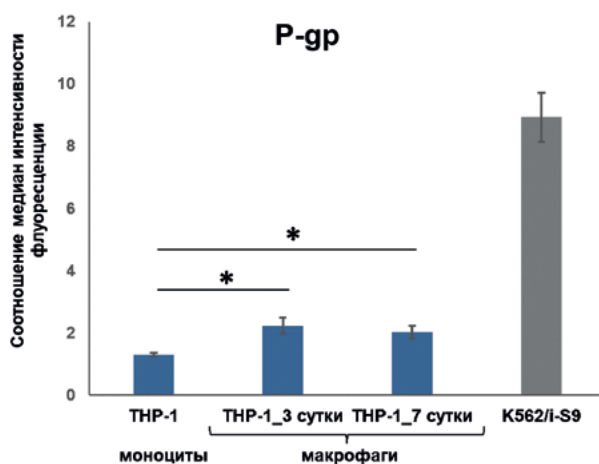
В исходных моноцитарных клетках ТНР-1 уровень экспрессии гена *ABCB1* определяется на уровне  $0,071 \pm 0,038$  у.е. и является достаточно низким по сравнению с уровнем экспрессии этого гена в клетках K562/i-S9 с трансфицированным геном *ABCB1*. Для этих клеток относительный уровень экспрессии равен  $38,0 \pm 0,009$  у.е. В процессе макрофагальной дифференцировки уровень экспрессии гена *ABCB1* возрастает до  $0,28 \pm 0,09$  у.е. на 3-и сутки и до  $0,30 \pm 0,07$  у.е. – на 7-е сутки дифференцировки: по сравнению с исходной суспензионной клеточной линией ТНР-1 уровень экспрессии гена увеличивается в 4 раза (рис. 6.3).

**Рис. 6.3.** График изменения экспрессии гена *ABCB1* в процессе макрофагальной дифференцировки. На графике представлены средние значения относительного уровня экспрессии гена в условных единицах (у.е.) по результатам 3-х экспериментов. Метод ОТ-ПЦР в реальном времени. \* – статистически значимые различия при  $p < 0,05$



Иммуноцитохимическое мечение антителами не выявило присутствие Р-gr на плазматической мембране суспензионных клеток ТНР-1: интенсивность флуоресценции меченых антителами клеток не отличалась от немеченных и составила  $1,3 \pm 0,05$  у.е. (рис. 6.4).

**Рис. 6.4.** Иммунохимическое маркирование Р-gr в клетках ТНР-1 при макрофагальной дифференцировке. Мышинные моноклональные антитела к Р-gr (17F9 и UIC2). По оси абсцисс – соотношение медиан интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных антителами к Р-gr к изотипическому контролю. В качестве позитивного контроля использованы клетки K562/i-S9. \* – статистически значимые результаты при  $p \leq 0,05$



При этом на 3-и сутки дифференцировки макрофагов ТНР-1 это соотношение составляло уже  $2,235 \pm 0,265$  у.е. и  $2,035 \pm 0,205$  у.е. на 7-е сутки дифференцировки: в сравнении с исходными суспензионными клетками ТНР-1 интенсивность флуоресценции статистически возростала в 1,8–1,9 раза. В качестве позитивного контроля были использованы клетки K562/i-S9 с трансфицированным геном *ABCBI*. Таким образом, увеличение экспрессии гена *ABCBI* в процессе дифференцировки приводит к выявлению P-гр на плазматической мембране провоспалительных макрофагов ТНР-1.

**Оценка функциональной активности P-гр** проводилась методом проточной цитометрии в соответствии с протоколом Multidrug Resistance Direct Dye Efflux Assay (Chemicon, [https://www.merckmillipore.com/RU/ru/product/MDR1-Efflux-Assay,MM\\_NF-ECM910](https://www.merckmillipore.com/RU/ru/product/MDR1-Efflux-Assay,MM_NF-ECM910)). Работа по цитометрическому анализу клеток поддержана программой развития МГУ им. М.В.Ломоносова (комплекс для клеточной сортировки на базе FACSAria SORP). Для выявления функциональной активности P-гр использовали его субстрат – флуоресцентный краситель родамин 123 (Sigma-Aldrich, США) и селективный ингибитор винбластин. Родамин 123 активно выбрасывается из окрашенных им клеток в присутствии P-гр, и его выброс блокируется при действии винбластина. Для оценки функциональной активности P-гр сравнивали медиану интенсивности флуоресценции родамина 123 в присутствии ингибитора (МИФ<sub>ингибитор</sub>) и в чистой культуральной среде (МИФ) по следующей формуле: фактор ингибирования активности P-гр (ФИА<sub>P-гр</sub>) =  $100 \times [(МИФ_{ингибитор} - МИФ) / МИФ_{ингибитор}]$ .

Функциональная активность P-гр проанализирована через 1, 3 и 7 суток после индукции дифференцировки. Анализ выброса родамина 123 показал его активацию в процессе прохождения клетками дифференцировки (табл. 6.2).

**Табл. 6.2.** Изменение фактора ингибирования активности P-гр в клетках ТНР-1 в процессе макрофагальной дифференцировки

Дифференцировка ТНР-1	ФИА P-гр	Средние значения ± стандартное отклонение
1-е сутки		34,12 ± 1,12
3-и сутки		74,88 ± 10,8
7-е сутки		75,34 ± 8,34
K562/i-S9		86 ± 7,6

$$ФИА_{P-гр} = ((МИФ^1 - МИФ^2) / МИФ^1) \times 100$$

*МИФ* – медиана интенсивности флуоресценции клеток

*МИФ<sup>1</sup>* – выброс родамина 123 в присутствии ингибитора

*МИФ<sup>2</sup>* – выброс родамина 123 в культуральной среде

Данный показатель свидетельствует об активности выброса накопленного клетками родамина 123, и его высокие значения (75,34 из 100) указывают на

интенсификацию этого процесса в макрофагах. Статистически значимое увеличение выброса родамина 123 происходит на 3-и и 7-е сутки макрофагальной дифференцировки по сравнению с 1-ми сутками ( $p = 0,003$ ). Между 3-ми и 7-ми сутками дифференцировки различия в показателях выброса родамина 123 не статистически значимые ( $p = 0,32$ ).

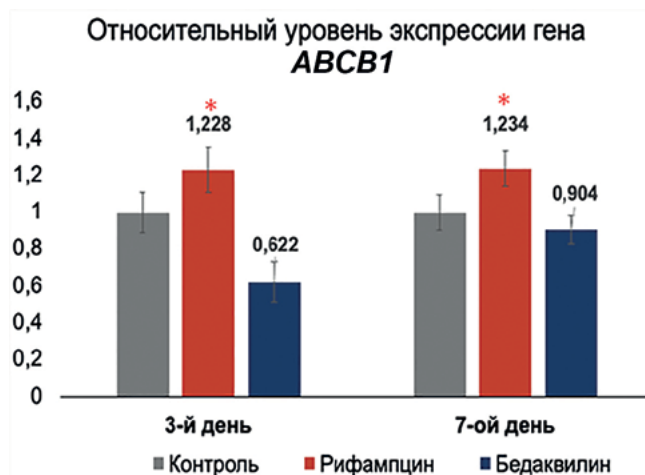
Область промотора гена *ABCBI* содержит множественные сайты связывания для различных факторов транскрипции, включая NF-κB. Несмотря на значительный прогресс в понимании макрофагальной дифференцировки, факторы транскрипции, регулирующие эти процессы, до сих пор остаются плохо изученными (Liu et al., 2023). Предполагается, что активация транскрипционного фактора NF-κB индуцирует экспрессию гена *ABCBI* (Pinto et al., 2021).

**Таким образом, в процессе макрофагальной дифференцировки происходит индукция экспрессии гена *ABCBI* и активности Р-гр. В этой связи актуальным является анализ влияния противотуберкулёзных препаратов и *M. tuberculosis* на экспрессию гена *ABCBI* и активность Р-гр в провоспалительных макрофагах человека.**

### **Влияние бедаквила и рифампицина на активность Р-гр**

В декабре 2012 г. ингибитор АТФ-синтазы бедаквилин был официально включен в схемы лечения туберкулёза лёгких с МЛУ возбудителем и является первым за последние 50 лет препаратом с новым механизмом действия на *M. tuberculosis*. Он воздействует на АТФ-синтазу, ингибируя выработку энергии микобактериальными клетками и оставляя их в состоянии энергетического голодания (Guo et al., 2021). Вопрос о прямом влиянии бедаквила на *ABCBI* и Р-гр ранее не изучался. В связи с этим была поставлена задача: выявить влияние терапевтической концентрации бедаквила в сравнении с рифампицином на активность *ABCBI*/Р-гр в провоспалительных макрофагах человека. При этом важным является анализ концентраций препаратов, которые соответствуют терапевтической: средняя концентрация рифампицина в крови и в области гранулем у пациентов с туберкулёзом лёгких составляет 10 мкг/мл (Al Sultan et al., 2014; Prideaux et al., 2015), а бедаквила – 5 мкг/мл (Andries et al., 2005).

Для того чтобы оценить влияние бедаквила и рифампицина на экспрессию гена *ABCBI*, препараты добавляли в среду культивирования при индукции макрофагальной дифференцировки. Анализ экспрессии гена проводился на 3-и и 7-е сутки дифференцировки, так как к этому сроку формируются макрофаги ТНР-1 с провоспалительным фенотипом. Уровень экспрессии гена *ABCBI* в контрольных клетках был принят за 1. После культивирования с рифампицином он составлял на 3-и сутки  $1,228 \pm 0,057$  у.е. и на 7-е сутки  $1,234 \pm 0,06$  у.е. против  $1 \pm 0,07$  у.е. в контрольных клетках (рис. 6.5).



**Рис. 6.5.** Влияние бедаквалина и рифампицина на экспрессию гена *ABCB1*. На графике представлены средние значения относительного уровня экспрессии гена в условных единицах (у.е.) по результатам 3-х экспериментов. Метод ОТ-ПЦР в реальном времени. \* – статистически значимые различия при  $p \leq 0,05$

Возрастание экспрессии гена *ABCB1* при действии рифампицина является статистически значимым. Таким образом, инкубация макрофагов в присутствии 10 мкг/мл рифампицина повышает уровень экспрессии гена *ABCB1*. Эти результаты согласуются с полученными нами данными, показавшими увеличение экспрессии гена *ABCB1* в макрофагах при действии рифампицина в течение 4 суток (Pavlova et al., 2022).

Данные по бедаквалину демонстрируют противоположный эффект: экспрессия гена *ABCB1* снижается при действии терапевтической концентрации бедаквалина или остаётся на прежнем уровне, соответствующем уровню экспрессии *ABCB1* в контрольных провоспалительных макрофагах ТНР-1 как на 3-и, так и на 7-е сутки воздействия. **Таким образом, продемонстрировано, что рифампцин и бедаквалин обладают противоположными эффектами на экспрессию гена *ABCB1*.**

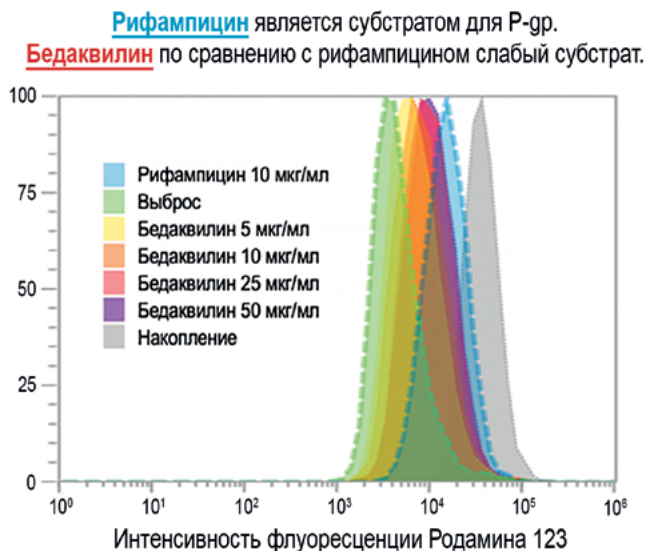
Одна из современных гипотез предполагает, что активация экспрессии гена *ABCB1* происходит из-за взаимодействия PXR (прегнановый X рецептор) с областью промотора гена *ABCB1*. PXR – ядерный рецептор, основной функцией которого является регуляция экспрессии генов белков, участвующих в детоксикации и выведении ксенобиотиков из организма. Для клеток эпителиального происхождения уже продемонстрирована ведущая роль PXR в стимулировании экспрессии гена *ABCB1* при действии рифампицина (Magnarin et al., 2004). На клеточной линии LS174T (рак толстой кишки человека, характеризуется высокой индукцией *ABCB1* под действием рифампицина) были выявлены возможные варианты такой активации: рифампцин действует на казеин-киназу 2, которая фосфорилирует белок теплового шока HSP80b. Это вызывает стабилизацию PXR, его перемещение в ядро, связывание с промотором *ABCB1*

и запуск его транскрипции (Kim et al., 2015). В свою очередь, ингибирование кетоконазолом PXR или его нокдаун подавляют индуцированную рифампицином экспрессию *ABCB1* в макрофагах (Bhagyaraj et al., 2018). Эти данные свидетельствуют в пользу гипотезы о ключевой роли PXR в индукции экспрессии гена *ABCB1* в макрофагах рифампицином.

Интересно, что рифампицин не индуцирует экспрессию гена *ABCB1* в моноцитах THP-1 даже при длительном (28 дней) культивировании клеток с антибиотиком (Павлова и др., 2022). Это может означать, что PXR при действии рифампицина способен только увеличивать экспрессию гена *ABCB1* в клетках с уже высоким уровнем его экспрессии, но не индуцировать её. Так как PXR опосредует возрастание экспрессии гена *ABCB1* при воздействии рифампицином, то от базовых уровней PXR в клетке зависит возможность такой модуляции экспрессии гена. Таким образом, различия в индукции экспрессии гена *ABCB1* между моноцитарными и макрофагальными клетками, которые нами были выявлены (рис. 6.3.–6.5), можно объяснить тем, что PXR модулирует экспрессию гена *ABCB1* только при её предварительной индукции другими транскрипционными факторами, такими, как, например, NF-κB.

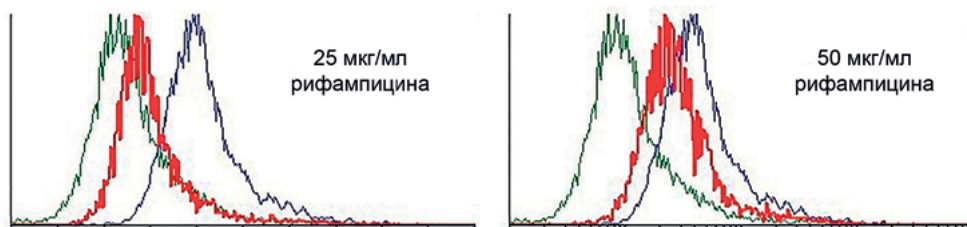
В отличие от рифампицина, бедаквилин не оказывает влияние на экспрессию *ABCB1* на поздних сроках макрофагальной дифференцировки, в то время как на 3-и сутки уровень экспрессии *ABCB1* под воздействием бедаквилина ниже, чем в контроле. Бедаквилин в терапевтической концентрации (5 мкг/мл) приводит к ядерной транслокации транскрипционного фактора EB (TFEB), одного из ключевых регуляторов биогенеза лизосом (Giraud-Gatineau et al., 2020) и ингибитора NF-κB (Song et al., 2019). Полученные нами результаты об изменении экспрессии гена *ABCB1* на ранних сроках макрофагальной дифференцировки под воздействием бедаквилина могут указывать на наличие «перекрестных помех» между TFEB и сигнальными путями, которые активируются при макрофагальной дифференцировке.

**Для ответа на вопрос: влияет ли бедаквилин на активность P-gr,** проанализирован выброс родамина 123 клетками K562/i-S9, характеризующимися его высокой активностью. Оценка выброса родамина 123 дана в присутствии как терапевтической концентрации препарата 5 мкг/мл, так и более высоких концентраций – 10, 25 и 50 мкг/мл. Бедаквилин в концентрациях 5 и 10 мкг/мл слабо влияет на интенсивность флуоресценции выброса родамина 123 (рис. 6.6, жёлтый и оранжевый графики). Концентрации препарата 25 и 50 мкг/мл снижают выброс родамина 123 более выражено (рис. 6.6, красный и фиолетовый графики), но в меньшей степени, чем рифампицин при действии терапевтической концентрации в 10 мкг/мл (рис. 6.6, синий график).



**Рис. 6.6.** Влияние бедаквилина на активность Р-gp (выброс родамина 123). По вертикальной оси – число событий, по горизонтальной оси – FL1, соответствует интенсивности флуоресценции родамина 123

Для сравнения на рис. 6.7 представлено влияние рифампицина в концентрациях 25–50 мкг/мл на выброс родамина 123: выброс родамина 123 значительно снижается.



**Рис. 6.7.** Влияние рифампицина на выброс родамина 123. Зелёная кривая – накопление родамина 123, тёмно-зелёная кривая – выброс родамина 123, синяя кривая – 22 мкМ винбластина (ингибитор Р-gp), красная кривая – 25 и 50 мкг/мл рифампицина.

FACSscan-анализ интенсивности флуоресценции. Проточная цитометрия.

По горизонтальной оси – FL1, соответствует интенсивности флуоресценции родамина 123. По вертикальной оси – число событий

Значения  $\text{ФИА}_{\text{P-gp}}$  под воздействием различных концентраций бедаквилина приведены в табл. 6.3.

**Табл. 6.3.** Значения фактора ингибирования активности P-gr в клетках K562/IS9 под воздействием различных концентраций бедаквилина

ФИА <sub>P-gr</sub> в клеточной линии K562/IS9					
Среда (выброс)	BDQ, 5 мкг/мл	BDQ, 10 мкг/мл	BDQ, 25 мкг/мл	BDQ, 50 мкг/мл	RIF, 10 мкг/мл
16,4 ± 9,25	18,26 ± 7,21	21,61 ± 4,98	26,81 ± 5,17	28,63 ± 6,13*	36,71 ± 3,41*

ФИА<sub>P-gr</sub> = средние значения фактора ингибирования активности P-gr ± стандартное отклонение по результатам 3-х экспериментов. BDQ – бедаквиллин, RIF – рифампицин. \* – статистически значимые различия (ANOVA) в сравнении с выбросом родамина 123 в отсутствие препаратов,  $p < 0,05$

При увеличении концентрации бедаквилина увеличивается интенсивность флуоресценции родамина 123, что свидетельствует об ингибирующем влиянии антибиотика на выброс родамина 123 и функциональную активность P-gr. При этом ингибирующий эффект проявляется только в высоких концентрациях, в 10 раз превышающих терапевтическую, по сравнению с рифампицином, где ингибирующий эффект проявлялся уже при «терапевтической» концентрации препарата. Это может свидетельствовать о том, что бедаквиллин обладает более слабой субстратной специфичностью к P-gr в сравнении с рифампицином, а влияние высоких концентраций бедаквилина на функциональную активность P-gr может быть обусловлено иными факторами. Например, показано, что в клетках человека мишенью для бедаквилина являются митохондрии (Guo et al, 2021).

Возможным объяснением обнаруженного эффекта бедаквилина может быть ингибирование выработки АТФ в макрофагах. Так как P-gr является АТФ-зависимым транспортером, на его функциональную активность оказывают влияние внутриклеточные уровни АТФ. Так как бедаквиллин ингибирует микобактериальную АТФ-синтазу, есть возможность того, что он может также оказывать эффект и на митохондриальную АТФ-синтазу в клетках человека. Обнаружено, что бедаквиллин в концентрации 25 мкг/мл нарушает митохондриальное дыхание, ингибируя цепь переноса электронов (Belosludtsev et al., 2019). Однако под воздействием терапевтических концентраций бедаквилина (5 мкг/мл) не было обнаружено каких-либо значимых изменений в митохондриальной функции в макрофагах человека, полученных из моноцитов периферической крови (Cahill et al., 2021; Giraud-Gatineau et al., 2020). Так как бедаквиллин проявляет гораздо более слабую субстратную специфичность к P-gr по сравнению с рифампицином, это может быть одним из факторов его эффективности при терапии лекарственно-устойчивых форм туберкулёза.

**Таким образом, бедаквиллин действует на выброс родамина 123 – специфичного субстрата для P-gr – только в достаточно высоких концентрациях. Это позволяет предположить, что бедаквиллин не является строго**

специфичным субстратом для P-gp. Полученные результаты в целом демонстрируют, что рифампицин и бедаквалин оказывают разное воздействие на экспрессию гена *ABCBI* и активность P-gp (рис. 6.8).

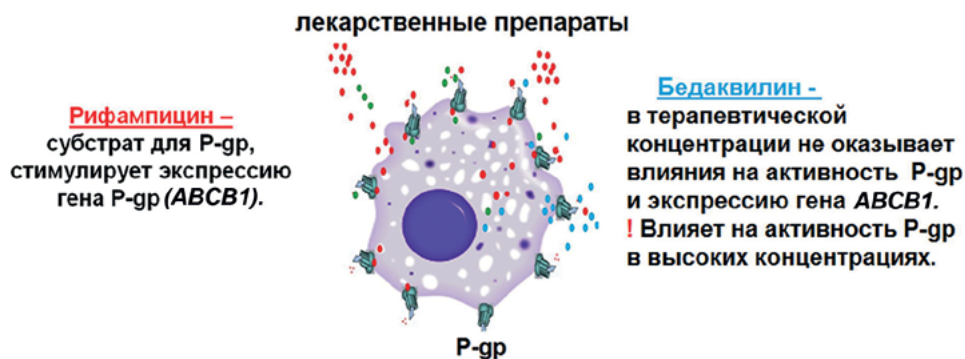


Рис. 6.8. Эффекты бедаквалина и рифампицина на активность P-gp/ *ABCBI*

Полученные данные демонстрируют преимущества бедаквалина по сравнению с рифампицином при высокой активности *ABCBI*/P-gp в провоспалительных макрофагах человека. Это может играть важную роль при действии на инфицированные макрофаги, способствовать эффективной элиминации патогена и требует своего дальнейшего анализа. При этом следует учитывать, что высокие концентрации бедаквалина могут взаимодействовать с P-gp, что требует специального исследования.

Так как рифампицин является субстратом для P-gp, то постоянная индукция экспрессии гена *ABCBI* и функциональной активности P-gp могут снижать накопление локальных концентраций рифампицина в макрофагах воспаления, тем самым способствуя выживаемости возбудителя. В настоящее время ряд исследователей предлагает разработать стратегию ингибирования функциональной активности P-gp в инфицированных макрофагах (Te Brake et al., 2018; Nasiri et al., 2017). Предполагается, что такая стратегия должна привести к повышению концентраций рифампицина в инфицированных *M. tuberculosis* макрофагах, и тем самым способствовать более эффективному внутриклеточному уничтожению патогена. Следует отметить, что в настоящее время не существует селективных ингибиторов P-gp, которые нашли бы свое широкое применение в клинике.

Учитывая ключевую роль макрофагов в развитии и заживлении туберкулёзного воспаления, необходима дальнейшая оценка *ABCBI*/P-gp в макрофагах воспаления, а также в клиническом материале пациентов с туберкулёзом лёгких. Эти данные позволят в дальнейшем сделать вывод о необходимости разработки и применения лекарственных стратегий, направленных на «обход» функциональной активности P-gp в инфицированных макрофагах и клетках барьерного эпителия, а также выборе более эффективных схем противотуберкулёзной терапии. Следует отметить, что до сих пор не разработаны селектив-

ные ингибиторы P-gp, которые действовали бы только на один тип клеток, что в настоящее время затрудняет использование стратегии ингибирования его активности и требует разработки стратегий, направленных на организм пациента с учётом уровня активности *ABCBI*/P-gp в клетках разных тканей и органов.

## 6.2 Влияние *M. tuberculosis* на экспрессию гена P-gp и фенотип макрофагов

Актуальным направлением является изучение разных аспектов реакции макрофагов воспаления на инфицирование возбудителем *M. tuberculosis*. Известно, что патогенные внутриклеточные микроорганизмы, в том числе *M. tuberculosis*, увеличивают уровень экспрессии *ABCBI*. И, как правило, не влияют на экспрессию генов *ABCC1* и *ABCG2* и активность MRP1 и BCRP как в эпителиальных, так и в иммунных клетках (Gollapudi et al., 1994; Sigal et al., 2015; Yagdiran et al., 2016), в том числе в макрофагах человека, полученных из моноцитов периферической крови (Wu et al., 2019). Данный эффект *M. tuberculosis* на экспрессию *ABCBI* выявляют на поздних стадиях инфицирования (через 72 часа).

В нашем исследовании инфицирование макрофагов проводили в сертифицированном виварии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза» (под руководством к.б.н. И.В. Бочаровой). *M. tuberculosis* (вирулентный штамм H37Rv) добавляли к клеткам на 5-е сутки макрофагальной дифференцировки из расчета 10 млн микобактерий на 1 млн клеток. Далее проводили микробиологический анализ для контроля инфицирования и исследование экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени через 24 часа после инфицирования. Мы не использовали более поздние сроки для эксперимента в связи с возрастанием доли гибнущих макрофагов.

Анализ экспрессии генов показал, что в результате инфицирования макрофаги усиливают провоспалительный ответ, который выражается в увеличении по сравнению с контрольными клетками экспрессии генов провоспалительных цитокинов IL1 $\beta$  (в  $2,03 \pm 0,22$  раза), IL6 (в  $4,4 \pm 0,78$  раза), а также TNF- $\alpha$  (в  $2,97 \pm 0,28$  раза). При этом снижается уровень экспрессии противовоспалительных генов: цитокина TGF $\beta$  в  $0,83 \pm 0,02$  раза и трансглутаминазы 2 (TGM2, маркер M2 макрофагов) в  $0,66 \pm 0,04$  раза, в то время как экспрессия IL-10 достоверно не изменяется. (рис. 6.9).

Неожиданным оказалось значительное снижение (в среднем в 1,5–3 раза) экспрессии генов фагоцитарных рецепторов к маннозе (CD206, CD209) и IgG (CD64). Эти данные ставят вопрос о механизмах этого процесса и его влиянии на фагоцитарные свойства макрофагов и эффективность элиминации ими *M. tuberculosis*.

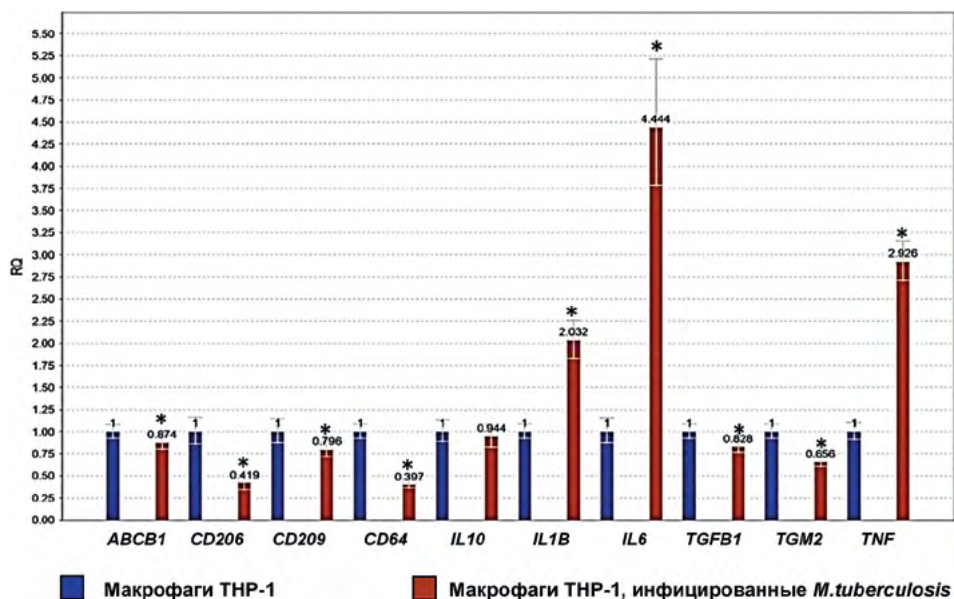


Рис. 6.9. Экспрессия генов в макрофагах THP-1 через 24 часа после инфицирования вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. На графике указаны средние значения относительного уровня экспрессии гена (RQ) по результатам 3-х повторов  $\pm$  стандартное отклонение. За единицу принят уровень экспрессии генов в контрольных макрофагах THP-1

Полученные нами результаты соотносятся с данными других исследователей, которыми было показано не только увеличение уровня экспрессии генов, но и секреции провоспалительных цитокинов после инфицирования макрофагов микобактериями туберкулёза (Pu et al., 2021; Sharma et al., 2003). Мы не обнаружили изменения уровня экспрессии гена *IL10*, и это совпадает с данными, что секреция IL-10 увеличивается только через 48 часов после инфицирования макрофагов (Sharma et al., 2003).

Таким образом, на ранних сроках инфицирования в макрофагах повышается экспрессия генов провоспалительных цитокинов и снижается экспрессия генов противовоспалительных маркеров и гена *ABCB1*.

### 6.3 Инкапсулированная лекарственная форма рифампицина и её влияние на P-gr

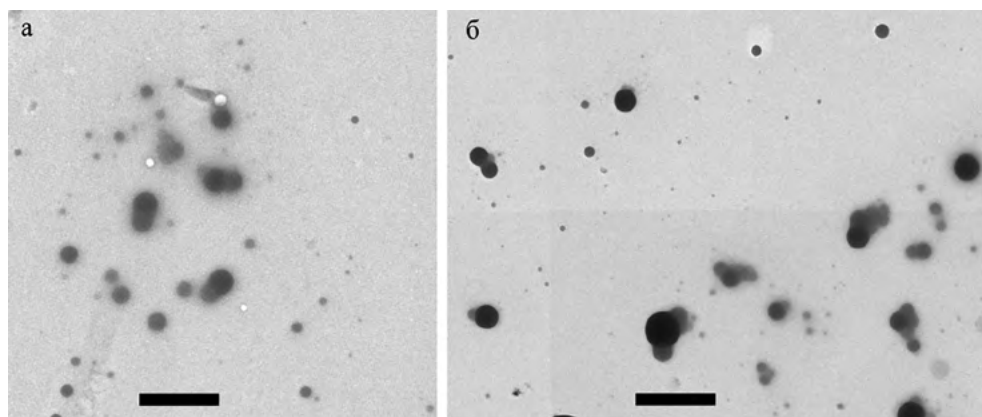
Недостатком современных противотуберкулёзных препаратов является их токсичность, быстрая деградация и низкая биодоступность, что стимулирует поиск и разработку новых лекарственных форм. Прогресс в области адресной доставки лекарств позволил осуществить инкапсулирование соединений внутрь биodeградируемых частиц. Полимеры на основе молочной кислоты представляют собой биоразлагаемые соединения, используемые для создания инкапсулированной формы лекарственных препаратов (Mao et al., 2012a, 2012b; Sasaki et al., 2015). В макрофагах такие нанокapsулы преимущественно локализуются в фаголизосомах, где полимер деградирует, высво-

бождая заключённое в нём соединение (Kalluru et al., 2013). По сравнению с традиционной формой рифампицина его инкапсулированная форма может давать 20-кратное и более увеличение накопления препарата в макрофагах (Anisimova et al., 2000; Hirota et al., 2010). В условиях *in vivo* такой подход позволяет повысить эффективность воздействия препарата в результате создания его высоких концентраций в органе-мишени.

Другим значимым свойством инкапсулированных соединений является их способность обойти функциональную активность белков-транспортёров, осуществляющих активный выброс лекарственных соединений из цитоплазмы во внеклеточную среду. Такой подход показал свою эффективность при заболеваниях нервной системы, когда необходимо осуществить доставку лекарственных соединений в головной мозг, преодолев гематоэнцефалический барьер (Chen et al., 2014; Pérez-Herrero and Fernández-Medarde, 2015; Kim et al., 2016; Федосеева и др., 2017).

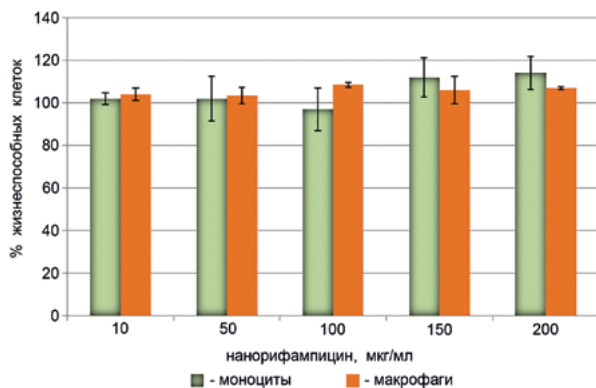
На основе наночастиц полимера молочной кислоты (PLLA) создан новый вариант рифампицина в виде его инкапсулированной формы (разработан в НИИ Молекулярной и персонализированной медицины (патент RU2418585C1) и любезно предоставлен проф. Г.Г. Барсегяном, как и наночастицы полимера молочной кислоты). Согласно данным разработчика, средний размер наночастиц, измеренный с использованием метода автокорреляционной спектроскопии, равен  $378 \pm 84$  нм. Следует отметить, что PLLA разрешён к медицинскому применению, что является его серьёзным преимуществом перед другими формами биodeградируемых полимеров (Vasir et al., 2007).

В препарате доля рифампицина составляет  $\sim 8\text{--}10\%$  и соотносится с 10 мкг/мл традиционной формы рифампицина. Как показал электронно-микроскопический анализ, размер наночастиц находится в диапазоне 50–400 нм. В лиофилизате препарата, как заявлено производителем, размер частиц составляет 300–371 нм, но в суспензии выявляются частицы и меньшего размера в достаточно большом количестве (рис. 6.10).

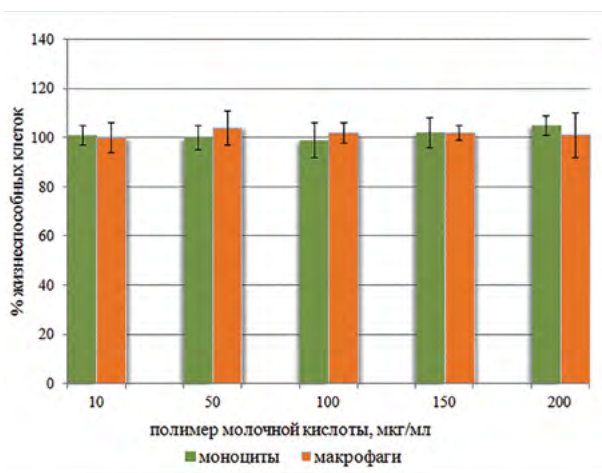


**Рис. 6.10.** Наночастицы полимера молочной кислоты (а) и нанорифампицина (б). Трансмиссионная электронная микроскопия. Масштабный отрезок 1 мкм

**Сравнение влияния нанорифампицина на жизнеспособность моноцитов и макрофагов ТНР-1** проведено методом МТТ-теста. Для сравнения выживаемости клеток использованы возрастающие концентрации препарата в диапазоне от 10 до 200 мкг/мл при сроке культивирования 96 часов. К макрофагам препарат был добавлен на 3-и сутки дифференцировки. Полученные данные демонстрируют, что нанорифампицин не снижает процент жизнеспособных клеток как в культуре моноцитов, так и макрофагов ТНР-1 даже при максимальной экспериментальной концентрации 200 мкг/мл (рис. 6.11). Сам полимер молочной кислоты также не является токсичным для клеток ТНР-1 (рис. 6.12).



**Рис. 6.11.** Влияние нанорифампицина на жизнеспособность моноцитов и макрофагов ТНР-1. Данные представлены как % жизнеспособных клеток относительно контрольных клеток, выживаемость которых принята за 100%. Среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение по результатам 3-х экспериментов. МТТ-тест

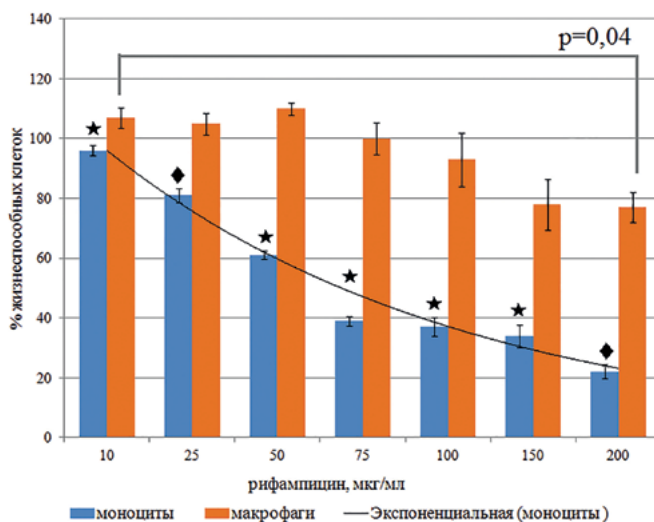


**Рис. 6.12.** Влияние полимера молочной кислоты на жизнеспособность моноцитов и макрофагов ТНР-1. Данные представлены как % жизнеспособных клеток относительно контрольных клеток, выживаемость которых принята за 100%. Среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение по результатам 3-х экспериментов. МТТ-тест

Концентрация в среде культивирования нанорифампицина 200 мкг/мл соотносится с 17–20 мкг/мл традиционной формы рифампицина. Эти два препарата имеют разные пути попадания в макрофаги (рифампицин – диффузией, нанорифампицин – эндоцитозом/фагоцитозом) и, как результат этого, разную интенсивность накопления в цитоплазме клеток. Градиент внутриклеточной концентрации традиционного рифампицина может превышать его внеклеточную концентрацию в 4-5 раз (Burman, 1997), тогда как для нанорифампицина этот показатель уже в 20 раз выше (Anisimova et al., 2000; Hirota et al., 2010).

В связи с этим для определения выживаемости моноцитарно-макрофагальных клеток ТНР-1 в присутствии традиционной формы рифампицина мы использовали его концентрации в диапазоне от 10 до 200 мкг/мл.

Рифампицин в концентрации 25 мкг/мл вызывает гибель уже 20% клеточной популяции моноцитов ТНР-1 и также не влияет на процент жизнеспособных макрофагов ТНР-1. Концентрации рифампицина в диапазоне 50–75 мкг/мл обладают уже токсичным эффектом для моноцитарных клеток (вызывают гибель 40–60% клеток) и не влияют на процент выживаемости макрофагов (рис. 6.13).



**Рис. 6.13.** Влияние рифампицина на жизнеспособность моноцитов и макрофагов ТНР-1. Данные представлены как % жизнеспособных клеток относительно контрольных клеток, выживаемость которых принята за 100%. Среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение по результатам 4-х экспериментов. МТТ-тест.  $\blacklozenge$   $p = 0,02$ ;  $\star$   $p = 0,03$  – статистически значимое снижение выживаемости моноцитов ТНР-1 при действии рифампицина в сравнении с макрофагами ТНР-1

Только наиболее высокие экспериментальные концентрации рифампицина 150–200 мкг/мл вызывают гибель 20–23% макрофагов ТНР-1. Это означает, что макрофаги ТНР-1 являются более устойчивыми к действию рифампицина по сравнению с моноцитарными клетками.

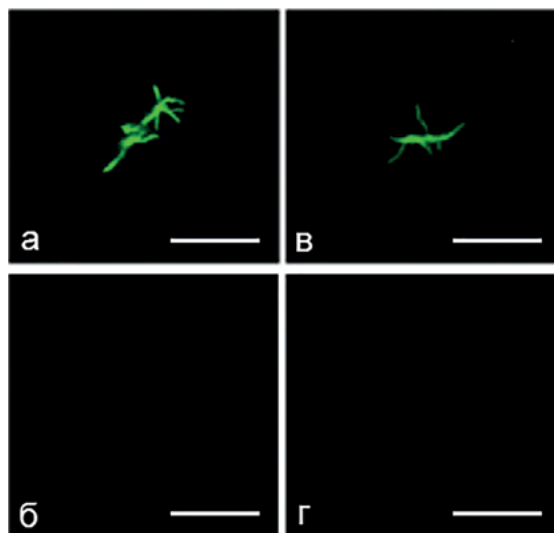
Таким образом, нами выявлены следующие эффекты: (1) полимер молочной кислоты и нанорифампицин не влияют на жизнеспособность моноцитов/макрофагов ТНР-1; (2) традиционный рифампицин является значительно более токсичным для моноцитов ТНР-1, чем для макрофагов ТНР-1. Хорошая выживаемость клеток млекопитающих в присутствии полимера молочной кислоты ранее была продемонстрирована с применением МТТ-теста разными авторами (Basarkar et al., 2007; Mattu et al., 2013; Moorkoth et al., 2014). Мы предполагаем, что в нашем дизайне эксперимента лучшая выживаемость макрофагов ТНР-1 по сравнению с моноцитами ТНР-1 связана с возрастающей экспрессией гена *MDR1* и возрастанием активности P-gr в процессе макрофагальной дифференцировки. Так как рифам-

пицин является субстратом для Р-gp, то это способствует лучшей выживаемости клеток в присутствии возрастающих концентраций рифампицина.

**Потенциальной мишенью для нанорифампицина являются внутриклеточные формы микобактерий туберкулёза.** В фагосомах и фаголизосомах полимер деградирует, в результате чего высвобождается рифампицин в свободной форме (Lee et al., 2016). Так как возбудитель персистирует в фагосомах, то идеология создания нанопрепарата предполагает его более эффективное воздействие на внутриклеточные формы микобактерий туберкулёза за счёт адресной доставки и создания высокой внутриклеточной концентрации рифампицина.

*Mycobacterium bovis BCG*, экспрессирующий зелёный флуоресцентный белок GFP (*M. bovis BCG-GFP*, любезно предоставлены д.м.н., проф. В.В. Еремеевым, ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза»). Микобактерии штамма *M. bovis BCG-GFP* были введены в среду культивирования макрофагов ТНР-1 на 24 часа на 3-й день макрофагальной дифференцировки, после чего была произведена смена среды культивирования, и добавлена свежая культуральная среда, содержащая 100 мкг/мл нанорифампицина (на 96 часов). Для выявления мёртвых микобактерий *M. bovis BCG-GFP* использовался краситель иодид пропидия.

Проведённое исследование показало, что **внеклеточные** формы *M. bovis BCG-GFP* не окрашиваются иодидом пропидия как в контроле, так и после воздействия 100 мкг/мл нанорифампицина, что свидетельствует о сохранении их жизнеспособности в присутствии нанопрепарата (рис. 6.14). Так как для высвобождения рифампицина необходима внутриклеточная деградация полимера, то полученный результат указывает на отсутствие его деградации и свободного рифампицина в среде культивирования.

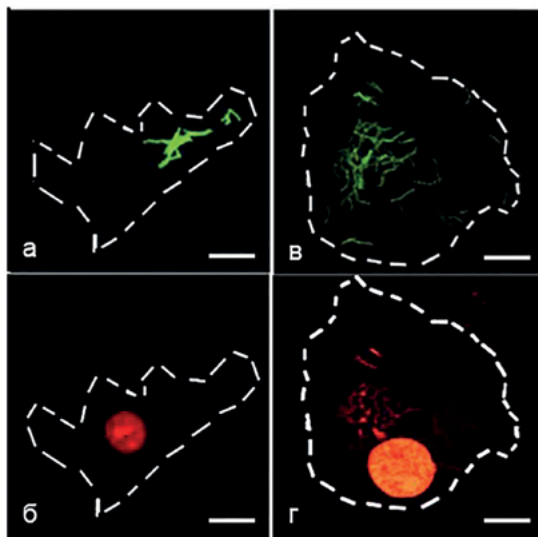


**Рис. 6.14.** Влияния нанорифампицина на жизнеспособность внеклеточных колоний *M. bovis BCG-GFP*. Зелёный – *M. bovis BCG-GFP*. Верхний ряд – выявление внеклеточных форм *M. bovis BCG-GFP*; нижний ряд – окрашивание *M. bovis BCG-GFP* иодидом пропидия (красный цвет красителя не регистрируется). а, б – контроль, в, г – 100 мкг/мл нанорифампицина. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Масштабный отрезок = 20 мкм.

Для окрашивания **внутриклеточных** форм *M. bovis BCG-GFP* макрофаги были предварительно проинкубированы в культуральной среде, содержащей 1% детергента Triton X-100 в течение 1 минуты. В контрольных инфицированных макрофагах *M. bovis BCG-GFP* не окрашиваются йодидом пропидия

(окрашиваются только ядра), что свидетельствует о жизнеспособности *M. bovis BCG-GFP* (рис. 6.15а,б). После культивирования в присутствии 100 мкг/мл нанорифампицина в макрофагах иодидом пропидия окрашиваются ядра клеток и внутриклеточные *M. bovis BCG-GFP*, что свидетельствует об индукции их гибели под действием нанорифампицина (рис. 6.15в,г). Таким образом, через 96 часов в цитоплазме инфицированных макрофагов ТНР-1 создаётся концентрация свободного рифампицина, вызывающая гибель внутриклеточных *M. bovis BCG-GFP* (бактерицидная концентрация рифампицина, вызывающая гибель микобактерий данного штамма, составляет 0,002–1 мкг/мл).

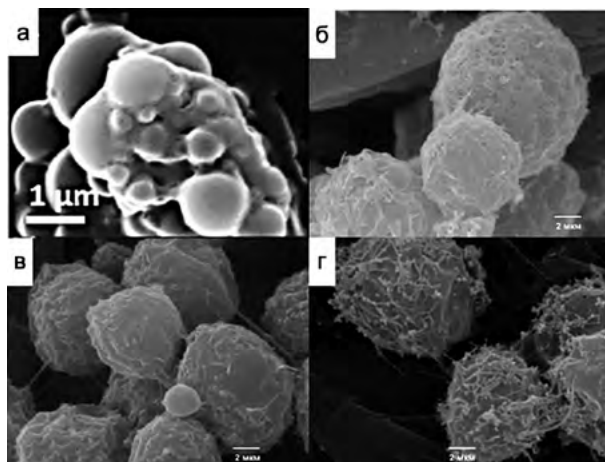
**Рис. 6.15.** Влияние нанорифампицина на жизнеспособность *M. bovis BCG-GFP*, выявляемых внутри инфицированных макрофагов ТНР-1. Зелёный – *M. bovis BCG-GFP*. Красный – окрашивание иодидом пропидия ядер клеток ТНР-1 и непосредственно *M. bovis BCG-GFP*. а, б – внутриклеточные *M. bovis BCG-GFP*; в, г – внутриклеточные формы *M. bovis BCG-GFP*, окрашенные иодидом пропидия. Пунктирной линией показана граница клеток на основе DIC-изображения. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Масштабный отрезок = 10 мкм.



В инфицированных *M. bovis BCG* или *M. tuberculosis* макрофагах (в культуре) подавляющее большинство бактерий данного вида выявляются в «ранних» фагосомах с pH = 6 (Kallura et al., 2013). В макрофагах процесс слияния фагосом, содержащих *M. bovis BCG* или *M. tuberculosis* с лизосомой не происходит вследствие ингибирования этого процесса факторами, продуцируемыми возбудителем (Armstrong and Hart, 1975). В культуре инфицированных макрофагов только небольшая часть внутриклеточных *M. tuberculosis* выявляется в поздних фагосомах или фаголизосомах (Jorgao et al., 2008). Несмотря на то, что полимер молочной кислоты достаточно давно используется в медицинских целях, механизмы поступления в клетки наночастиц на его основе ещё не до конца изучены. В клетках эпителия лёгкого линии A549 показано, что наночастицы меньше 100 нм поступают в цитоплазму через клатрин-опосредованный эндоцитоз (если плазматическая мембрана богата фосфолипидами), либо через области липидных рафтов (высокое содержание сфинголипидов и холестерина) (da Luz et al., 2017). Механизм поступления более крупных по своим размерам частиц до конца не изучен. Так, для препарата на основе сополимера молочной кислоты с гликолевой, в состав которого включён рифампицин, показано, что в макрофаги красного костного мозга и мышечные макрофаги линии Raw 264.7 они поступают фагоцитозом и в дальнейшем выявляются в фаголизосомах (Kallura et al., 2013).

Изучение влияния нанорифампицина (100 мкг/мл) на активность **P-gr** было проведено на клетках K562/i-S9 с высоким уровнем **P-gr**.

Согласно данным электронной микроскопии при инкубации с нанопрепаратом клеток K562/i-S9 происходит появление многочисленных складок, что свидетельствует об активации клеточной поверхности, вызванной фагоцитозом/эндоцитозом наночастиц (рис. 6.16).



**Рис. 6.16.** Появление многочисленных складок на поверхности клеток при действии нанорифампицина а – нанорифампицин. б–г – клетки K562/i-S9 после инкубации с препаратами: б – контроль без препаратов, в – 10 мкг/мл рифампицина, г – 100 мкг/мл нанорифампицина. Сканирующая электронная микроскопия

Через 30 минут после окрашивания родамином 123 интенсивность флуоресценции в клетках линии K562/i-S9 снижалась в среднем до  $12,5 \pm 8,13$  (%) от уровня накопления красителя, что свидетельствует об интенсивности его выброса во внеклеточную среду и высокой функциональной активности **P-gr**.

Значения факторов ингибирования функциональной активности **P-gr** под воздействием рифампицина в «терапевтической концентрации 10 мкг/мл», нанорифампицина (RIF-PLLA) в концентрации 100 мкг/мл (содержит приблизительно 10 мкг/мл рифампицина) и PLLA (100 мкг/мл) приведены в табл. 6.4.

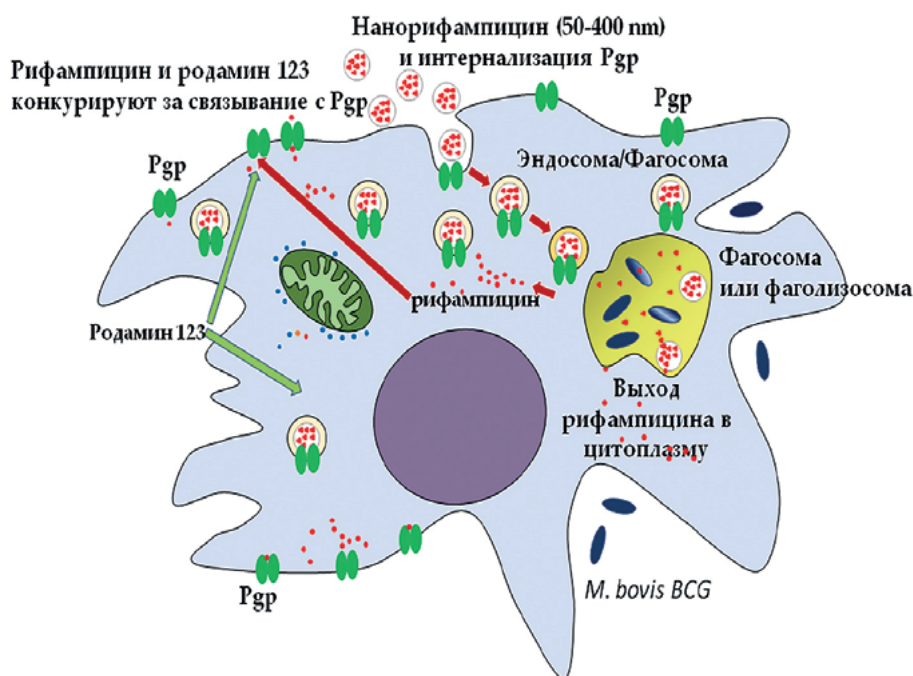
**Табл. 6.4.** Значения фактора ингибирования активности **P-gr** в клетках K562/i-S9 под воздействием различных препаратов

<b>ФИА<sub>P-gr</sub> в клеточной линии K562/i-S9</b>			
Выброс родамина 123	PLLA, 100 мкг/мл	RIF-PLLA, 100 мкг/мл	RIF, 10 мкг/мл
12,5 ± 8,13	31,95 ± 12,31*	68,15 ± 12,31*	39,71 ± 9,17*

$ФИА_{P-gr}$  = средние значения фактора ингибирования активности **P-gr** ± стандартное отклонение по результатам 3-х экспериментов. RIF-PLLA – рифампицин, инкапсулированный в полимер молочной кислоты, PLLA – наночастицы полимера молочной кислоты. RIF – рифампицин. \* – статистически значимые различия (ANOVA) в сравнении с выбросом родамина 123 в отсутствие препаратов,  $p < 0,05$

Все исследованные препараты оказывали статистически значимое ингибирование функциональной активности *P-gr*. При этом  $\text{ФИА}_{P-gr}$  под воздействием нанорифампицина почти в 2 раза выше, чем  $\text{ФИА}_{P-gr}$  при действии только PLLA. Этот результат указывает на то, что инкапсулированная форма рифампицина оказывает ингибирующий эффект на функциональную активность *P-gr*.

Мы предполагаем, что данный эффект является следствием интернализации *P-gr* в результате активации эндоцитоза полимером молочной кислоты. Наночастицы размером меньше 100 нм более интенсивно поглощаются клеткой по сравнению с более крупными частицами. Путь от образования ранней эндосомы/фагосомы до её слияния с лизосомой занимает от 15 до 60 мин (Naas, 2007). При этом создание инкапсулированной формы рифампицина не исключает в дальнейшем накопление свободного рифампицина в цитозоле и его взаимодействие с *P-gr*. Предполагаемая схема такого взаимодействия приведена на рис. 6.17.



**Рис. 6.17.** Схема интернализации *P-gr* нанорифампицином и взаимодействия рифампицина с *P-gr*

Свойства полимерных частиц, предназначенных для применения при заболеваниях лёгких, зависят от их химического состава, размера, формы, заряда (Lim et al., 2016). На данный момент мы не можем исключить гипотезу, что рифампицин в составе полимера молочной кислоты придаёт новые свойства частицам, которые также оказывают влияние на активность *P-gr*.

Таким образом, наши данные демонстрируют, что нанорифампицин: 1) эффективен против *M. bovis BCG* в инфицированных макрофагах; 2) не обладает выраженной токсичностью для моноцитарных и макрофагальных клеток; 3) снижает функциональную активность Р-гр. За счёт того, что при использовании наночастиц полимера происходит активация процесса фагоцитоза и снижение функциональной активности Р-гр, представляется перспективной и актуальной разработка инкапсулированных противотуберкулёзных препаратов – активаторов фагоцитоза.

## 6.4 Сравнительная характеристика иммуномодулирующих свойств рифампицина и бедаквилина

### Иммуномодулирующие эффекты рифампицина

Противовоспалительные свойства рифампицина были открыты еще в 70-х годах прошлого века (Păunescu, 1970; Litwin et al., 1974). Первоначально эти свойства связывали с его способностью активировать глюкокортикостероидные рецепторы и сравнивали эффект рифампицина с кортикостероидами. Дальнейшие исследования опровергли влияние рифампицина на рецепторы к глюкокортикоидам (Jaffuel et al., 1999; Herg et al., 2000). Но было показано, что рифампицин ингибирует активированную липополисахаридами экспрессию iNOS, TNF- $\alpha$  и IL1 $\beta$ , а также снижает уровень оксида азота (NO) и простагландина E2 в микроглиальных клетках BV2 и подавляет активацию NF-kB (Bi et al., 2011).

В стимулированных липополисахаридами периферических мононуклеарах человека рифампицин вызывает достоверное снижение выработки TNF- $\alpha$  и IL1 $\beta$ , повышение секреции IL6 и IL10. Авторы сделали вывод, что рифампицин может модифицировать острую стадию воспаления, нарушая цитокиновый каскад в мононуклеарах периферической крови (Ziglam et al., 2004). В целом, согласно различным исследованиям можно заключить, что рифампицин вызывает снижение уровней TNF- $\alpha$  и iNOS и повышение уровней IL10 в периферических мононуклеарах и макрофагах.

На эпителиальные клетки A549 антибиотик оказывает противоположный эффект: увеличивает экспрессию iNOS и продукцию NO (Yuhás et al., 2009). Инкубация клеток с цитокиновой смесью (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  и IFN $\gamma$ ) индуцировала экспрессию iNOS, а добавление рифампицина в терапевтической концентрации 10 мкг/мл увеличивало уровень экспрессии iNOS в 1,9 раза. Также при обработке рифампицином наблюдалась повышенная деградация ингибирующей субъединицы NF-kB. Авторы делают вывод, что увеличение уровней активации NF-kB и индуцирование NO способствуют терапевтическим эффектам рифампицина. Аналогичные результаты были получены теми же авторами на гепатоцитах HepG2: рифампицин вызывал увеличение продукции NO и повышение уровня IL8 (Yuhás et al., 2011). Кроме того, рифампицин в концентрации 10 мкг/мл сам по себе вызывал повышение

уровня IL8 в гепатоцитах, без дополнительной стимуляции смесью таких цитокинов, как TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  и IFN $\gamma$ .

Известно, что RIF является лигандом для ядерного рецептора PXR (Geick et al., 2001). Под его воздействием PXR транслоцируется в ядро, где запускает экспрессию целевых генов. В то же время, есть ряд исследований, которые демонстрируют, что активация NF-kB ингибирует функцию PXR, в то время как ингибирование NF-kB увеличивает активность PXR (Zhou et al., 2006) существуют «перекрестные помехи». Стоит отметить, что в печени и кишечнике уровень экспрессии PXR существенно выше по сравнению с эпителием лёгких или клетками крови. Возможно, в них PXR будет оказывать менее выраженный ингибирующий эффект на NF-kB и иммуносупрессивные эффекты.

На сегодняшний день существует несколько гипотез, которые описывают возможные механизмы ингибирования NF-kB. Один из механизмов связан с ингибированием пути NF-kB через PXR, активированным рифампицином (Li et al., 2017), или через увеличение экспрессии ингибирующей субъединицы I $\kappa$ B (Mohandas and Vairappan, 2017).

Важным механизмом патогенеза *M. tuberculosis* является их способность ингибировать определённые пути гибели инфицированных макрофагов: гибель клеток по пути апоптоза способствует уничтожению патогена, в то время как гибель инфицированных клеток по пути некроза может способствовать выживанию и дальнейшему распространению возбудителя (Butler et al., 2012).

Ранее (см. главу 5) уже было продемонстрировано, что мишенью для рифампицина в эпителиальных клетках являются митохондрии (Ерохина и др., 2013). Высокие концентрации препарата (IC<sub>50</sub>, 200 мкг/мл) вызывают дисфункцию в них, которая приводит к развитию окислительного стресса и, как следствие – инициации апоптоза по митохондриальному пути. Аналогичные эффекты показаны и в экспериментах *in vivo*, где под воздействием рифампицина в клетках печени мыши возникал окислительный стресс, увеличивалась проницаемость митохондриальных мембран и запускался апоптоз в гепатоцитах (Chowdhury et al., 2006).

В то же время, есть ряд работ, в которых, напротив, выявлено цитопротекторное свойство рифампицина и его способность ингибировать апоптоз. Так, на клеточной линии Jurkat (Т-лимфоциты) было показано, что рифампицин уменьшал экспрессию Bax и CD95L и повышал экспрессию Bcl-2, ингибируя индуцированный апоптоз в данных клетках (Yerramasetti et al., 2002). Авторы объяснили данный эффект активацией рифампицином глюкокортикостероидных рецепторов, хотя уже в данной работе было высказано предположение, что эффект антибиотика может быть обусловлен воздействием на сигнальный путь NF-kB. Очевидно, что в разных типах клеток эффекты рифампицина различаются.

### **Иммуномодулирующие эффекты бедаквилина**

Бедаквилин (торговое название Sirturo<sup>®</sup>, BDQ) является новым противотуберкулёзным препаратом, принадлежащим к группе диарилхинолинов, ингибирующим активность микобактериальной АТФ-синтазы. Этот препарат явля-

ется первым препаратом, одобренным для лечения МЛУ ТБ в 2013 году, после одобрения рифампицина в 1971 году в США (Khoshnood et al., 2021). В 2021 году в журнале Nature вышла статья с подробным анализом механизмов воздействия препарата на АТФ-синтазу (Guo et al, 2021).

Масштабный анализ экспрессии генов (транскриптомный анализ) под воздействием антибиотика в макрофагах, полученных из моноцитов периферической крови, показал, что в них активируются гены, связанные с биогенезом лизосом/фаголизосом, активностью гидролаз, а также с гомеостазом липидов (Giraud-Gatineau et al., 2020). Для исключения возможных различий в профиле экспрессии генов между инфицированными и неинфицированными макрофагами, обусловленных разной бактериальной нагрузкой, авторы работы создали вирулентный штамм *M. tuberculosis*, устойчивый к бедаквилину. В инфицированных этим штаммом макрофагах профили экспрессии генов под воздействием бедаквилаина изменялись в большей степени по сравнению с неинфицированными макрофагами: дополнительно изменялась экспрессия генов, связанная со сборкой промежуточного компартмента эндоплазматического ретикулума – аппарата Гольджи (ERGIC), мембранными рафтами и процессами метаболизма клеточных белков. Эти данные показали, что бедаквалин оказывает выраженное воздействие на макрофаги, полученные из периферической крови. Авторы делают заключение, что препарат вызывает значительное метаболическое перепрограммирование как инфицированных, так и неинфицированных макрофагов. Активация лизосомного компартмента под воздействием бедаквилаина превращает макрофаги в «эффективных убийц бактерий», даже если сам препарат не оказывает прямого воздействия на бактериальные клетки (Giraud-Gatineau et al., 2020).

В другой работе изучали влияние бедаквилаина на антимикробную активность и секрецию цитокинов в макрофагах ТНР-1, инфицированных как устойчивым к бедаквилину, так и чувствительным штаммом *M. tuberculosis* (Lyu et al., 2022). Было показано, что бедаквалин оказывает иммуномодулирующее действие на макрофаги, индуцируя высокий уровень секреции провоспалительных цитокинов IL12 и TNF- $\alpha$ , и снижая секрецию противовоспалительного цитокина IL10. Так как IL10 может ингибировать лизосомно-фагосомное слияние и аутофагию (Park et al., 2011), а провоспалительные цитокины IL12 и TNF- $\alpha$ , напротив, активируют IFN $\gamma$ , который способствует активации фагоцитоза в макрофагах (Khan et al., 2016), то иммуномодулирующий эффект бедаквилаина может способствовать более эффективной элиминации внутриклеточных микобактерий туберкулёза в независимости от непосредственной бактерицидной активности антибиотика. В то же время, авторы данной работы сообщили об увеличении уровня секреции IL6 в макрофагах под воздействием бедаквилаина, но только при их инфицировании вирулентным штаммом.

Так как бедаквалин ингибирует микобактериальную АТФ-синтазу, то нельзя исключить, что он оказывает эффект и на митохондриальную АТФ-синтазу в

клетках млекопитающих. Известно, что метаболическое состояние макрофагов определяет их реакцию на инфицирование *M. tuberculosis*. Так, например, было показано, что курение сигарет вызывает метаболические нарушения в макрофагах и приводит к более низким внутриклеточным концентрациям АТФ. Это нарушает иммунный ответ макрофагов на инфицирование и способствует персистенции в них возбудителя (Gleeson et al., 2018).

Противотуберкулёзные препараты могут изменять митохондриальную функцию в макрофагах. Для рифампицина было показано, что в высоких концентрациях он влияет на митохондрии, вызывая активную продукцию АФК и приводит к высвобождению цитохрома С (Ерохина и др., 2013). Обнаружено, что бедаквилин в концентрации 50 мкМ нарушает митохондриальное дыхание в гепатоцитах крыс, ингибируя цепь переноса электронов, а также ингибирует продукцию  $H_2O_2$  в диапазоне концентраций от 10 мкМ до 50 мкМ (Belosludtsev et al., 2019). Однако под воздействием терапевтических концентраций бедаквилина (5 или 10 мкг/мл) не было выявлено каких-либо значимых изменений в митохондриальной функции в макрофагах человека, полученных из моноцитов периферической крови (Cahill et al., 2021).

**Таким образом, рифампицин и бедаквилин – два наиболее востребованных в лечении туберкулёза лёгких препарата, – имеют мишени не только в возбудителе, но и в макрофагах и эпителиальных клетках, оказывая влияние на разные клеточные компартменты и сигнальные пути, которые влияют на эффективность препаратов.**

### **Влияние рифампицина и бедаквилина на секрецию цитокинов в макрофагах на разных сроках их дифференцировки**

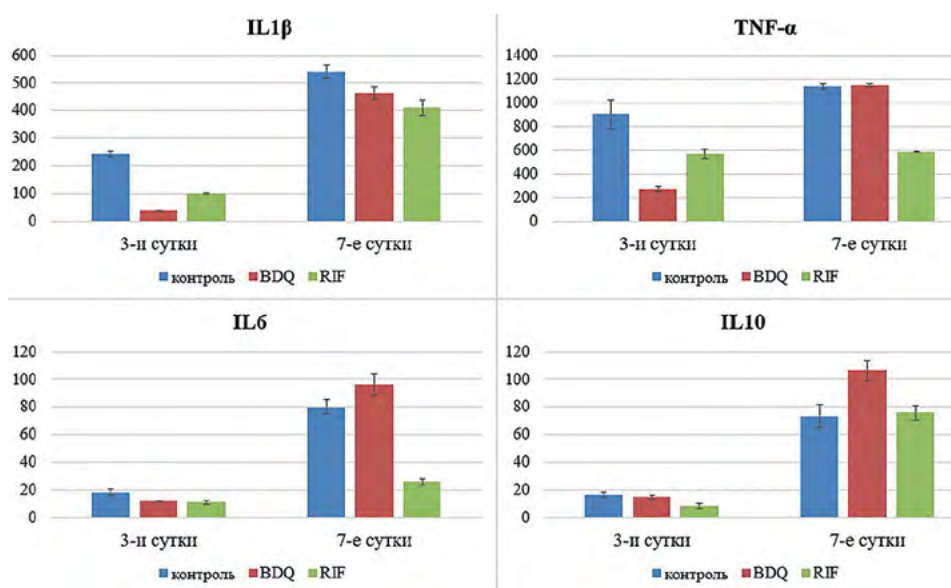
Для количественного определения уровня секретируемых цитокинов IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL10 и IL6 в культуральной среде использовали соответствующие реактивы из набора MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Millipore, каталожный номер HCYTOMAG-60K). Анализ был выполнен в соответствии с инструкциями производителя на мультиплексном флуоресцентном анализаторе MagPix (Luminex). Данные представлены как средние значения концентраций по результатам 3 биологических повторов  $\pm$  стандартное отклонение. Также для каждого образца было выполнено 3 технических повтора, для биологического повтора использовали усреднённое значение 3 технических повторов.

В работе использовали «терапевтические» концентрации бедаквилина (BDQ, MedChemExpress, США) – 5 мкг/мл и рифампицина (RIF, Sigma-Aldrich, США) – 10 мкг/мл, что соответствует максимальным концентрациям, которые определяются в плазме крови больных туберкулёзом при приёме 400 мкг бедаквилина или 600 мкг рифампицина (Alsultan and Peloquin, 2014; Andries et al., 2005). Препараты добавляли при индукции макрофагальной дифференцировки совместно с форболовым эфиром, а также на 3-и и 5-е сутки дифференцировки макрофагов ТНР-1. Влияние препаратов изучали на ранние (3-и сутки) и поздние (7-е сутки) сроки макрофагальной дифференцировки.

Анализ секреции цитокинов показал, что на 7-е сутки дифференцировки макрофагов, по сравнению с 3-ми, увеличивается уровень секреции IL1 $\beta$  в 2 раза (с 243,23  $\pm$  11,30 до 540,33  $\pm$  26,34 пг/мл), более чем в 4 раза – IL6 (18,3  $\pm$  1,99 до 80,1  $\pm$  7,01 пг/мл) и IL10 (с 16,29  $\pm$  1,95 до 73,5  $\pm$  7,87 пг/мл), а уровень секреции TNF- $\alpha$  возрастает незначительно: с 902,15  $\pm$  123,94 до 1137,98  $\pm$  93,24 пг/мл (рис. 6.18). **В целом дифференцировка макрофагов сопровождается возрастанием продукции цитокинов.**

При воздействии препаратов обнаружено, что рифампицин на 3-и сутки дифференцировки макрофагов снижает секрецию провоспалительных цитокинов: IL1 $\beta$  в 2,4 раза (с 243,23  $\pm$  11,30 до 101,13  $\pm$  3,4 пг/мл), IL6 в 1,6 раза (с 18,3  $\pm$  1,99 до 11,31  $\pm$  1,5 пг/мл), IL10 в 2 раза (с 16,29  $\pm$  1,95 до 8,2  $\pm$  1,87 пг/мл) и TNF- $\alpha$  в 1,6 раза (с 902,15  $\pm$  123,94 до 566,10  $\pm$  42,0 пг/мл) (рис. 6.18).

На 7-е сутки дифференцировки эта тенденция сохраняется: секреция IL1 $\beta$  снижается незначительно – в 1,3 раза (с 540,33  $\pm$  26,34 до 411  $\pm$  11,30 пг/мл), IL6 – в 3 раза (с 80,1  $\pm$  7,01 до 26,0  $\pm$  2,5 пг/мл), TNF- $\alpha$  – в 1,95 раза (с 1137,98  $\pm$  93,24 до 584,10  $\pm$  22,0 пг/мл). Секреция IL10 (75,8  $\pm$  5,7 пг/мл) сравнялась с уровнем в контроле (73,5  $\pm$  7,87 пг/мл). **Таким образом, рифампицин снижает секрецию провоспалительных цитокинов на всех сроках дифференцировки макрофагов.**



**Рис. 6.18.** Влияние рифампицина и бедаквилина на секрецию цитокинов в макрофагах ТНР-1 на разных сроках их дифференцировки  
\* – статистически значимые различия по сравнению с контролем

При воздействии бедаквилина уровень секреции провоспалительных цитокинов на ранних сроках макрофагальной дифференцировки снижается: IL1 $\beta$  в 6,6 раза (с 243  $\pm$  11 до 37  $\pm$  3,8 пг/мл), IL6 в 1,55 раза (с 18,3  $\pm$  2 до 11,8  $\pm$  2,7 пг/мл), TNF- $\alpha$  в 3,3 раза (с 902  $\pm$  124 до 273  $\pm$  24 пг/мл). И не изменяется уровень секреции IL10 (рис. 6.18).

На поздних сроках дифференцировки секреция IL1 $\beta$  регистрируется на уровне немного ниже, чем в контроле, но статистически значимо (463 и 540 пг/мл соответственно); секреция TNF- $\alpha$  не отличается от контроля (1148 пг/мл), а секреция IL6 незначительно, но статистически значимо превышает контрольные значения (96 пг/мл). Уровень IL10 также возрастает в 1,44 раза (с  $73,5 \pm 7,87$  до  $106,3 \pm 7,4$  пг/мл). На 7-е сутки макрофагальной дифференцировки под воздействием бедаквилина снижается его эффект по ингибированию секреции провоспалительных цитокинов и обнаруживается стимулирование уровней секреции IL6 и IL10.

**Таким образом, бедаквилин оказывает различные эффекты на макрофаги человека в зависимости от стадии их дифференцировки: только на ранних сроках бедаквилин выражено снижает секрецию провоспалительных цитокинов и частично сохраняет этот противовоспалительный эффект на поздних сроках.**

## 6.5 Заключение к главе 6

Рифампицин связывается с P-gr и является его субстратом. Если исходить из предположения, что P-gr транспортирует цитокины из цитоплазмы макрофагов во внеклеточную среду, то рифампицин будет конкурировать с цитокинами за сайты связывания на P-gr, тем самым снижая их экспорт. Этот эффект при действии рифампицина наиболее выражено проявляется для провоспалительных цитокинов IL6, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ .

Действие бедаквилина на секрецию цитокинов зависит от стадии дифференцировки макрофагов. Так как прямые эффекты бедаквилина на функциональную активность P-gr до сих пор не изучены, то можно предположить, что эффекты бедаквилина в большей степени связаны не с воздействием на P-gr, а с другими мишенями в макрофагах.

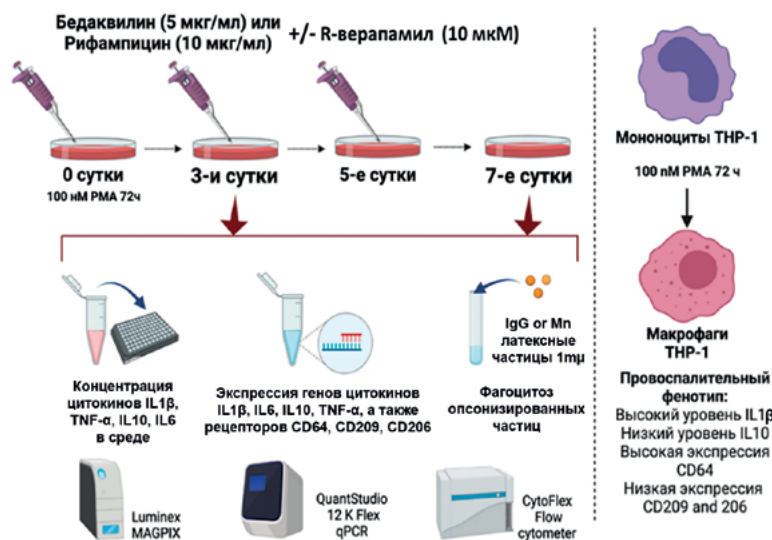
## ГЛАВА 7

### ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ БЕЛКА МЛУ P-GR В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА

Верапамил – лекарственный препарат, который используется в клинической практике для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Его основной фармакологический эффект заключается в блокировании кальциевых каналов. В данной работе в качестве фармакологического ингибитора функциональной активности P-gr мы использовали R-верапамил, который обладает более низким сродством к связыванию с кальциевыми каналами L-типа, но при этом эффективно ингибирует функцию P-gr (Busse et al., 2006).

Для ингибирования функциональной активности P-gr использовали R-верапамил гидрохлорид (VER, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10 мкМ. Экспериментальная концентрация верапамила была выбрана из диапазона от 2,5–5–10–25–50 мкМ. Анализ данных выброса родамина 123 в макрофагах ТНР-1 на 7-е сутки дифференцировки выявил, что увеличение концентрации верапамила свыше 10 мкМ не приводит к дальнейшему увеличению интенсивности флуоресценции в клетках и полностью ингибирует функциональную активность P-gr в макрофагах.

Для исследования влияния рифампицина и бедаквилина на макрофаги как самостоятельно, так и при фармакологическом ингибировании P-gr, препараты добавляли при индукции макрофагальной дифференцировки совместно с форболовым эфиром, а также на 3-и и 5-е сутки дифференцировки. Влияние препаратов изучали на ранние (3-и сутки) и поздние (7-е сутки) сроки макрофагальной дифференцировки. Верапамил добавляли как совместно с противотуберкулёзными препаратами, так и самостоятельно. Анализировали уровень экспрессии генов, секреции цитокинов и фагоцитарную активность на 3-и и 7-е сутки макрофагальной дифференцировки. Дизайн экспериментов представлен на рис. 7.1.



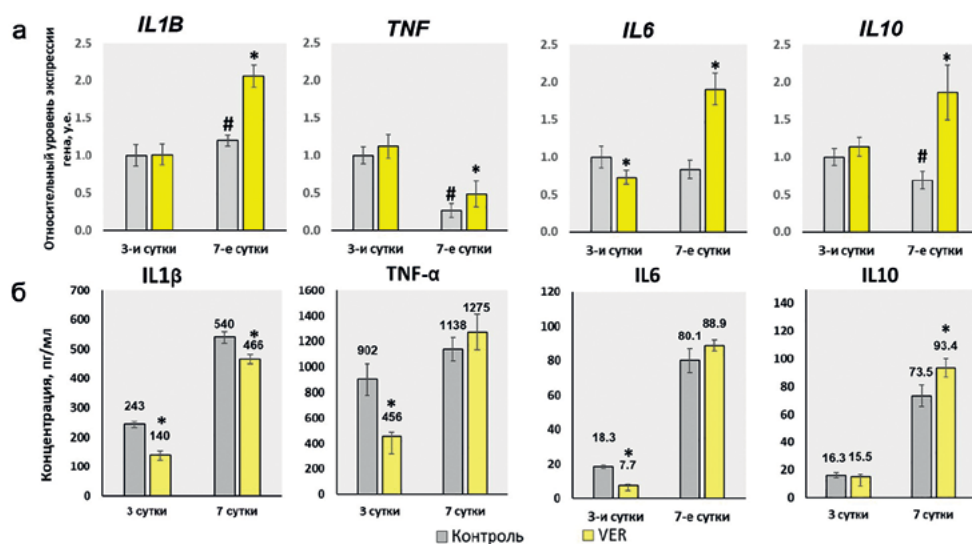
**Рис. 7.1.** Дизайн эксперимента по исследованию влияния рифампицина и бедаквилина на макрофаги ТНР-1, в том числе и при фармакологическом ингибировании P-gr R-верапамилом.

Ранее в ряде исследований было продемонстрировано, что ингибирование Р-гр снижает секрецию некоторых цитокинов из клеток. Это позволило предположить, что Р-гр или сам является транспортёром цитокинов, или влияет на механизмы транспорта цитокинов из иммунных клеток (Drach et al., 1996; Pawlik et al., 2005). В связи с чем мы сравнили профили экспрессии генов провоспалительных цитокинов  $TNF-\alpha$ ,  $IL1\beta$ ,  $IL6$  и противовоспалительного  $IL10$  и уровни их секреции при воздействии верапамила на разных сроках макрофагальной дифференцировки (ранние сроки или 3-и сутки и поздние сроки, или 7-е сутки).

### 7.1 Влияние Р-гр на экспрессию генов и секрецию цитокинов

Анализ экспрессии генов показал, что в процессе макрофагальной дифференцировки на 7-е сутки по сравнению с 3-ми происходит незначительное возрастание уровня экспрессии гена  $IL1B$  (в 1,2 раза), небольшое снижение экспрессии гена  $IL10$  (в 1,45), в 3,8 раза – снижение уровня экспрессии  $TNF$  и  $IL6$  остаётся на прежнем уровне (рис. 7.2а).

Анализ секреции цитокинов показал, что на 7-е сутки дифференцировки по сравнению с 3-ми увеличивается уровень секреции  $IL1\beta$  в 2 раза (с  $243,23 \pm 11,30$  до  $540,33 \pm 26,34$  пг/мл), более чем в 4 раза –  $IL6$  (с  $18,3 \pm 1,99$  до  $80,1 \pm 7,01$  пг/мл) и  $IL10$  (с  $16,29 \pm 1,95$  до  $73,5 \pm 7,87$  пг/мл), а уровень секреции  $TNF-\alpha$  возрастает незначительно: с  $902,15 \pm 123,94$  до  $1137,98 \pm 93,24$  пг/мл (рис. 7.2б).



**Рис. 7.2.** Влияние фармакологического ингибирования Р-гр на экспрессию генов (а) и секрецию цитокинов (б) в макрофагах THP-1 в процессе дифференцировки (3-и и 7-е сутки). Относительный уровень экспрессии генов цитокинов в контроле на 3-и сутки макрофагальной дифференцировки принят за 1. VER – верапамил. \* – статистически значимые различия по сравнению с контролем на соответствующие сутки макрофагальной дифференцировки, # – статистически значимые различия между экспрессией генов в процессе макрофагальной дифференцировки между 3-ми и 7-ми сутками ( $p < 0,05$ )

При фармакологическом ингибировании Р-гр на ранних сроках макрофагальной дифференцировки статистически значимо снижается уровень экспрессии только гена *IL6* ( $0,73 \pm 0,09$  у.е.) по сравнению с контролем, который принят за 1 (рис. 7.2а).

На 7-е сутки, напротив, увеличивается экспрессия всех исследованных генов цитокинов по сравнению с контролем: *IL1B* в 1,72 раза, *TNF* в 1,83, *IL6* в 2,28 и *IL10* в 2,70 (рис. 7.2а). При этом экспрессия гена противовоспалительного цитокина *IL10* повышается в большей степени по сравнению с экспрессией генов провоспалительных цитокинов. Полученные данные демонстрируют, что эффект фармакологического ингибирования Р-гр на экспрессию генов цитокинов зависит от стадии макрофагальной дифференцировки.

Анализ секреции цитокинов показал, что под воздействием верапамила количество секретируемых *IL1β*, *TNF-α* и *IL6* на ранних сроках макрофагальной дифференцировки снижается по сравнению с контролем: *IL1β* в 1,74 раза (с  $243,23 \pm 11,30$  до  $139,89 \pm 12,86$  пг/мл), *TNF-α* в 1,94 раза (с  $902,15 \pm 123,94$  до  $465,76 \pm 30,75$  пг/мл), *IL6* в 2,34 раза (с  $18,3 \pm 1,99$  до  $7,7 \pm 0,76$  пг/мл). Секреция *IL10* под воздействием ингибитора Р-гр не отличается от контроля ( $15,5 \pm 1,43$  и  $16,3 \pm 1,95$  пг/мл соответственно).

Несмотря на то, что под воздействием верапамила на 7-е сутки макрофагальной дифференцировки повышается экспрессия генов провоспалительных цитокинов, уровень секретируемого *IL1β* ( $466 \pm 17$  пг/мл) снижен по сравнению с контролем ( $540 \pm 26$  пг/мл), а уровни *TNF-α* ( $1148 \pm 113,5$  пг/мл) и *IL6* ( $88,9 \pm 3,25$  пг/мл) не отличаются от контроля ( $1138 \pm 93$  и  $80 \pm 7$  пг/мл соответственно). При этом секреция цитокина *IL10* ( $93 \pm 7$  пг/мл) превышает значения в контроле ( $73,5 \pm 7,9$  пг/мл). Данные об увеличении уровня секреции *IL10* на 7-е сутки дифференцировки ТНР-1 макрофагов под воздействием верапамила соотносятся с данными об увеличении уровня экспрессии его гена.

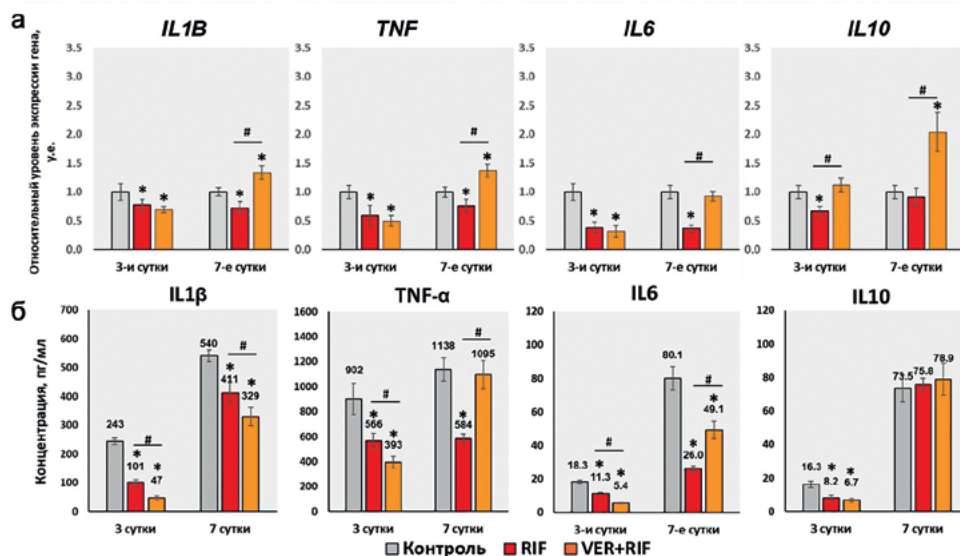
Сравнение уровней экспрессии генов соответствующих цитокинов с их секрецией демонстрирует, что **фармакологическое ингибирование Р-гр препятствует секреции всех анализируемых провоспалительных цитокинов при макрофагальной дифференцировке**. На ранних сроках этот эффект выражен для всех трёх провоспалительных цитокинов, а на поздних сроках – в первую очередь для *IL1β*. Отсутствие возрастания уровня секреции *TNF-α* и *IL6* на этом сроке на фоне возросшей экспрессии их генов также может свидетельствовать об ингибировании их секреции. Таким образом, **фармакологическое ингибирование Р-гр снижает уровень секреции провоспалительных цитокинов. Это свидетельствует в пользу гипотезы, что Р-гр является экспортером этих цитокинов и регулятором воспаления. Возрастание экспрессии генов на фоне снижения секреции цитокинов может иметь компенсаторный характер: макрофаги пытаются восполнить секрецию цитокинов, в том числе и за счёт наращивания экспрессии их генов.**

Обращает на себя внимание также схожесть эффектов верапамила и рифампицина. Так как оба агента связываются с Р-гр, то очевидно, что их действие на транспорт провоспалительных цитокинов совпадает.

## 7.2 Эффект ингибирования Р-гр на активность макрофагов при действии рифампицина

В данном разделе мы поставили два вопроса: (1) как рифампицин в терапевтической концентрации влияет на иммунные свойства макрофагов при их дифференцировке? (2) будет ли фармакологическое ингибирование Р-гр влиять на иммуномодулирующие эффекты рифампицина?

На ранних сроках макрофагальной дифференцировки рифампицин снижает экспрессию всех анализируемых генов по сравнению с контролем (принят за 1): *IL1B* в 1,3 раза (до  $0,78 \pm 0,1$ ), *IL6* в 2,6 раза (до  $0,38 \pm 0,1$ ), *TNF* в 1,7 раза (до  $0,59 \pm 0,18$ ), *IL10* в 1,43 раза (до  $0,66 \pm 0,09$ ). На поздних сроках дифференцировки этот эффект сохраняется только для генов провоспалительных цитокинов: *IL1B* в 1,34 раза (до  $0,73 \pm 0,11$ ), *IL6* в 2,7 раза (до  $0,37 \pm 0,06$ ), *TNF* в 1,32 раза (до  $0,76 \pm 0,11$ ) (рис. 7.3).



**Рис. 7.3.** Влияние фармакологического ингибирования Р-гр верапамилом (VER) на экспрессию генов (а) и секрецию цитокинов (б) в макрофагах ТНР-1 под воздействием рифампицина (RIF). Относительный уровень экспрессии генов цитокинов в контроле на 3-и и 7-е сутки макрофагальной дифференцировки принят за 1 у.е. \* – статистически значимые различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). # – статистически значимые различия между RIF и VER + RIF.

Анализ секреции цитокинов показал, что рифампицин снижает не только экспрессию генов, но и секрецию провоспалительных цитокинов на всех сроках макрофагальной дифференцировки клеток ТНР-1, а IL-10 – только на 3-и сутки (рис. 7.3а), т. е. динамика изменения экспрессии генов и секреции цитокинов при действии рифампицина совпадают. Если анализировать эффекты рифампицина при фармакологическом ингибировании Р-гр, то на 3-и сутки дифференцировки верапамил не влияет на эффекты рифампицина относительно снижения экспрес-

сии генов провоспалительных цитокинов. Уровни экспрессии генов являются сопоставимыми для *IL1B* ( $0,78 \pm 0,09$  и  $0,69 \pm 0,06$  соответственно), *TNF* ( $0,59 \pm 0,18$  и  $0,50 \pm 0,09$ ), *IL6* ( $0,38 \pm 0,10$  и  $0,31 \pm 0,10$ ) (рис. 7.3а). Для гена противовоспалительного цитокина *IL10* фармакологическое ингибирование Р-гр отменяет эффект снижения экспрессии гена, которое было выявлено при действии только рифампицина, и уровень экспрессии гена возвращается к контрольным значениям ( $0,66 \pm 0,09$  и  $1,12 \pm 0,12$  соответственно).

При этом на 3-и сутки верапамил усиливает эффекты рифампицина на секрецию провоспалительных цитокинов: секреция *IL1 $\beta$* , *IL6* и *TNF- $\alpha$*  статистически значимо ниже по сравнению только с действием рифампицина (рис. 7.3б).

На поздних сроках макрофагальной дифференцировки при совместной инкубации верапамила с рифампицином происходит увеличение экспрессии генов всех исследованных цитокинов по сравнению только с рифампицином, т. е. происходит отмена эффекта действия рифампицина. При этом уровни экспрессии генов *IL1B*, *TNF* и *IL10* превышают контрольные значения: *IL1B* в 1,33 раза ( $1,33 \pm 0,12$ ), *TNF* в 1,37 раза ( $1,37 \pm 0,11$ ) и *IL10* в 2 раза ( $2,04 \pm 0,33$ ). На этом же сроке при совместной инкубации верапамила с рифампицином увеличивается уровень секреции *TNF- $\alpha$*  и *IL6* по сравнению только с рифампицином: уровень *TNF- $\alpha$*  достигает контрольных значений ( $1095 \pm 113$  пг/мл), а уровень *IL6* остается сниженным, по сравнению с контролем ( $49 \pm 5$  пг/мл и  $80 \pm 7$  пг/мл соответственно). Секреция *IL1 $\beta$*  ещё больше снижается (с  $411 \pm 37$  до  $329 \pm 32$  пг/мл), а *IL10* остаётся без изменений.

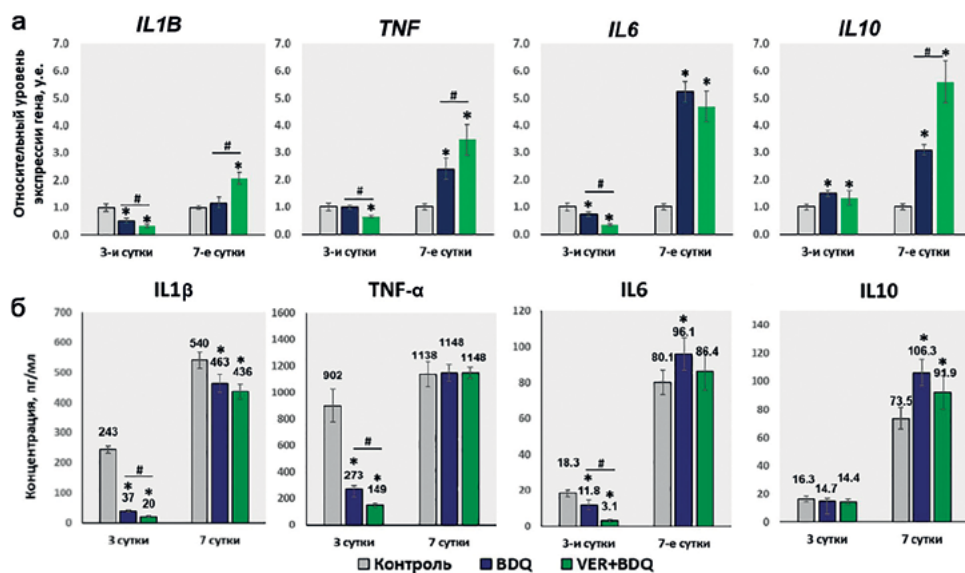
**Таким образом, под воздействием терапевтической концентрации рифампицина наблюдается снижение экспрессии генов и секреции провоспалительных цитокинов на обоих сроках макрофагальной дифференцировки, т. е. терапевтическая концентрация рифампицина влияет на функциональные свойства макрофагов и оказывает противовоспалительное действие. Фармакологическое ингибирование Р-гр усиливает эти эффекты на ранних сроках макрофагальной дифференцировки, но на поздних сроках дифференцировки частично их отменяет. Можно предположить, что на поздних сроках вступают в действие альтернативные механизмы транспорта цитокинов, которые не связаны с Р-гр.**

### 7.3 Эффект ингибирования Р-гр на активность макрофагов при действии бедаквилина

Если иммуномодулирующие свойства рифампицина в достаточной степени известны, то эффекты бедаквилина на макрофаги человека только начинают изучать. В данной работе мы поставили задачу проанализировать эффекты бедаквилина на провоспалительные свойства макрофагов человека и выяснить, каким образом фармакологическое ингибирование Р-гр будет на них влиять.

На ранних сроках дифференцировки под воздействием бедаквилина снижается уровень экспрессии генов *IL1B* ( $0,52 \pm 0,06$ ) и *IL6* ( $0,73 \pm 0,08$ ) и увеличивается уровень экспрессии гена *IL10* ( $1,50 \pm 0,11$ ) по сравнению с

контролем (принят за 1). На 7-е сутки уровни экспрессии генов *TNF* и *IL6* значительно повышаются – в 2,4 и 5,24 раза соответственно по сравнению с контролем, а *IL10* – в 3,10 раза (рис. 7.4а). Это свидетельствует о том, что бедаквилин является ингибитором экспрессии провоспалительных генов *IL1B* и *IL6* на ранних сроках макрофагальной дифференцировки и индуктором экспрессии генов *TNF*, *IL6* – на поздних сроках дифференцировки. По отношению к противовоспалительному гену *IL10* бедаквилин выступает в качестве индуктора на всех сроках макрофагальной дифференцировки.



**Рис. 7.4.** Влияние фармакологического ингибирования Р-гр верапамилом (VER) на (а) экспрессию генов и (б) секрецию цитокинов в макрофагах ТНР-1 под воздействием бедаквилина (BDQ). Относительный уровень экспрессии генов цитокинов в контроле на 3-и и 7-е сутки макрофагальной дифференцировки принят за 1 у.е. \* – статистически значимые различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ). # – статистически значимые различия между BDQ и VER+BDQ

Уровень секреции провоспалительных цитокинов на ранних сроках макрофагальной дифференцировки снижается при воздействии бедаквилином: *IL1β* – с  $243 \pm 11$  до  $37 \pm 3,8$  пг/мл, *IL6* – с  $18,3 \pm 2$  до  $11,8 \pm 2,7$  пг/мл, *TNF-α* – с  $902 \pm 124$  до  $273 \pm 24$  пг/мл (рис. 7.4б), и не изменяется для *IL10*, несмотря на индукцию экспрессии его гена.

На поздних сроках дифференцировки по сравнению с контролем под воздействием бедаквилина в макрофагах уровень секреция *IL1β* ниже, чем в контроле (463 и 540 пг/мл соответственно), секреция *TNF-α* не отличается от контроля (1148 пг/мл), а секреция *IL6* незначительно, но статистически значимо, превышает контрольные значения (96 пг/мл). Таким образом, ингибирование экспрессии гена *IL1B* бедаквилином приводит и к снижению его секреции на

ранних сроках дифференцировки. В отличие от IL1 $\beta$ , для IL6 данный эффект не наблюдается – на 3-и сутки происходит снижение экспрессии гена, но секреция самого цитокина ещё остаётся на высоком уровне.

**На 7-е сутки макрофагальной дифференцировки под воздействием беквакина обнаруживаются повышенные уровни секреции IL6 и IL10 по сравнению с контролем, что совпадает с динамикой изменения экспрессии их генов.** Для TNF- $\alpha$  таких изменений в секреции цитокина не выявлено, несмотря на значительное повышение экспрессии гена.

**Таким образом, беквакин оказывает различные эффекты на макрофаги человека в зависимости от стадии их дифференцировки. На ранних сроках препарат проявляет выраженный противовоспалительный эффект, который частично сохраняется и на поздних сроках.**

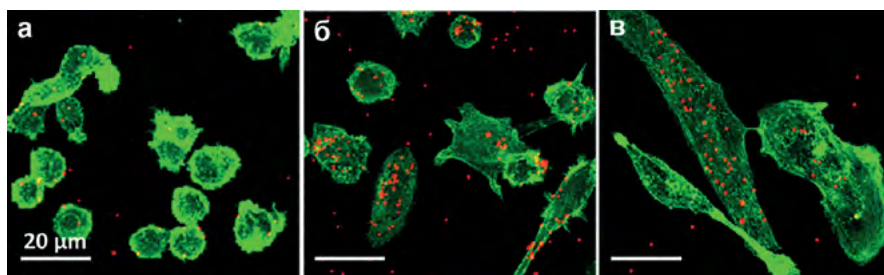
При совместной инкубации верапамила и беквакина на 3-и сутки макрофагальной дифференцировки уровни экспрессии генов цитокинов IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL6 статистически значимо ниже, чем при инкубации макрофагов только с беквакином, т. е. верапамил усиливает эффект беквакина. Но на 7-е сутки при их совместной инкубации, наоборот, наблюдается увеличение относительных уровней экспрессии генов цитокинов IL1 $\beta$  (с  $1,18 \pm 0,02$  у.е. до  $2,07 \pm 0,21$  у.е.) и TNF- $\alpha$  (с  $2,40 \pm 0,24$  у.е. до  $3,47 \pm 0,38$  у.е.) по сравнению с беквакином, а уровень экспрессии гена цитокина IL10 увеличивается почти в 2 раза (с  $3 \pm 0,18$  до  $5,60 \pm 0,76$ ).

При этом уровни секреции цитокинов на 3-и сутки повторяют динамику изменения экспрессии генов и статистически значимо снижаются по сравнению с действием только беквакина для провоспалительных цитокинов IL1 $\beta$  (с  $36,70 \pm 3,7$  до  $19,65 \pm 2,6$  пг/мл), TNF- $\alpha$  (с  $272 \pm 24$  до  $149,4 \pm 15$  пг/мл) и IL6 (с  $11,8 \pm 2,7$  до  $3,1 \pm 0,79$ ), т. е. фармакологическое ингибирование P-гр усиливает противовоспалительное действие беквакина. На 7-е сутки дифференцировки действие верапамила статистически значимо не влияет на эффекты беквакина.

**Таким образом, фармакологическое ингибирование P-гр усиливает противовоспалительное действие беквакина на раннем сроке дифференцировки макрофагов TLR-1 и не влияет на эти эффекты на позднем сроке дифференцировки.**

#### **7.4 Влияние P-гр на экспрессию генов фагоцитарных рецепторов в макрофагах**

В процессе макрофагальной дифференцировки TLR-1, индуцированной 100 нМ форболового эфира, возрастает фагоцитарная активность клеток (рис. 7.5). Если на 1-е сутки дифференцировки процент клеток, фагоцитирующих карбоксилатные латексные частицы, равен  $25 \pm 4,5\%$ , то к 3-м суткам он составляет  $75 \pm 5\%$ , а к 7-м суткам –  $85 \pm 1,5\%$ . Но при этом к 7-м суткам макрофагальной дифференцировки существенно увеличивается фагоцитарное число – количество фагоцитированных частиц на клетку. Если на 3-и сутки дифференцировки среднее количество поглощенных частиц на клетку равно 6,62, то на 7-е сутки – 30,59.



**Рис. 7.5.** Фагоцитарная характеристика макрофагов ТНР-1. а – 1-е сутки; б – 3-и сутки, в – 7-е сутки дифференцировки. Красный цвет – карбоксилатные латексные частицы, конъюгированные с TRITC, зелёный цвет – актиновые микрофиламенты, окрашенные FITC-фаллоидином. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок – 20 мкм.

В зависимости от поляризации макрофагов будут преобладать разные рецепторы фагоцитоза: в М1-макрофагах – CD64 (FcRs к IgG), в М2-макрофагах – CD206 и CD209 (маннозные рецепторы), и от этого будет зависеть активность рецепторного фагоцитоза. Нами был разработан метод количественного анализа активности рецепторного фагоцитоза в макрофагах ТНР-1 с помощью проточной цитометрии с визуализацией (Pavlova et al., 2023).

В выбранной модели макрофагальной дифференцировки М1 макрофаги характеризуются высоким уровнем экспрессии гена CD64, высокой активностью фагоцитоза опсонизированных IgG латексных частиц и крайне низким уровнем экспрессии гена маннозного рецептора CD206 по сравнению с другим лектиновым рецептором CD209, присутствующим на поверхности как макрофагальных, так и дендритных клеток. Макрофаги активно фагоцитировали опсонизированные маннаном латексные частицы, и активность их фагоцитоза возрастала на 7-е сутки дифференцировки (Ерохина и др., 2020; Курынина и др., 2018). При этом для данной модели макрофагов наиболее характерным является высокий уровень активности фагоцитоза IgG-опсонизированных латексных частиц через Fc-рецепторы.

В зависимости от поляризации макрофагов будут преобладать разные рецепторы фагоцитоза: в М1-макрофагах – CD64 (маркёр FcR), в М2-макрофагах – CD206 и CD209 (маркёры ManR). В нашей модели макрофагальной дифференцировки М1 макрофаги характеризуются крайне низким уровнем экспрессии маннозного рецептора CD206 по сравнению с другим лектиновым рецептором CD209.

Действие верапамила на 3-и сутки дифференцировки макрофагов приводило к существенному возрастанию уровня экспрессии как гена CD64, так и гена CD209 – в среднем в 1,5–2 раза по сравнению с контролем (принят за 1). К 7-м суткам дифференцировки активность экспрессии генов снижалась, но для CD64 всё равно оставалась на более высоком уровне, чем в контроле (рис. 7.6).

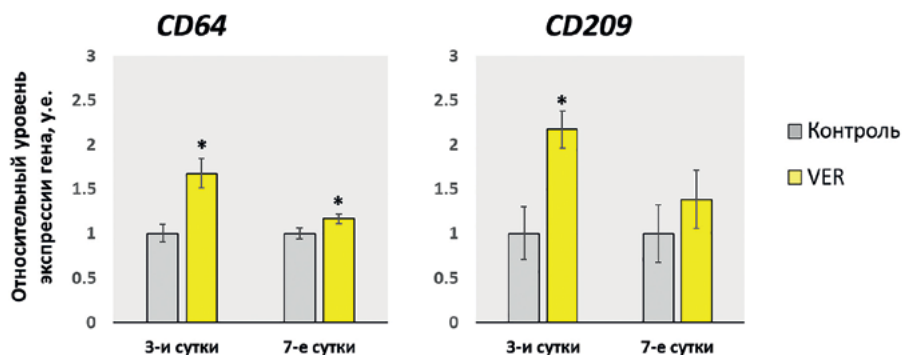


Рис. 7.6. Влияние верапамила (VER) на экспрессию генов фагоцитарных рецепторов в макрофагах THP-1 в процессе дифференцировки (3-и и 7-е сутки). Относительный уровень экспрессии генов в контроле на 3-и и 7-е сутки макрофагальной дифференцировки принят за 1.  
\* – статистически значимые различия по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ )

Полученные результаты свидетельствуют о функциональной значимости P-гр в реализации разных вариантов рецепторного фагоцитоза, что требует дальнейшего изучения на инфицированных *M. tuberculosis* макрофагах человека.

### 7.5 Ингибирование P-гр и фагоцитарная активность макрофагов в условиях действия рифампицина или бедаквилина

На ранних сроках макрофагальной дифференцировки наиболее выраженный эффект на уровень экспрессии генов фагоцитарных рецепторов имеет бедаквилин. Он значительно увеличивает уровни экспрессии CD64 и CD209 ( $3,70 \pm 0,48$  и  $5,26 \pm 0,40$  соответственно, контроль принят за 1). На поздних сроках макрофагальной дифференцировки сохраняется повышенный уровень экспрессии CD209 относительно контроля, но в меньшей степени ( $1,63 \pm 0,31$ ) (рис. 7.7). Эти данные продемонстрировали, что именно бедаквилин является индуктором рецепторного фагоцитоза, который сохраняется и на фоне действия верапамила.

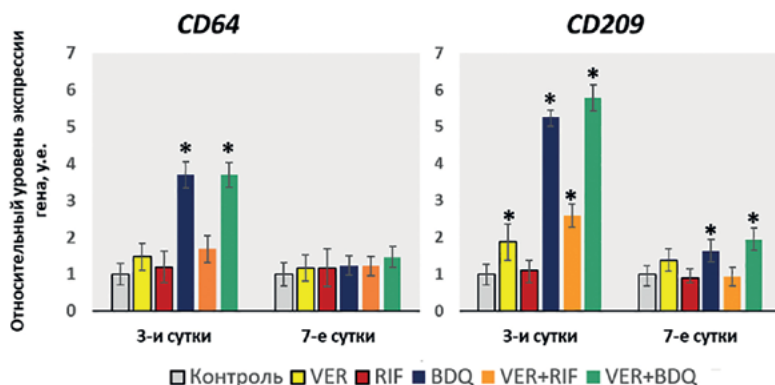


Рис. 7.7. Влияние терапевтических концентраций рифампицина и бедаквилина, а также фармакологического ингибитора P-гр верапамила на уровень экспрессии генов фагоцитарных рецепторов в THP-1 макрофагах. \* – статистически значимые отличия от контроля ( $p < 0,05$ ).

Для анализа фагоцитарной активности макрофагов под воздействием препаратов использовали карбоксилатные латексные частицы Fluoresbrite® YO (Polyscience, США) диаметром 1,00 мкм, опсонизированные человеческим иммуноглобулином G (IgG, Sigma-Aldrich, США) или D-маннаном (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с протоколом, описанным ранее (Курынина и др., 2018). Макрофаги на 3-и и 7-е сутки дифференцировки инкубировали с частицами в течение 3 часов в культуральной среде без сыворотки и анализировали на проточном цитометре CytoFlex, записывая 30 000 событий. Фагоцитарную активность клеток оценивали по медиане интенсивности флуоресценции латексных частиц, возбуждаемых синим лазером (488 нм).

Действительно, анализ фагоцитоза специализированных латексных частиц макрофагами THP-1 показал, что бедаквиллин усиливает фагоцитоз IgG – опсонизированных латексных частиц на ранних сроках макрофагальной дифференцировки, а на поздних сроках сохраняется повышенная активность фагоцитоза через Fc рецепторы к IgG. При этом также статистически значимо увеличивается и активность фагоцитоза опсонизированных D-манноном частиц (рис. 7.8).

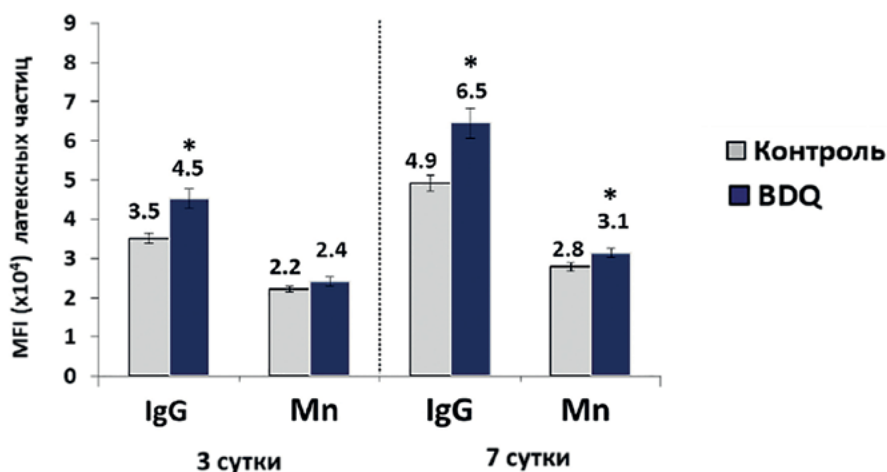


Рис. 7.8. Эффект бедаквиллина (BDQ) на активность рецепторного фагоцитоза на разных сроках макрофагальной дифференцировки. IgG – латексные частицы, опсонизированные IgG, Mn – опсонизированные D-маннаном латексные частицы.  
\* – статистически значимые отличия от контроля ( $p < 0,05$ )

Таким образом, бедаквиллин увеличивает экспрессию генов фагоцитарных рецепторов CD64 и CD209 и активирует рецепторный фагоцитоз опсонизированных IgG- и Mn-латексных частиц. Ингибирование P-гр не оказывает дополнительного влияния на эти эффекты бедаквиллина.

Сравнение уровней экспрессии генов соответствующих цитокинов с их секрецией позволяет предположить, что фармакологическое ингибирование P-гр препятствует секреции провоспалительных цитокинов при макрофагальной дифференцировке. На ранних сроках этот эффект выражен для всех трёх исследованных провоспалительных цитокинов, таких как IL6, TNF- $\alpha$  и IL1 $\beta$ , а на

поздних сроках – в первую очередь для IL1 $\beta$ . Отсутствие возрастания уровня секреции TNF- $\alpha$  и IL6 на этом сроке на фоне возросшей экспрессии их генов также может свидетельствовать об ингибировании их секреции и запуске в макрофагах компенсаторной реакции.

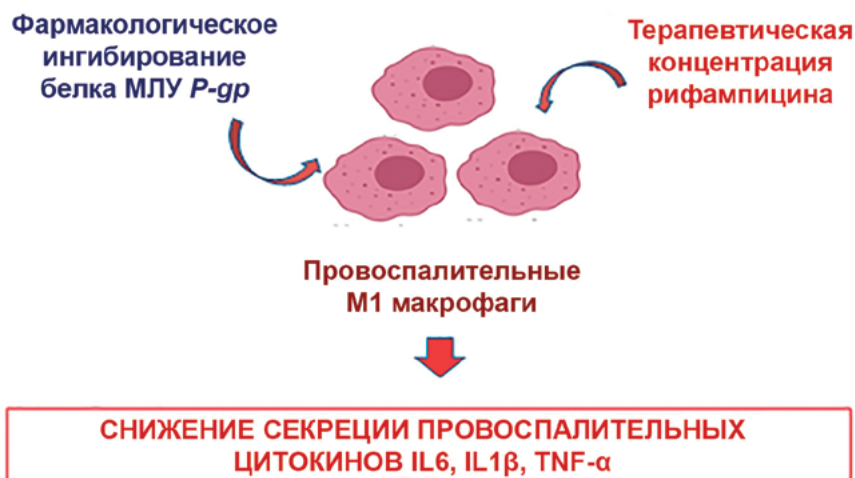
Ранее уже было показано, что фармакологическое ингибирование P-gr снижает секрецию провоспалительных цитокинов (Drach et al., 1996; Pawlik et al., 2005). Кроме того, было показано, что верапамил снижал продукцию медиаторов воспаления (TNF- $\alpha$  и NO) в клетках микроглии, стимулированных бактериальными липополисахаридами, тем самым защищая нейроны от гибели (Liu et al., 2011). При этом авторы работы отмечают, что нейропротекторные свойства верапамила не зависели от ингибирующего влияния на кальциевые каналы, что указывает на роль P-gr в данном процессе.

Провоспалительные цитокины, прежде всего IL1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ , являются одними из ключевых цитокинов для борьбы макрофагов с микобактериями туберкулёза (Domingo-Gonzalez et al., 2016). Снижение секреции данных цитокинов, опосредованное ингибированием активности P-gr, может негативно влиять на борьбу с возбудителем.

Согласно полученным данным, под воздействием терапевтической концентрации рифампицина наблюдается снижение как экспрессии генов провоспалительных цитокинов, так и их секреции на всех исследуемых сроках макрофагальной дифференцировки. Полученные данные о провоспалительных эффектах рифампицина совпадают с данными других авторов (Bi et al., 2011; Smani et al., 2011; Ziglam et al., 2004).

Интересно отметить, что в *in-silico* исследовании обнаружили, что рифампицин обладает высокой аффинностью химического связывания с провоспалительными цитокинами TNF- $\alpha$ , IL6 и IL1 $\beta$ . Это указывает на то, что он может быть потенциальным лекарством в иммуномодуляции во время цитокинового шторма при лечении COVID-19 (Pathak et al., 2021). Он не только снижает экспрессию провоспалительных цитокинов в макрофагах и других типах клеток человека, но и связывается с этими цитокинами в биологических жидкостях, препятствуя достижению ими клеточных мишеней.

Нами обнаружено, что фармакологическое ингибирование P-gr усиливает противовоспалительные эффекты рифампицина на ранних сроках макрофагальной дифференцировки (рис. 7.9). Дополнительное снижение секреции провоспалительных цитокинов под воздействием ингибитора P-gr можно объяснить аддитивными эффектами препаратов, так как верапамил, так же, как и рифампицин, снижает секрецию провоспалительных цитокинов. Эти данные свидетельствуют о том, что P-gr, как белок-транспортёр, является регулятором воспаления.



**Рис. 7.9.** Эффект совместного действия рифампицина и верапамила на функциональные характеристики провоспалительных макрофагов человека

Но на поздних сроках макрофагальной дифференцировки фармакологическое ингибирование P-гр частично отменяет провоспалительные эффекты RIF, что приводит к повышению уровней экспрессии и секреции провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IL6 при совместной инкубации верапамила и рифампицина по сравнению только с рифампицином. Мы предполагаем, что этот эффект может быть связан с запуском альтернативных механизмов экспорта цитокинов из макрофагов.

Обнаруженные нами разнонаправленные иммуномодулирующие эффекты фармакологического ингибирования P-гр на поздних сроках дифференцировки по сравнению с ранними сроками могут указывать на то, что длительное ингибирование функции P-гр в клетке может оказывать влияние как на их физиологическое состояние, так и на провоспалительный фенотип макрофагов. При длительном ингибировании P-гр активируются различные сигнальные пути в клетках, позволяя им адаптироваться, что объясняет множественные неудачи фармакологического ингибирования белков МЛУ.

Бедаквлин снижает уровни секреции провоспалительных цитокинов на ранних сроках макрофагальной дифференцировки. Более низкий уровень секреции провоспалительных цитокинов на 3-и сутки дифференцировки по сравнению с контролем может быть связан с возможным его влиянием на формирование фенотипа зрелых макрофагов, как это было обнаружено и при анализе уровня экспрессии гена *ABCB1*.

На поздних сроках дифференцировки под воздействием бедаквилена в макрофагах происходит значительное увеличение уровней секреции IL6 и IL10 по сравнению с контрольными макрофагами. Полученные нами данные совпадают с результатами работы другого исследования (Lyu et al., 2022). В макрофагах ТНР-1, инфицированных *M. tuberculosis* под воздействием бедаквилена увеличивался уровень секреции IL6. В то же время, авторы данной работы показали снижение уровня секреции IL10. В нашей работе, напротив, уровень

экспрессии и секреции IL10 значительно увеличивается. Фармакологическое ингибирование Р-гр на поздних сроках не оказывало влияния на иммуномодулирующие свойства бедаквилаина.

IL6 считается провоспалительным цитокином, так как его экспрессия индуцируется такими провоспалительными цитокинами, как IL1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ . В то же время, в макрофагах IL6 подавляет экспрессию TNF- $\alpha$ . Он также, как IL-10, ингибирует лизосомно-фагосомное слияние и аутофагию в инфицированных *M. tuberculosis* макрофагах, способствуя внутриклеточному персистенции возбудителя (Dutta et al., 2012). В связи с этими данными обнаруженные эффекты бедаквилаина на макрофаги на позднем сроке дифференцировки требуют дальнейшего изучения. Особенно, учитывая, что выявлены выраженные эффекты этого препарата на уровень экспрессии фагоцитарных рецепторов и усиление рецепторного фагоцитоза как через Fc, так и через лектиновые рецепторы.

Также стоит отметить, что разнонаправленные изменения в макрофагах на 7-е сутки дифференцировки по сравнению с 3-ми сутками при действии разных экспериментальных агентов, использованных в нашей работе, указывают на принципиально разный провоспалительный статус (функциональное состояние) макрофагов ТНР-1 в зависимости от срока их дифференцировки. **Таким образом, эффекты противотуберкулёзных препаратов могут быть различными в зависимости от статуса макрофагов и это имеет прикладное значение в клинической практике.**

При туберкулёзе в очаг воспаления мигрирует большое количество моноцитов и макрофагов, находящихся на разных стадиях дифференцировки и имеющих разный провоспалительный фенотип. Наше исследование экспрессии генов в перифокальной области туберкулём пациентов с туберкулёзом также выявило повышенный уровень экспрессии генов-маркеров макрофагов, характерных как для М1, так и для М2 макрофагов при высокой активности специфического воспаления. Это подчеркивает важность исследования действия противотуберкулёзных препаратов не только на зрелые макрофаги, но и на клетки, находящиеся в процессе дифференцировки.

## 7.6 Заключение к главе 7

Белок транспортёр Р-гр является клинически значимым белком МЛУ при туберкулёзном воспалении. Макрофаги являются первыми клетками врождённого иммунитета, которые вступают в борьбу с возбудителем *M. tuberculosis*, в связи с чем именно в них функциональная активность Р-гр представляет первоочередной интерес. Фармакологическое ингибирование Р-гр оказывает эффекты на секрецию провоспалительных цитокинов в М1 макрофагах, а также на их фагоцитарную активность, что свидетельствует об участии Р-гр в формировании провоспалительного фенотипа макрофагов человека. При этом вопрос влияния функциональной активности Р-гр на эффективность действия противотуберкулёзных препаратов, а также в регуляции туберкулёзного воспаления, является чрезвычайно актуальным и только находится на стадии разработки и накопления данных.

## ГЛАВА 8

### ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В монографии представлены результаты многолетнего комплексного исследования, позволившего сопоставить данные о белках МЛУ и, в первую очередь, P-gr/*ABCB1* в клиническом материале пациентов с туберкулёзом лёгких, на экспериментальных моделях туберкулёзного воспаления, в культивируемых эпителиальных клетках и макрофагах человека. В работе представлены данные, полученные с применением наиболее современных методов гистологии, клеточной и молекулярной биологии, микроскопии. Многоплановость исследования позволила получить новые данные об индукции экспрессии генов белков МЛУ (P-gr/*ABCB1*, *MRP1/ABCC1*, *BCRP/ABCG2*) при разной активности специфического воспаления и выбрать ген *ABCB1* белка P-gr в качестве референсного гена активности туберкулёзного воспаления. Этот результат поставил вопрос о взаимосвязи экспрессии гена *ABCB1* с экспрессией генов наиболее значимых при туберкулёзе лёгких цитокинов, маркеров иммунных клеток, транскрипционных факторов. Молекулярно-генетический анализ позволил не только получить новые данные, касающиеся генетического профиля туберкулём пациентов, но и выявить две разные молекулярно-генетические сигнатуры. Каждая из этих сигнатур ассоциирована с высокой или низкой экспрессией гена *ABCB1* белка МЛУ P-gr и является характерной «подписью» туберкулёмы, биомаркером активности специфического воспаления и особенностей его проявления. Открытие таких сигнатур в дальнейшем будет положено в основу разработки прогностических тестов и подбора мишеней для персонализированного подхода в рамках Host-directed therapy или терапии, направленной на организм пациента. На основе данных мета-анализа в 2022 году ген *ABCB1* был включен в перечень из 20 референсных генов, экспрессия которых в образцах цельной крови позволяет с высокой статистической значимостью отличить латентный туберкулёз от активного туберкулёзного процесса. Это также подчёркивает значимую роль белка МЛУ P-gr в развитии и регуляции активности туберкулёзного воспаления.

В нашем исследовании мы использовали резекционные образцы туберкулём лёгкого. Доля туберкулём среди других форм туберкулёза лёгких составляет более 20% и продолжает возрастать, что подчеркивает необходимость изучения её иммунопатологии. Ориентация на эту клиническую форму позволила выделить группы с высокой и умеренной активностью специфического воспаления, исходя из данных морфологического анализа гистологических срезов. Дополнительное использование технологии комбинированного иммунохимического маркирования *M. tuberculosis* на гистологических срезах с последующим 3D-анализом при помощи лазерной конфокальной микроскопии подтвердило присутствие возбудителя в зоне некроза и перифокальной области туберкулём. Продемонстрирована более высокая специфичность и эффективность этой технологии в сравнении с традиционным морфологическим методом выявления микобактерий туберкулёза на гистологических срезах по методу Циля – Нильсена. Данная технология позволяет детектировать *M. tuberculosis* в разных зонах туберкулёмы и прилега-

ющей ткани при низкой бактериальной нагрузке и сокращает время пробоподготовки, что является важным для своевременной верификации диагноза.

Генетический анализ разных зон туберкулём позволил установить, что для определения уровня экспрессии генов белков МЛУ в операционном материале необходимо брать перифокальную зону (область лёгких, прилегающую к туберкулёму), как наиболее информативную, что легло в основу создания методологии изучения белков МЛУ при туберкулёзном воспалении.

В результате мы обнаружили, что, несмотря на сходство морфологических проявлений высокой активности воспаления, молекулярно-генетический профиль образцов различается. Это исследование предоставляет новые свидетельства того, что высокая активность воспалительного процесса обусловлена разными факторами. Это может быть развитие патологического процесса, обусловленного высоким уровнем экспрессии *IL6* и *STAT3*, или высоким уровнем экспрессии *TNF*. Высокая экспрессия гена *ABCB1* ассоциирована с высокой экспрессией генов факторов транскрипции, регулирующих воспаление, таких как *HIF1A*, *SOCS3* и *STAT3*, гена цитокина *IL6*, а также *TGM2* – маркера низкой эффективности макрофагов в борьбе с *M. tuberculosis*. Взаимосвязь между высокими уровнями экспрессии генов *ABCB1* и *TGM2* указывает на значимость Р-гр для выживания возбудителя. Открытые молекулярно-генетические сигнатуры, ассоциированные с высокой активностью воспаления, расширяют знания об иммунопатологии туберкулёза лёгких и могут быть использованы при разработке терапевтических подходов, направленных на регуляцию активности туберкулёзного воспаления и персонализированной медицины.

Результаты, полученные на моделях экспериментального туберкулёзного воспаления на мышах, вносят весомый вклад в дополнение к данным, полученным на операционном материале. Прежде всего, это единственно возможный экспериментальный подход, который позволяет сопоставить изменение экспрессии генов белков МЛУ в зависимости от стадии туберкулёзного воспаления (начальной, промежуточной и терминальной). Каждая стадия характеризуется своими морфологическими проявлениями, в том числе и в виде появления пневмонических фокусов, содержащих пенистые макрофаги с *M. tuberculosis*. В экспериментальных условиях мы подтвердили, что при развитии туберкулёза в лёгких референсным геном, отражающим активность специфического воспаления, является ген *ABCB1/P-гр*. Эксперименты на провоспалительных макрофагах человека с использованием фармакологического ингибитора Р-гр R-верапамила позволили выявить функциональные свойства Р-гр как белка-транспортёра провоспалительных цитокинов  $IL1\beta$ ,  $TNF-\alpha$ , *IL6* и регулятора воспаления. Использование фармакологических ингибиторов Р-гр рассматривается в качестве перспективной стратегии повышения эффективности терапии при туберкулёзе лёгких.

В 2008 году был сформирован Международный консорциум по исследованию белков-транспортёров. В 2010 году им были опубликованы первые рекомендации относительно методов изучения взаимодействия транспортёров с лекарствами и интерпретации полученных данных, а также рекомендации и примеры руководств, которые следует учитывать при разработке лекарств. Белок-транспортёр Р-гр был назван одним из первых мембранных транспортё-

ров, чью активность необходимо учитывать при создании и назначении лекарственных препаратов. Ген *ABCBI* входит в группу генов ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) – это гены белков, регулирующие ключевые этапы взаимодействия организма человека с лекарствами и влияющие на их биодоступность. Гены белков МЛЮ *ABCBI* (P-gr) и *ABCG2* (BCRP) включены в перечень 30 наиболее значимых фармакогенов.

При пероральном приёме противотуберкулёзные препараты должны преодолеть целый ряд барьеров в виде АТФ-связывающих белков, локализованных на мембранах клеток барьерных органов, прежде чем они достигнут лёгкие и свою мишень – *M. tuberculosis*. Транспорт лекарственных препаратов через плазматические мембраны клеток человека, а также через клеточную стенку и плазматическую мембрану возбудителя является одним из важных аспектов в эффективном лечении туберкулёза. Согласно ресурсу DrugBank противотуберкулёзные препараты рифампицин, этамбутол, моксофлоксацин являются субстратами для P-gr. Рифампицин не только является субстратом P-gr, но и индуктором экспрессии его гена. Индукция экспрессии гена *ABCBI* и возрастание его функциональной активности было подтверждено нами как *in vivo*, на модели химиотерапии экспериментального туберкулёза, так и *in vitro* на эпителиальных и иммунных клетках – провоспалительных макрофагах человека. Это указывает на то, что длительное воздействие рифампицином на различные клетки может способствовать формированию лекарственной устойчивости к нему и снижать эффективность противотуберкулёзной химиотерапии, что подчеркивает значимость белков МЛЮ для клинической практики.

В отличие от рифампицина, бедаквилин в терапевтической концентрации вызывает снижение экспрессии гена *ABCBI* и оказывает влияние на P-gr только в высоких концентрациях. Этот важный для клинической практики результат демонстрирует, что P-gr не снижает внутриклеточную концентрацию антибиотика, что особенно актуально для инфицированных макрофагов. Более того, показано, что бедаквилин повышает экспрессию и уровень рецепторов фагоцитоза и фагоцитарной активности в провоспалительных макрофагах человека. Мы предполагаем, что эти свойства бедаквилина, наряду с активацией лизосомного и фаголизосомного компартментов, вносят свой вклад в его высокую эффективность в качестве нового противотуберкулёзного препарата. Он так же, как и рифампицин, обладает иммуномодулирующим действием. Стоит отметить, что эффекты бедаквилина на провоспалительные макрофаги зависят от созревания и стадии функциональной зрелости самих макрофагов. При туберкулёзе в очаг воспаления мигрирует большое количество моноцитов и макрофагов, находящихся на разных стадиях дифференцировки и имеющих разный фенотип. Это подчеркивает важность исследования действия противотуберкулёзных препаратов не только на зрелые макрофаги, но и на клетки, находящиеся в процессе дифференцировки.

Наше исследование перифокальной области туберкулём с высокой активностью воспалительного процесса выявило повышенный уровень экспрессии генов – маркеров, характерных как для М1, так и для М2 макрофагов. Макрофаги являются первыми клетками врождённого иммунитета, которые вступают в борьбу с возбудителем *M. tuberculosis*, в связи с чем именно в макрофагах функ-

циональная активность Р-гр представляет первоочередной интерес. Известно, что М2 макрофаги характеризуются более высокой активностью Р-гр, и в них *M. tuberculosis* выживает лучше, чем в М1 макрофагах. Белок транспортёр Р-гр является клинически значимым белком МЛУ при туберкулёзном воспалении. Фармакологическое ингибирование Р-гр оказывает воздействие на секрецию провоспалительных цитокинов в М1 макрофагах, а также на их фагоцитарную активность. Это свидетельствует о влиянии Р-гр на формирование провоспалительного фенотипа макрофагов и о его клинически значимом участии в развитии туберкулёзного воспаления.

Некоторые из факторов его развития – возбудитель, клетки воспаления, продуцируемые ими цитокины, гипоксия, – индуцируют экспрессию белков МЛУ. При этом и сами белки МЛУ оказывают регуляторное воздействие на развитие и выраженность воспалительного ответа. Такие данные важны не только для изучения патогенеза туберкулёза, но и являются актуальными для оптимизации его лечения. Проведение биомедицинских исследований в данной области необходимо для создания теоретической и методической базы в целях разработки практических рекомендаций для использования в клинике.

Другой важный результат, полученный в ходе исследования, это активация эндоцитоза в провоспалительных макрофагах и клетках миелоцитарного происхождения человека современным препаратом рифампицина, инкапсулированного в полимер молочной кислоты. Препарат эффективен против внутриклеточных форм *M. tuberculosis*, а активация эндоцитоза вызывает снижение активности Р-гр за счёт его интернализации. Полученный результат открывает дальнейшие перспективы для разработки лекарственной стратегии в целях снижения активности Р-гр на основе индукции эндоцитоза (интернализация Р-гр) и на этом фоне создания оптимальной внутриклеточной концентрации рифампицина.

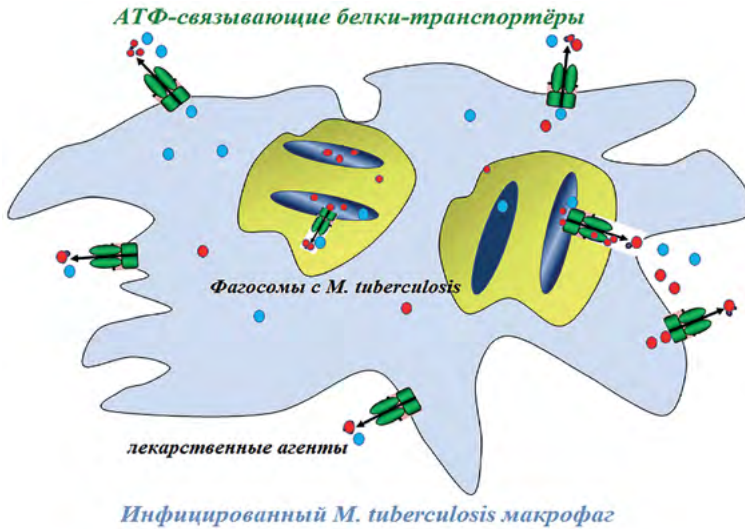
Отдельно стоит вопрос о синергизме действия АТФ-связывающих белков-транспортёров возбудителя и белков МЛУ. Мы предполагаем, что субстратная специфичность может перекрываться между белками МЛУ и бактериальными белками-транспортёрами, что отражено в табл. 8.1.

**Табл. 8.1.** Сравнение субстратов для бактериальных АТФ-связывающих транспортёров и для белков МЛУ клеток человека

Антибиотики – субстраты для АТФ-связывающих белков-транспортёров бактерий	Антибиотики – субстраты для Р-гр
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Макролиды</li> <li>• Линкозамиды</li> <li>• Стрептограминны</li> <li>• Кетолиды</li> <li>• Фторхинолоны</li> <li>• Рифампины</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Макролиды (эритромицин)</li> <li>• Фторхинолоны (спарфлоксацин)</li> <li>• Тетрациклины</li> <li>• Антрациклины</li> <li>• Рифампицин</li> </ul>

Таблица сделана на основе данных Kim, 2002; Alvarez et al., 2008; Theodoulou and Kerr, 2015.

Следовательно, если бактериальная клетка попадает в цитоплазму макрофага, можно ожидать согласованной работы белков-транспортёров, одновременно формирующих лекарственную резистентность в обеих клетках – возбудителя и макрофага. Активный выброс лекарства будет происходить из клетки возбудителя в цитозоль, а потом – из клетки-хозяина во внеклеточную среду. Такое согласованное действие различных транспортёров может приводить к лучшему выживанию внутриклеточных форм бактерий и способствовать развитию лекарственно-устойчивых форм туберкулёза (рис. 8.1).



**Рис. 8.1.** Модель согласованного действия белков МЛУ макрофага и АТФ-связывающих белков-транспортёров возбудителя

В условиях увеличения доли лекарственно-устойчивого туберкулёза и появления форм возбудителя не только с множественной лекарственной устойчивостью, но и с широкой и чрезвычайно широкой, вопрос синергизма между защитными механизмами возбудителя и клеток человека приобретает особую актуальность.

Туберкулёз и в XXI веке остаётся одной из глобальных проблем здравоохранения и по-прежнему является социально-значимым заболеванием. Это делает крайне актуальной разработку новых подходов к его терапии, которые могли бы дополнить уже существующие подходы. Наряду с традиционными терапевтическими стратегиями, направленными исключительно на возбудителя, перспективным представляется направленное воздействие и на клетки макроорганизма. Наши исследования вносят свой вклад в разработку таких инновационных стратегий. Результаты, полученные в ходе проведенных нами исследований, формируют научно-методическую базу для дальнейшего изучения роли разных белков МЛУ в развитии резистентности к противотуберкулёзным препаратам в клетках человека, что особенно актуально в условиях стремительного роста устойчивости *M. tuberculosis* к современным антибиотикам.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авербах М.М. Туберкуломы лёгкого // Медицина. Москва. 1969. С. 336.
2. Ерохин В.В., Лепеха Л.Н., Ерохина М.В., Ловачева О.В. Сурфактантная система лёгких при туберкулёзе. 2-е изд. Москва, Нью-терра. 2014. С. 270.
3. Ерохин В.В., Романова Л.К. Сурфактантная система лёгких // Клеточная биология лёгких в норме и при патологии. Под ред. В.В. Ерохина, Л.К. Романовой. Медицина, Москва. 2000. С. 167–81.
4. Ерохина М.В. Белки-транспортёры соматических клеток организма и их влияние на эффективность противотуберкулёзной химиотерапии // Туберкулёз и болезни лёгких. 2004. № 8. С. 11-15.
5. Ерохина М.В., Курынина А.В., Щербакова Е.А., Шапошникова Д.А., Лепеха Л.Н. Моделирование рецепторного фагоцитоза в провоспалительных макрофагах человека // Вестник ЦНИИТ. 2020. № 4. С. 15–26.
6. Ерохина М.В., Лепеха Л.Н., Эргешов А.Э., Рыбалкин Е.Ю., Садовникова С.С., Сычевская К.А. Белки множественной лекарственной устойчивости соматических клеток лёгкого и особенности их экспрессии при фиброзно-кавернозном туберкулёзе // Туберкулёз и болезни лёгких. 2016. № 9. С. 53–58.
7. Ерохина М.В., Курынина А.В., Онищенко Г.Е. Митохондрии являются мишенью для противотуберкулёзного препарата рифампицина в культивируемых эпителиальных клетках // Биохимия. 2013. 78 (10). С. 1473–1484.
8. Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Колпакова Т.А., Меньщикова Е.Б. Макрофаг и микобактерия: война без начала и конца // Успехи современной биологии. 2015. 135 (6). С. 554–74.
9. Зоров Д.Б., Банникова С.Ю., Белоусов В.В., Высоких М.Ю., Красников Б.Ф., Зорова Л.Д., Исаев Н.К., Плотников Е.Ю. Дружья или враги. Активные формы кислорода и азота (обзор) // Биохимия. 2005. 70 (2). С. 265–272.
10. Курынина А.В., Ерохина М.В., Макаревич О.А., Сысоева В.Ю., Лепеха Л.Н., Кузнецов С.А., Онищенко Г.Е. Пластичность фагоцитарной активности клеток человека линии ТНР-1 при макрофагальной дифференцировке // Биохимия. 2018. Т. 83. № 3. С. 200–214.
11. Курынина А.В., Ерохина М.В., Макаревич О.А., Сысоева В.Ю., Лепеха Л.Н., Кузнецов С.А., Онищенко Г.Е. Пластичность фагоцитарной активности клеток человека линии ТНР-1 при макрофагальной дифференцировке // Биохимия. 2018. 83 (3). С. 309–325.
12. Лепеха Л.Н. Макрофаги и дендритные клетки лёгких // Респираторная медицина. 2017. С. 159–70.
13. Лепеха Л.Н., Березовский Ю.С., Семенова Л.А., Михайловский А.М. Патоморфология туберкулёза органов дыхания // Туберкулёз органов дыхания. 2017. С. 45–74.
14. Лепеха Л.Н., Ерохина М.В. Макрофаги и Дендритные Клетки Лёгких: Руководство Респираторная медицина в 5 т. 3-е изд., дополненное и переработанное. Российское респираторное общество. Москва. ПульмоМедиа. 2024. Т.1. С.249–263. п/р академика РАН Чучалина А.Г.

15. Павлова Е.Н., Ерохина М.В., Рыбалкина Е.Ю., Поташникова Д.М., Масютиин А.Г., Лепеха Л.Н., Эргешов А.Э. Влияние рифампицина на индукцию активности MDR1/P-gp в провоспалительных макрофагах человека // Антибиотики и химиотерапия. 2022. 67 (3-4). С. 16–22.
16. Федосеева В.В., Халанский А.С., Мхитаров В.А., Цветков И.С., Малиновская Ю.А., Максименко О.О., Гельперина С.Э., Балабаньян В.Ю., Разживина В.А., Гореликов П.Л., Михайлова Л.П., Макарова О.В. Противоопухолевая активность доксорубицина в составе поли(лактид-ко-гликолидных) наночастиц при экспериментальной глиобластоме // Клиническая и экспериментальная морфология. 2017. 22 (2). С. 65–71.
17. Холодок О.А., Григоренко А.А., Черемкин М.И. Туберкулома лёгкого как форма туберкулезного процесса // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2014. 53. С. 126–31.
18. Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., Попова Н.М. Влияние гипоксии различных видов на функциональную активность и экспрессию гликопротеина Р // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2016. 14 (1). С. 71–77.
19. Abate G., Ruminiski P.G., Kumar M., Singh K., Hamzabegovic F., Hoft D.F., Eickhoff C.S., Selimovic A., Campbell M., Chibale K. New Verapamil Analogs Inhibit Intracellular Mycobacteria without Affecting the Functions of Mycobacterium-Specific T Cells // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2016. 60 (3). P. 1216-1225.
20. Abril A.G., Carrera M., Böhme K., Barros-Velázquez J., Rama J.-L.R., Calo-Mata P., Sánchez-Pérez A., Villa T.G. Proteomic Characterization of Antibiotic Resistance, and Production of Antimicrobial and Virulence Factors in Streptococcus Species Associated with Bovine Mastitis. Could Enzybiotics Represent Novel Therapeutic Agents Against These Pathogens? // Antibiotics. 2020. 9. P. 302.
21. Abualsunun W.A., Sahin C., Cummins C.L., Piquette-Miller M. Essential Role of STAT-3 Dependent NF- $\kappa$ B Activation on IL-6-Mediated Downregulation of Hepatic Transporters // European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2020. 143. P. 105-151.
22. Adams K.N., Szumowski J.D., Ramakrishnan L. Verapamil, and Its Metabolite Norverapamil, Inhibit Macrophage-Induced, Bacterial Efflux Pump-Mediated Tolerance to Multiple Anti-Tubercular Drugs // The Journal of Infectious Diseases. 2014. 210 (3). P. 456–466.
23. Adankwah E., Seyfarth J., Phillips R., Jacobsen M. Aberrant Cytokine Milieu and Signaling Affect Immune Cell Phenotypes and Functions in Tuberculosis Pathology: What Can We Learn from This Phenomenon for Application to Inflammatory Syndromes? // Cellular & Molecular Immunology. 2021. 18 (8). P. 2062-2064.
24. Ahmed S., Zhou Z., Zhou J., Chen S.-Q. Pharmacogenomics of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters: Relevance to Precision Medicine // Genomics Proteomics Bioinformatics. 2016. 14. P. 298313.
25. Albermann N., Schmitz-Winnenthal F.H., Z'graggen K., Volk C., Hoffmann M.M., Haefeli W.J. Expression of the Drug Transporters MDR1/ABCB1, MRP1/ABCC1, MRP2/ABCC2, BCRP/ABCG2, and PXR in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Their Relationship with the Expression in Intestine and Liver // BiochemPharmacol. 2005. 70 (6). P. 949-958.

26. Aller S.G., Yu J., Ward A., Weng Y., Chittaboina S., Zhuo R., Harrell P.M., Trinh Y.T., Zhang Q., Urbatsch I.L., Chang G. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding // *Science*, 2009, 323 (5922), P. 1718-1722.
27. Almeida A.S., Lago P.M., Boechat N., et al. Tuberculosis Is Associated with a Down-Modulatory Lung Immune Response That Impairs Th1-Type Immunity // *The Journal of Immunology*, 2009, 183(1), P. 718-731.
28. Alsultan A., Peloquin C.A. Therapeutic Drug Monitoring in the Treatment of Tuberculosis: An Update // *Drugs*, 2014, 74(8), P. 839-854.
29. Andries K., Verhasselt P., Guillemont J., Göhlmann H.W.H., Neefs J.-M., Winkler H., Van Gestel J., Timmerman P., Zhu M., Lee E., Williams P., de Chaffoy D., Huitric E., Hoffner S., Cambau E., Truffot-Pernot C., Lounis J., Jarlier V. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of *Mycobacterium tuberculosis* // *Science*, 2005, 307 (5707), P. 223-227.
30. Andries K., Verhasselt P., Guillemont J., Göhlmann H.W.H., Neefs J.-M., Winkler H., Van Gestel J., Timmerman P., Zhu M., Lee E., Williams P., de Chaffoy D., Huitric E., Hoffner S., Cambau E., Truffot-Pernot C., Lounis J., Jarlier V. A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of *Mycobacterium tuberculosis* // *Science*, 2005, 307 (5707), P. 223-227.
31. Anisimova Y.V., Gelperina S.I., Peloquin C.A., Heifets L.B. Nanoparticles as Antituberculosis Drug Carriers: Effect on Activity Against *Mycobacterium tuberculosis* in Human Monocyte-Derived Macrophages // *Yao Hsueh Hsueh Pao Acta Pharmaceutica Sinica*, 2000, 2 (2), P. 165-171.
32. Armstrong J.F., Hart P.D. Phagosome-Lysosome Interactions in Cultured Macrophages Infected with Virulent Tubercle Bacilli: Reversal of the Usual Nonfusion Pattern and Observations on Bacterial Survival // *J Exp Med*, 1975, 142, P. 1-16.
33. Attri S., Rana S.V., Vaiphei K., Sodhi C.P., Katyal R., Goel R.C., Nain C.K., Singh K. Isoniazid- and Rifampicin-Induced Oxidative Hepatic Injury - Protection by N-Acetylcysteine // *Human and Experimental Toxicology*, 2000, 19 (9), P. 517-522.
34. Azaiz M.B., Jemaa A.B., Sellami W., et al. Deciphering the Balance of IL-6/IL-10 Cytokines in Severe to Critical COVID-19 Patients // *Immunobiology*, 2022, 227 (4), P. 152236.
35. Báez-Saldaña R., López-Arteaga Y., Bizarrón-Muro A., et al. A Novel Scoring System to Measure Radiographic Abnormalities and Related Spirometric Values in Cured Pulmonary Tuberculosis // *PLoS ONE*, 2013, 8 (11), e78926.
36. Basarkar A., Devineni D., Palaniappan R., Singh J. Preparation, Characterization, Cytotoxicity and Transfection Efficiency of Poly(DL-Lactide-Coglycolide) and Poly(DL-Lactic Acid) Cationic Nanoparticles for Controlled Delivery of Plasmid DNA // *Int J Pharm*, 2007, 343, P. 247-254.
37. Baudou E., Lespine A., Durrieu G., André F., Gandia P., Durand C., Cunat S. Serious Ivermectin Toxicity and Human ABCB1 Nonsense Mutations // *N Engl J Med*, 2020, 383, P. 787-789.
38. Bauer B., Hartz A.M., Miller D.S. Tumor Necrosis Factor Alpha and Endothelin-1 Increase P-Glycoprotein Expression and Transport Activity at the Blood-Brain Barrier // *Mol Pharmacol*, 2007, 71, P. 667-675.

39. Beig T.Y., Khan U.H., Ganie B.A., Tahir S., Shah S., Dhobi G. Correlation Between Serum Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- $\alpha$ ) and Clinical Severity of Tuberculosis: A Hospital-Based Study // *Cureus*, 2023, 15 (2), e35626.
40. Belosludtsev K.N., Belosludtseva V., Talanov E.Y., Tenkov K.S., Starinets V.S., Agafonov A.V., Pavlik L.L., Dubinin M.V. Effect of Bedaquiline on the Functions of Rat Liver Mitochondria // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2019, 1861 (1), P. 288-297.
41. Belosludtsev K.N., Belosludtseva V.V., Talanov E.Y., Tenkov K.S., Starinets V.S., Agafonov A.V., Pavlik L.L., Dubinin M.V. Effect of Bedaquiline on the Functions of Rat Liver Mitochondria // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2019, 1861(1), P. 288-297.
42. Belton M., Brilha S., Manavaki R., Mauri F., Nijran K., Hong Y.T., Patel N., Dembek M., Tezera L., Green J., Moores R., Aigbirhio F., Al-Nahhas A., Fryer T., Elkington P., Friedland J. Hypoxia and Tissue Destruction in Pulmonary TB // *Thorax*, 2016, 71(12), P. 1145-53.
43. Berg T., Hegelund-Myrbäck T., Öckinger J., Zhou X.H., Brännström M., Hagemann-Jensen M., Werkström V., et al. Expression of MATE1, P-gp, OCTN1 and OCTN2, in Epithelial and Immune Cells in the Lung of COPD and Healthy Individuals // *Respiratory Research*, 2018, 19(1), P. 68.
44. Berger E.A., Heppel L.A. Different Mechanisms of Energy Coupling for the Shock-Sensitive and Shock-Resistant Amino Acid Permeases of *Escherichia Coli* // *J. Biol. Chem.*, 1974, 249(24), P. 7747-55.
45. Bhagyaraj E., Nanduri R., Saini A., Dkhar H.K., Ahuja N., Chandra V., Mahajan S., Kalra R., Tiwari D., Sharma C., Janmeja A.K., Gupta P. Human Xenobiotic Nuclear Receptor PXR Augments *Mycobacterium Tuberculosis* Survival // *The Journal of Immunology*, 2016, 197(1), P. 244-55.
46. Bhagyaraj E., Tiwari D., Ahuja N., Nanduri R., Saini A., Kalra R., Kumar S., Janmeja A.K., Gupta P. A Human Xenobiotic Nuclear Receptor Contributes to Nonresponsiveness of *Mycobacterium tuberculosis* to the Antituberculosis Drug Rifampicin // *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(10), P. 3747.
47. Bi W., Zhu L., Wang C., Liang Y., Liu J., Shi Q., Tao E. Rifampicin Inhibits Microglial Inflammation and Improves Neuron Survival Against Inflammation // *Brain Research*, 2011, 1395, P. 12-20.
48. Biedler J.L., Riehm H. Cellular Resistance to Actinomycin D in Chinese Hamster Cells in Vitro: Cross-Resistance, Radioautographic, and Cytogenetic Studies // *Cancer Res.*, 1970, 30(4), P. 1174-84.
49. Bohrer A.C., Tocheny C., Assmann M., et al. Cutting Edge: IL-1R1 Mediates Host Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* by Trans-Protection of Infected Cells // *The Journal of Immunology*, 2018, 201(6), P. 1645–50.
50. Bonecini-Almeida M.G., Ho J.L., Boéchat N., et al. Down-Modulation of Lung Immune Responses by Interleukin-10 and Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and Analysis of TGF- $\beta$  Receptors I and II in Active Tuberculosis // *Infection and Immunity*, 2004, 72(5), P. 2628–34.
51. Boni F.G., Hamdi I., Koundi L.M., et al. Cytokine Storm in Tuberculosis and IL-6 Involvement // *Infection, Genetics and Evolution*, 2022, 97, P. 105-166.

52. Boni F.G., Hamdi I., Koundi L.M., Shrestha K., Xie J. Cytokine Storm in Tuberculosis and IL-6 Involvement // *Infection, Genetics and Evolution*, 2022, 97, P. 105166.
53. Borst P., Elferink R.O. Mammalian ABC Transporters in Health and Disease // *Annual Review of Biochemistry*, 2002, 71, P. 537-92.
54. Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. A Family of Drug Transporters: The Multidrug Resistance-Associated Proteins // *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 2000, 92(16), P. 1295-1302.
55. Bossennec M., Di Roio A., Caux C., Ménétrier-Caux C. MDR1 in Immunity: Friend or Foe? // *Oncoimmunology*, 2018, 7(12), e1499388.
56. Bost P., Giladi A., Liu Y., et al. Host-Viral Infection Maps Reveal Signatures of Severe COVID-19 Patients // *Cell*, 2020, 181(7), P. 1475-1488.e12.
57. Bost P., Giladi A., Liu Y., et al. Host-Viral Infection Maps Reveal Signatures of Severe COVID-19 Patients // *Cell*, 2020, 181(7), P. 1475-1488.e12.
58. Bruckmueller H., Cascorbi I. ABCB1, ABCG2, ABCC1, ABCC2, and ABCC3 Drug Transporter Polymorphisms and Their Impact on Drug Bioavailability: What Is Our Current Understanding? // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2021, 17(4), P. 369–96.
59. Burman W.J. The Value of in Vitro Drug Activity and Pharmacokinetics in Predicting the Effectiveness of Antimycobacterial Therapy: A Critical Review // *J Med Sci*, 1997, 313(6), P. 355-63.
60. Buss W.C., Kun E. Effects of Rifampicin on RNA and Protein Synthesis in Isolated Rat Liver Mitochondria // *Biochem Pharmacol*, 1978, 27(17), P. 2139-45.
61. Busse D., Templin S., Mikus G., Schwab M., Hofmann U., Eichelbaum M., Kivistö K.T. Cardiovascular Effects of (R)- and (S)-Verapamil and Racemic Verapamil in Humans: A Placebo-Controlled Study // *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2006, 62(8), P. 613-619.
62. Butler R.E., Brodin P., Jang J., Jang M.-S., Robertson B.D., Gicquel B., Stewart G.R. The Balance of Apoptotic and Necrotic Cell Death in Mycobacterium tuberculosis Infected Macrophages Is Not Dependent on Bacterial Virulence // *PLoS ONE*, 2012, 7(10), e47573.
63. Cahill C., Cox D.J., O'Connell F., Basdeo S.A., Gogan K.M., Ó'Maoldomhnaigh C., O'Sullivan J., Keane J., Phelan J.J. The Effect of Tuberculosis Antimicrobials on the Immunometabolic Profiles of Primary Human Macrophages Stimulated with Mycobacterium tuberculosis // *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(22), P. 12189.
64. Cahill C., Cox D.J., O'Connell F., Basdeo S.A., Gogan K.M., Ó'Maoldomhnaigh C., O'Sullivan J., Keane J., Phelan J.J. The Effect of Tuberculosis Antimicrobials on the Immunometabolic Profiles of Primary Human Macrophages Stimulated with Mycobacterium tuberculosis // *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(22), P. 12189.
65. Campbell E.A., Korzheva N., Mustaev A., Murakami K., Nair S., Goldfarb A., Darst S.A. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase // *Cell*, 2001, 104, P. 901-12.

66. Campbell L., Abulrob A.N., Kandalaf L.E., Plummer S., Hollins A.J., Gibbs A., Gumbleton M. Constitutive Expression of P-Glycoprotein in Normal Lung Alveolar Epithelium and Functionality in Primary Alveolar Epithelial Cultures // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2003, 304(1), P. 441-52.
67. Cascorbi I. Role of Pharmacogenetics of ATP-Binding Cassette Transporters in the Pharmacokinetics of Drugs // *Pharmacol. Ther.*, 2006, 112, P. 457-473.
68. Chamary J.V., Hurst L.D. The Price of Silent Mutations // *Scientific American*, 2009, 300(6), P. 46-53.
69. Chandler R.E. Serious Neurological Adverse Events after Ivermectin: Do They Occur Beyond the Indication of Onchocerciasis? // *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2018, 98, P. 382-388.
70. Chaudhary P.M., Mechetner E.B., Roninson I.B. Expression and Activity of the Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Human Peripheral Blood Lymphocytes // *Blood*, 1992, 80, P. 2735-39.
71. Chaudhary P.M., Roninson I.B. Expression and Activity of P-Glycoprotein, a Multidrug Efflux Pump, in Human Hematopoietic Stem Cells // *Cell*, 1991, 66(1), P. 85-94.
72. Chen C.J., Chin J.E., Ueda K., Clark D.P., Pastan I., Gottesman M.M., Roninson I.B. Internal Duplication and Homology with Bacterial Transport Proteins in the Mdr1 (P-Glycoprotein) Gene from Multidrug-Resistant Human Cells // *Cell*, 1986, 47(3), P. 381-89.
73. Chen C.K., Law W.C., Aalinkel R., Yu Y., Nair B., Wu J., Mahajan S., Reynolds J.L., Li Y., Lai C.K., Tzanakakis E.S., Schwartz S.A., Prasad P.N., Cheng C. Biodegradable Cationic Polymeric Nanocapsules for Overcoming Multidrug Resistance and Enabling Drug-Gene Co-Delivery to Cancer Cells // *Nanoscale*, 2014, 6(3), P. 1567-72.
74. Chen D., Wang J., Wang Y., Zhang F., Dong X., Jiang L., Tang Y., Zhang H., Li W. Promoting Inter-/Intra- Cellular Process of Nanomedicine through its Physicochemical Properties Optimization // *Curr Drug Metab*, 2018, 19(1), P. 75-82.
75. Chen H.K., Chen Y.L., Wang C.Y., et al. ABCB1 Regulates Immune Genes in Breast Cancer // *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 2023, Nov; 15, P. 801-11.
76. Chen J., Zhou F., Chen Q., Kang A., Lu M., Liu W., Zang X., Wang G., Zhang J. Chronic Inflammation Up-Regulates P-Gp in Peripheral Mononuclear Blood Cells via the STAT3/NF- $\kappa$ B Pathway in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis Mice // *Sci Rep.*, 2015, 5, P. 13558.
77. Chen M.L., Sun A., Cao W., Eliason A., Mendez K.M., Getzler A.J., Tsuda S., Diao H., Mukori C., Bruno E., Kim S.Y., Pipkin M.E., Koralov S.B., Sundrud M.S. Physiological Expression and Function of the MDR1 Transporter in Cytotoxic T Lymphocytes // *The Journal of Experimental Medicine*, 2020, 217(5), e20191388.
78. Chen Q., Bian Y., Zeng S. Involvement of AP-1 and NF- $\kappa$ B in the Up-Regulation of P-Gp in Vinblastine Resistant Caco-2 Cells // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2014, 29(2), P. 223-226.
79. Chen Z., Shi T., Zhang L., Zhu P., Deng M., Huang C., Hu T., Jiang L., Li J. Mammalian Drug Efflux Transporters of the ATP Binding Cassette (ABC) Family in Multidrug Resistance: A Review of the Past Decade // *Cancer Lett*, 2016, 370(1), P. 153-64.

80. Chigutsa E., Visser M.E., Swart E.C. The SLCO1B1 rs4149032 Polymorphism Is Highly Prevalent in South Africans and Is Associated with Reduced Rifampin Concentrations: Dosing Implications // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(9), P. 4122–27.
81. Cho H.J., Lim Y.J., Kim J., Koh W.J., Song C.H., Kang M.W. Different Macrophage Polarization between Drug-Susceptible and Multidrug-Resistant Pulmonary Tuberculosis // *BMC Infectious Diseases*, 2020, 20(1), P. 81.
82. Chowdhury A., Santra A., Bhattacharjee K., Ghatak S., Saha D.R., Dhali G.K. Mitochondrial Oxidative Stress and Permeability Transition in Isoniazid and Rifampicin Induced Liver Injury in Mice // *J Hepatol*, 2006, 45(1), P. 117-26.
83. Chowdhury I.H., Ahmed A.M., Choudhuri S., Sen A., Hazra A., Pal K., Bhattacharya B., Bahar B. Alteration of Serum Inflammatory Cytokines in Active Pulmonary Tuberculosis Following Anti-Tuberculosis Drug Therapy // *Molecular Immunology*, 2014, 62(1), P. 159-168.
84. Cohen S.B., Gern B.H., Delahaye J.L., et al. Alveolar Macrophages Provide an Early Mycobacterium tuberculosis Niche and Initiate Dissemination // *Cell Host Microbe*, 2018, 24(3), P. 439-446.e4.
85. Cole S.P., Bhardwaj G., Gerlach J.H., Mackie J.E., Grant C.E., Almquist K.C., Stewart A.J., Kurz E.U., Duncan A.M., Deeley R.G. Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line // *Science (New York, N.Y.)*, 1992, 258(5088), P. 1650-54.
86. Comerford K.M., Wallace T.J., Karhausen J., Louis N.A., Montalto M.C., Colgan S.P. Hypoxia-Inducible Factor-1-Dependent Regulation of the Multidrug Resistance (MDR1) Gene // *Cancer Research*, 2002, 62(12), P. 3387-3394.
87. Condic-Jurkic K., Subramanian N., Mark A.E., O'Mara M.L. The Reliability of Molecular Dynamics Simulations of the Multidrug Transporter P-Glycoprotein in a Membrane Environment // *PLoS ONE*, 2018, 13(1).
88. Cory T.J., He H., Winchester L.C., Kumar S., Fletcher C.V. Alterations in P-Glycoprotein Expression and Function Between Macrophage Subsets // *Pharmaceutical Research*, 2016, 33(11), P. 2713-21.
89. Cory T.J., He H., Winchester L.C., Kumar S., Fletcher C.V. Alterations in P-Glycoprotein Expression and Function Between Macrophage Subsets // *Pharmaceutical Research*, 2016, 33(11), P. 2713-21.
90. Cronan M.R., Hughes E.J., Brewer W.J., Viswanathan G., Hunt E.G., Singh B., Mehra S., Oehlers S.H., Gregory S.G., Kaushal D., Tobin D.M. A Non-Canonical Type 2 Immune Response Coordinates Tuberculous Granuloma Formation and Epithelialization // *Cell*, 2021, 184(7), P. 1757-1774.e14.
91. da Luz C.M., Boyles M.S., Falagan-Lotsch P., Pereira M.R., Tutumi H.R., de Oliveira Santos E., Martins N.B., Himly M., Sommer A., Foissner I., Duschl A., Granjeiro J.M., Leite P.E. Poly-Lactic Acid Nanoparticles (PLA-NP) Promote Physiological Modifications in Lung Epithelial Cells and Are Internalized by Clathrin-Coated Pits and Lipid Rafts // *J Nanobiotechnology*, 2017, 15(1), P. 11.
92. Demitto F.O., Ribeiro do Amaral R.C., Maltempe F.G., Dias Siqueira V.L., Bertin de Lima Scodro R., Lopes M.A., Caleffi-Ferracioli K.R., Canezin P.H., Car-

doso R.F. In Vitro Activity of Rifampicin and Verapamil Combination in Multi-drug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis // *PloS One*, 2015, 10(2), e0116545.

93. DiFazio R.M., Mattila J.T., Klein E.C., Cirrincione L.R., Howard M., Wong E.A., Flynn J.L. Active Transforming Growth Factor- $\beta$  Is Associated with Phenotypic Changes in Granulomas after Drug Treatment in Pulmonary Tuberculosis // *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 2016, 9(1), P. 6.

94. Ding Z., Yang L., Xie X., Xie F., Pan F., Li J., He J., Liang H. Expression and Significance of Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha and MDR1/P-Glycoprotein in Human Colon Carcinoma Tissue and Cells // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2010, 136(11), P. 1697-1707.

95. Domingo-Gonzalez R., Prince O., Cooper A., Khader S.A. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection // *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(5).

96. Domingo-Gonzalez R., Prince O., Cooper A., Khader S.A. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection // *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(5).

97. Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K., Ross D.D. A Multidrug Resistance Transporter from Human MCF-7 Breast Cancer Cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(26), P. 15665-70.

98. Drach J., Gsur A., Hamilton G., et al. Involvement of P-Glycoprotein in the Transmembrane Transport of Interleukin-2 (IL-2), IL-4, and Interferon-Gamma in Normal Human T Lymphocytes // *Blood*, 1996, 88(5), P. 1747–54.

99. Dutta R.K., Kathania M., Raje M., Majumdar S. IL-6 Inhibits IFN- $\gamma$  Induced Autophagy in Mycobacterium tuberculosis H37Rv Infected Macrophages // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44(6), P. 942-954.

100. Ehrhardt C., Bäckman P., Couet W., Edwards C., Forbes B., Fridén M., Gumbleton M., Hosoya K., Kato Y., Nakanishi T., Takano T., Terasaki T. Current Progress toward a Better Understanding of Drug Disposition within the Lungs: Summary Proceedings of the 1st Workshop on Drug Transporters in the Lungs // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 106(9), P. 2234 - 44

101. Endicott J.A., Victor L. The Biochemistry of P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance // *Annu Rev Biochem.*, 1989, 58, P. 137-71.

102. Endter S., Becker U., Daum N., Huwer H., Lehr C.M., Gumbleton M., Ehrhardt C. P-Glycoprotein (MDR1) Functional Activity in Human Alveolar Epithelial Cell Monolayers // *Cell and Tissue Research*, 2007, 328(1), P. 77-84.

103. Erokhina M., Rybalkina E., Barsegyan G., Onishchenko G., Lepekha L. The Toxicity of Rifampicin Polylactic Acid Nanoparticles Against Mycobacterium Bovis BCG and Human Macrophage THP-1 Cell Line // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2015, 98, P. 1–9.

104. Erokhina M.V., Lepekha L.N., Voronezhskaya E.E., Nezlin L.P., Avdienko V.G., Ergeshov A.E. Application of Laser Scanning Confocal Microscopy for the Visualization of M. Tuberculosis in Lung Tissue Samples with Weak Ziehl–Neelsen Staining // *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8, P. 1185–1199.

105. Erokhina M.V., Nezlin L.P., Avdienko V.G., Voronezhska E.E. Immunohistochemical Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Tissues of Consumptives Using Laser Scanning Microscopy // *Biology Bulletin*, 2016, 43(1), P. 21-25.

106. Erokhina M.V., Pavlova E.N., Tarasova E.K., et al. Nanoparticles of Lactic Acid Polymer with Rifampicin Decrease the P-gp Multidrug Transporter Activity in Human Macrophages // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, 2022, 77, P. 152–158.

107. Fardel O., Lecreur V., Loyer P., Guillouzo A. Rifampicin Enhances Anti-Cancer Drug Accumulation and Activity in Multidrug-Resistant Cells // *Biochemical Pharmacology*, 1995, 49(9), P. 1255-60.

108. FDA Guidance for Industry Pharmacokinetics in Patients with Impaired Renal Function - Study Design, Data Analysis and Impact on Dosing and Labeling // *Clinical Pharmacology*, 2010, P. 1-21.

109. FDA Guidance for Industry. Drug Interaction Studies: Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations // *Guidance Document*, 2017, P. 1-79.

110. Fergusson J.R., Ussher J.E., Kurioka A., Klenerman P., Walker L.J. High MDR-1 Expression by MAIT Cells Confers Resistance to Cytotoxic but Not Immunosuppressive MDR-1 Substrates // *Clinical and Experimental Immunology*, 2018, 194(2), P. 180-191.

111. Ferreira M., Costa J., Reis-Henriques M.A. ABC Transporters in Fish Species: A Review // *Front Physiol.*, 2014, 5:266.

112. Fiorenza G., Rateni L., Farroni M.A., Bogué C., Dlugovitzky D.G. TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and NO Relationship in Sera from Tuberculosis (TB) Patients of Different Severity // *Immunology Letters*, 2005, 98(1), P. 45-48.

113. Florea B.I., van der Sandt I.C., Schrier S.M., Kooiman K., Deryckere K., de Boer A.G., Junginger H.E., Borchard G. Evidence of P-Glycoprotein Mediated Apical to Basolateral Transport of Flunisolide in Human Broncho-Tracheal Epithelial Cells (Calu-3) // *British Journal of Pharmacology*, 2001, 134, P. 1555-63.

114. Fromm M.F. Importance of P-Glycoprotein at Blood-Tissue Barriers // *Trends in Pharmacological Sciences*, 2004, 25(8), P. 423-29.

115. Fung K.L., Gottesman M.M. A Synonymous Polymorphism in a Common MDR1 (ABCB1) Haplotype Shapes Protein Function // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1794(5), P. 860–71.

116. Gadaleta M.N., Greco M., Saccone C. The Effect of Rifampicin on Mitochondrial RNA Polymerase from Rat Liver // *FEBS Letters*, 1970, 10, P. 54-56.

117. Galetin A., Brouwer K.L.R., Tweedie D., Yoshida K., Sjöstedt N., Aleksunes L., Chu X., Evers R., Hafey M.J., Lai Y., Matsson P., Riselli A., Shen H., Sparreboom A., Varma M.V.S., Yang J., Yang X., Yee S.W., Zamek-Gliszczynski M.J., Zhang L., Giacomini K.M. Membrane Transporters in Drug Development and as Determinants of Precision Medicine // *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2024, 23, P. 255–280.

118. Gao Y., Zhao H., Wang P., Wang J., Zou L. The Roles of SOCS3 and STAT3 in Bacterial Infection and Inflammatory Diseases // *Scandinavian Journal of Immunology*, 2018, 88(6), e12727.

119. Geick A., Eichelbaum M., Burk O. Nuclear Receptor Response Elements Mediate Induction of Intestinal MDR1 by Rifampin // *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(18), P. 14581-87.

120. Geick A., Eichelbaum M., Burk O. Nuclear Receptor Response Elements Mediate Induction of Intestinal MDR1 by Rifampin // *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(18), P. 14581-14587.
121. Gerlach J.H., Endicott J.A., Juranka P.F., Henderson G., Sarangi F., Deuchars K.L., Ling V. Homology between P-Glycoprotein and a Bacterial Haemolysin Transport Protein Suggests a Model for Multidrug Resistance // *Nature*, 1986, 324(6096), P. 485-89.
122. Germann U.A. P-Glycoprotein: A Mediator of Multidrug Resistance in Tumour Cells // *Eur J Cancer*, 1996, 32A(6), P. 927-44.
123. Gern B.H., Adams K.N., Plumlee C.R., Stoltzfus C.R., Shehata L., Moguche A.O., Busman-Sahay K., Hansen S.G., Axthelm M.K., Picker L.J., Estes J.D., Urdahl K.B., Gerner M.Y. TGF $\beta$  Restricts Expansion, Survival, and Function of T Cells within the Tuberculous Granuloma // *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(4), P. 594-606.
124. Ghanavi J., Farnia P., Velayati A.A. The Role of Interferon-Gamma and Interferon-Gamma Receptor in Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections // *The International Journal of Mycobacteriology*, 2021, 10(4), P. 349.
125. Giller D.B., Giller B.D., Giller G.V., Shcherbakova G.V., Bizhanov A.B., Enilenis I.I., Glotov A.A. Treatment of Pulmonary Tuberculosis: Past and Present // *Eur J Cardiothorac Surg*, 2018, 53(5), P. 967-972.
126. Giraud-Gatineau A., Coxa J.M., Maure A., Biton A., Thomson M., Bernard E.M., Marrec J., Gutierrez M.G., Larrouy-Maumus G., Brosch R., Gicquel B., Tailleux L. The Antibiotic Bedaquiline Activates Host Macrophage Innate Immune Resistance to Bacterial Infection // *eLife*, 2020, 9, e55692.
127. Gleeson L.E., O'Leary S.M., Ryan D., McLaughlin A.M., Sheedy F.J., Keane J. Cigarette Smoking Impairs the Bioenergetic Immune Response to Mycobacterium tuberculosis Infection // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2018, 59(5), P. 572-579.
128. Gold M.C., Cerri S., Smyk-Pearson S., Cansler M.E., Vogt T.M., Delepine J., Winata E., Swarbrick G.M., Chua W.-J., Yu Y.Y.L., Lantz O., Cook M.S., Null M.D., Jacoby D.B., Harriff M.J., Lewinsohn D.A., Hansen T.H., Lewinsohn D.M. Human Mucosal Associated Invariant T Cells Detect Bacterially Infected Cells // *PLOS Biology*, 2010, 8(6), e1000407.
129. Gollapudi S., Gupta S. Anti-P-Glycoprotein Antibody-Induced Apoptosis of Activated Peripheral Blood Lymphocytes: A Possible Role of P-Glycoprotein in Lymphocyte Survival // *Journal of Clinical Immunology*, 2001, 21(6), P. 420-430.
130. Gollapudi S., Reddy M., Gangadharam P., Tsuruo T., Gupta S. Mycobacterium Tuberculosis Induces Expression of P-Glycoprotein in Promonocytic U1 Cells Chronically Infected with HIV Type 1 // *BiochemBiophys Res Commun*, 1994, 199(3), P. 1181-87.
131. Gottesman M.M., Hrycyna C.A., Schoenlein P.V., Germann U.A., Pastan I. Genetic Analysis of the Multidrug Transporter // *Annual Review of Genetics*, 1995, 29, P. 607-49.
132. Gottesman M.M., Pastan I. Biochemistry of Multidrug Resistance Mediated by the Multidrug Transporter // *Annu Rev Biochem.*, 1993, 62(1), P. 385-427.
133. Gros P., Croop J., Housman D. Mammalian Multidrug Resistance Gene: Complete cDNA Sequence Indicates Strong Homology to Bacterial Transport Proteins // *Cell*, 1986, 47(3), P. 371-80.

134. Gupta S., Kim C.H., Tsuruo T., Gollapudi S. Preferential Expression and Activity of Multidrug Resistance Gene 1 Product (P-Glycoprotein), a Functionally Active Efflux Pump, in Human CD8+ T Cells: A Role in Cytotoxic Effector Function // *Journal of Clinical Immunology*, 1992, 12(6), P. 451-58.

135. Gupta S., Tyagi S., Almeida D.V., Maiga M.C., Ammerman N.C., Bishai W.R. Acceleration of Tuberculosis Treatment by Adjunctive Therapy with Verapamil as an Efflux Inhibitor // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013, 188(5), P. 600–607.

136. Gupta S., Tyagi S., Bishai W.R. Verapamil Increases the Bactericidal Activity of Bedaquiline against Mycobacterium Tuberculosis in a Mouse Model // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(1), P. 673–76.

137. Guzmán-Beltrán S., Carreto-Binaghi L.E., Carranza C., Torres M., Gonzalez Y., Muñoz-Torrico M., Juárez E. Oxidative Stress and Inflammatory Mediators in Exhaled Breath Condensate of Patients with Pulmonary Tuberculosis: A Pilot Study with a Biomarker Perspective // *Antioxidants*, 2021, 10(10), P. 1572.

138. Haas A. The Phagosome: Compartment with a License to Kill // *Traffic*, 2007, 8(4), P. 311-30.

139. Hamilton K.O., Backstrom G., Yazdanian M.A., Audus K.L. P-Glycoprotein Efflux Pump Expression and Activity in Calu-3 Cells // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 90, P. 647-58.

140. Hartkoorn R.C., Chandler B., Owen A., Ward S.A., Bertel Squire S., Back D.J., Khoo S.H. Differential Drug Susceptibility of Intracellular and Extracellular Tuberculosis, and the Impact of P-Glycoprotein // *Tuberculosis*, 2007, 87(3), P. 248-55.

141. Hartz A.M., Bauer B., Fricker G., Miller D.S. Rapid Modulation of P-Glycoprotein-Mediated Transport at the Blood-Brain Barrier by Tumor Necrosis Factor-Alpha and Lipopolysaccharide // *Mol Pharmacol*, 2006, 69, P. 462-70.

142. He D., Bai F., Zhang S., et al. High Incidence of Tuberculosis Infection in Rheumatic Diseases and Impact for Chemoprophylactic Prevention of Tuberculosis Activation During Biologics Therapy // *Clinical and Vaccine Immunology*, 2013, 20(6), P. 842–7.

143. Heinrich P.C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H.M., Müller-Newen G., Schaper F. Principles of Interleukin (IL)-6-Type Cytokine Signalling and Its Regulation // *The Biochemical Journal*, 2003, 374(1), P. 1-20.

144. Henriksen S.A., Pohlenz J.F. Staining of Cryptosporidia by a Modified Ziehl-Neelsen Technique // *Acta Vet Scand*, 1981, 22, P. 594-96.

145. Herr A.S., Wochnik G.M., Rosenhagen M.C., Holsboer F., Rein T. Rifampicin Is Not an Activator of Glucocorticoid Receptor // *Molecular Pharmacology*, 2000, 57(4), P. 732-737.

146. Hirota K., Hasegawa T., Nakajima T., Inagawa H., Kohchi C., Soma G., Makino K., Terada H. Delivery of Rifampicin-PLGA Microspheres into Alveolar Macrophages Is Promising for Treatment of Tuberculosis // *Journal of Controlled Release*, 2010, 142(3), P. 339-46.

147. Ho E.A., Piquette-Miller M. Regulation of Multidrug Resistance by Pro-Inflammatory Cytokines // *Current Cancer Drug Targets*, 2006, 6(4), P. 295-311.

148. Hodges L.M., Markova S.M., Chinn L.W., Gow J.M., Kroetz D.L., Klein T.E., Altman R.B. Very Important Pharmacogene Summary: ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) // *Pharmacogenet. Genomics*, 2011, 21, P. 152–161.
149. Hodges L.M., Markova S.M., Chinn L.W., Gow J.M., Kroetz D.L., Klein T.E., Altman R.B. Very Important Pharmacogene Summary: ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) // *Pharmacogenetics and Genomics*, 2011, 21(3), P. 152–61.
150. Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H.P., Brockmöller J., Johné A., Cascorbi I., et al. Functional Polymorphisms of the Human Multidrug-Resistance Gene: Multiple Sequence Variations and Correlation of One Allele with P-Glycoprotein Expression and Activity in Vivo // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(7), P. 3473–78.
151. Hu D.G., Mackenzie P.I., Nair P.C., McKinnon R.A., Meech R. The Expression Profiles of ADME Genes in Human Cancers and Their Associations with Clinical Outcomes // *Cancers*, 2020, 12, P. 3369.
152. Huard R.C., Chitale S., Leung M., et al. The Mycobacterium tuberculosis Complex-Restricted Gene *cfp32* Encodes an Expressed Protein That Is Detectable in Tuberculosis Patients and Is Positively Correlated with Pulmonary Interleukin-10 // *Infection and Immunity*, 2003, 71(12), P. 6871–83.
153. Huerta-García A.P., Medellín-Garibay S.E., Salazar-González R.A., et al. Anthropometric and Genetic Factors Associated with the Exposure of Rifampicin and Isoniazid in Mexican Patients with Tuberculosis // *Therapeutic Drug Monitoring*, 2019, 41, P. 648–56.
154. Hunter R.L. The Pathogenesis of Tuberculosis—The Koch Phenomenon Reinstated // *Pathogens*, 2020, 9(10), P. 813.
155. Hyde S.C., Emsley P., Hartshorn M.J., Mimmack M.M., Gileadi U., Pearce S.R., Gallagher M.P., Gill D.R., Hubbard R.E., Higgins C.F. Structural Model of ATP-Binding Proteins Associated with Cystic Fibrosis, Multidrug Resistance and Bacterial Transport // *Nature*, 1990, 346(6282), P. 362–65.
156. Idriss H.T., Hannun Y.A., Boulpaep E., Basavappa S. Regulation of Volume-Activated Chloride Channels by P-Glycoprotein: Phosphorylation Has the Final Say! // *The Journal of Physiology*, 2000, 524 Pt 3, P. 629–36.
157. Jaffuel D., Demoly P., Gougat C., Mautino G., Bousquet J., Mathieu M. Rifampicin Is Not an Activator of the Glucocorticoid Receptor in A549 Human Alveolar Cells // *Molecular Pharmacology*, 1999, 55(5), P. 841–846.
158. Jayaraman P., Sada-Ovalle I., Nishimura T., Anderson A.C., Kuchroo V.K., Remold H.G., Behar S.M. IL-1 $\beta$  Promotes Antimicrobial Immunity in Macrophages by Regulating TNFR Signaling and Caspase-3 Activation // *Journal of Immunology*, 2013, 190(8), P. 4196–4204.
159. Jing J., Yang I.V., Hui L., Patel J.A., Evans C.M., Prikeris R., Kobzik L., O'Connor B.P., Schwartz D.A. Role of Macrophage Receptor with Collagenous Structure in Innate Immune Tolerance // *J. Immunol.*, 2013, 190(12), P. 6360–7.
160. Jittikoon J., Mahasirimongkol S., Charoenyingwattana A., Chaikledkaew U., Tragulpiankit P., Mangmool S., Inunchot W., et al. Comparison of Genetic Variation in Drug ADME-Related Genes in Thais with Caucasian, African and Asian

HapMap Populations // *Journal of Human Genetics*, 2016, 61(2), P. 119–27. The International Transporter Consortium, Giacomini K.M., Huang S.M., Tweedie D.J., Benet L.Z., Brouwer K.L.R., Chu X., et al. Membrane Transporters in Drug Development // *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, 9(3), P. 215–36.

161. Johnson Z.L., Chen J. Structural Basis of Substrate Recognition by the Multidrug Resistance Protein MRP1 // *Cell*, 2017, 168, P. 1075-85.

162. Jordao L., Bleck C.K., Mayorga L., Griffiths G., Anes E. On the Killing of Mycobacteria by Macrophages // *Cell Microbiol*, 2008, 10, P. 529-548.

163. Juliano R.L., Ling V. A Surface Glycoprotein Modulating Drug Permeability in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants // *BBA-Biomembranes*, 1976, 455(1), P. 152-62.

164. Kallura et al., 2013).

165. Kalluru R., Fenaroli F., Westmoreland D., Ulanova L., Maleki A., Roos N., Paulsen Madsen M., Koster G., Egge-Jacobsen W., Wilson S., Roberg-Larsen H., Khuller G.K., Singh A., Nyström B., Griffiths G. Poly (Lactide-Co-Glycolide)-Rifampicin Nanoparticles Efficiently Clear Mycobacterium Bovis BCG Infection in Macrophages and Remain Membrane-Bound in Phago-Lysosomes // *Journal of Cell Science*, 2013, 126(Pt 14), P. 3043-54.

166. Kalra B.S., Aggarwal S., Khurana N., Gupta U. Effect of Cimetidine on Hepatotoxicity Induced by Isoniazid-Rifampicin Combination in Rabbits // *Indian J Gastroenterol*, 2007, 26(1), P. 18-21.

167. Khan A., Singh V.K., Hunter R.L., Jagannath C. Macrophage Heterogeneity and Plasticity in Tuberculosis // *Journal of Leukocyte Biology*, 2019, 106(2), P. 275-282.

168. Khan T.A., Mazhar H., Saleha S., Tipu H., Muhammad N., Abbas M. Interferon-Gamma Improves Macrophages Function Against M. tuberculosis in Multi-drug-Resistant Tuberculosis Patients // *Chemotherapy Research and Practice*, 2016, 2016, e7295390.

169. Khoshnood S., Goudarzi M., Taki E., Darbandi A., Kouhsari E., Heidary M., Motahar M., Moradi M., Bazayr H. Bedaquiline: Current Status and Future Perspectives // *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2021, 25, P. 48-59.

170. Kim B.-H., Shenoy A.R., Kumar P., Das R., Tiwari S., MacMicking J.D. A Family of IFN- $\gamma$ -Inducible 65-kD GTPases Protects Against Bacterial Infection // *Science*, 2011, 332(6030), P. 717-721.

171. Kim M.S., Haney M.J., Zhao Y., Mahajan V., Deygen I., Klyachko N.L., Inskoe E., Piroyan A., Sokolsky M., Okolie O., Hingtgen S.D., Kabanov A.V., Batrakova E.V. Development of Exosome-Encapsulated Paclitaxel to Overcome MDR in Cancer Cells // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2016, 12(3), P. 655-64.

172. Kim S.W., Hasanuzzaman M., Cho M., Heo Y.R., Ryu M.-J., Ha N.-Y., Park H.J., Park H.-Y., Shin J.-G. Casein Kinase 2 (CK2)-Mediated Phosphorylation of Hsp90 $\beta$  as a Novel Mechanism of Rifampin-Induced MDR1 Expression // *The Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(27), P. 17029-17040.

173. Kimchi-Sarfaty C., Oh J.M., Kim I.W., Sauna Z.E., Calcagno A.M., Ambudkar S.V., Gottesman M.M. A “Silent” Polymorphism in the MDR1 Gene Changes Substrate Specificity // *Science (New York, N.Y.)*, 2007, 315(5811), P. 525–28.

174. Kimura Y., Morita S.Y., Matsuo M., Ueda K. Mechanism of Multidrug Recognition by MDR1/ABCB1 // *Cancer Science*, 2007, 98(9), P. 1303-10.
175. Kioka N., Tsubota J., Kakehi Y., Komano T., Gottesman M.M., Pastan I., Ueda K. P-Glycoprotein Gene (MDR1) cDNA from Human Adrenal: Normal P-Glycoprotein Carries Gly185 with an Altered Pattern of Multidrug Resistance // *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1989, 162(1), P. 224-31.
176. Klimecki W.T., Futscher B.W., Grogan T.M., Dalton W.S. P-Glycoprotein Expression and Function in Circulating Blood Cells from Normal Volunteers // *Blood*, 1994, 83(9), P. 2451-58.
177. Klimecki W.T., Taylor C.W., Dalton W.S. Inhibition of Cell-Mediated Cytolysis and P-Glycoprotein Function in Natural Killer Cells by Verapamil Isomers and Cyclosporine A Analogs // *Journal of Clinical Immunology*, 1995, 15(3), P. 152-58.
178. Kooij G., Backer R., Koning J.J., et al. P-Glycoprotein Acts as an Immunomodulator During Neuroinflammation // *PLoS ONE*, 2009, 4(12), e8212.
179. Kreider T., Anthony R.M., Urban Jr. J.F., Gause W.C. Alternatively Activated Macrophages in Helminth Infections // *Curr. Opin. Immunol.*, 2007, 19(4), P. 448-453.
180. Kumar N.P., Moideen K., Banurekha V.V., et al. Plasma Proinflammatory Cytokines Are Markers of Disease Severity and Bacterial Burden in Pulmonary Tuberculosis // *Open Forum Infectious Diseases*, 2019, 6(7).
181. Kumar P., Moideen K., Banurekha V.V., Nair D., Babu S. Plasma Proinflammatory Cytokines Are Markers of Disease Severity and Bacterial Burden in Pulmonary Tuberculosis // *Open Forum Infectious Diseases*, 2019, 6(7), ofz257.
182. Kumar S., Mehta K. Tissue Transglutaminase Constitutively Activates HIF-1 $\alpha$  Promoter and Nuclear Factor- $\kappa$ B via a Non-Canonical Pathway // *PLoS ONE*, 2012, 7(11), e49321.
183. Ladel C.H., Blum C., Dreher A., Reifenberg K., Kopf M., Kaufmann S.H. Lethal Tuberculosis in Interleukin-6-Deficient Mutant Mice // *Infection and Immunity*, 1997, 65(11), P. 4843-4849.
184. Lastrucci C., Bénard A., Balboa L., Pingris K., Souriant S., Poincloux R., Al Saati T., Rasolofy V., González-Montaner P., Inwentarz S., Moraña E.J., Kondova I., Verreck F.A., Sasiain Mdel C., Neyrolles O., Maridonneau-Parini I., Lugo-Villarino G., Cougoule C. Tuberculosis Is Associated with Expansion of a Motile, Permissive and Immunomodulatory CD16(+) Monocyte Population via the IL-10/STAT3 Axis // *Cell Research*, 2015, 25(12), P. 1333-1351.
185. Lechapt-Zalcman E., Hurbain I., Lacave R., Commo F., Urban T., Antoine M., Milleron B., Bernaudin J.F. MDR1-Pgp 170 Expression in Human Bronchus // *European Respiratory Journal*, 1997, 10(8), P. 1837-43.
186. Lee B.K., Yun Y., Park K. PLA Micro- and Nano-Particles // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 107, P. 176-191.
187. Lee G., Dallas S., Hong M., Bendayan R. Drug Transporters in the Central Nervous System: Brain Barriers and Brain Parenchyma Considerations // *Pharmacological Reviews*, 2001, 53(4), P. 569-96.
188. Lerner-Marmarosh N., Gimi K., Urbatsch I.L., Gros P., Senior A.E. Large Scale Purification of Detergent-Soluble P-Glycoprotein from *Pichia Pastoris* Cells and

Characterization of Nucleotide Binding Properties of Wild-Type, Walker A, and Walker B Mutant Proteins // *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(49), P. 34711-18.

189. Leschziner G., Zabaneh D., Pirmohamed M., Owen A., Rogers J., Coffey A.J., Balding D.J., Bentley D.B., Johnson M.R. Exon Sequencing and High Resolution Haplotype Analysis of ABC Transporter Genes Implicated in Drug Resistance // *Pharmacogenetics and Genomics*, 2006, 16(6), P. 439–50.

190. Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P.C. Multidrug Resistance Proteins: Role of P-Glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in Tissue Defense // *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 204, P. 216-37.

191. Li Y., Huang L., Wei X., Wen J., Zhong G., Huang M., Bi H. Regulation of P-Glycoprotein Gene Expression by PKC/NF- $\kappa$ B-PXR Signaling Pathway // *Yaoxue Xuebao*, 2017, 52, P. 51-57.

192. Lim Y.H., Tiemann K.M., Hunstad D.A., Elsabahy M., Wooley K.L. Polymeric Nanoparticles in Development for Treatment of Pulmonary Infectious Diseases // *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2016, 8(6), P. 842-871.

193. Liptrott N.J., Penny M., Bray P.G., et al. The Impact of Cytokines on the Expression of Drug Transporters, Cytochrome P450 Enzymes and Chemokine Receptors in Human PBMC // *Br J Pharmacol*, 2009, 156, P. 497-508.

194. Liptrott N.J., Penny M., Bray P.G., et al. The Impact of Cytokines on the Expression of Drug Transporters, Cytochrome P450 Enzymes and Chemokine Receptors in Human PBMC // *Br J Pharmacol*, 2009, 156, P. 497-508.

195. Litwin A., Brooks S.M., Claes F. A Pilot Study Concerning the Early Immunosuppressive Effects of Rifampin in Man // *Chest*, 1974, 65(5), P. 548-551.

196. Liu J., Zhou F., Chen Q., Kang A., Lu M., Liu W., Zang X., Wang G., Zhang J. Chronic Inflammation Up-Regulates P-Gp in Peripheral Mononuclear Blood Cells via the STAT3/NF- $\kappa$ B Pathway in 2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Colitis Mice // *Scientific Reports*, 2015, 5, P. 13558.

197. Liu Q., Ou Q., Chen H., Gao Y., Liu L., Xu Y., Ruan Q., Zhang W., Zhang L. Differential Expression and Predictive Value of Monocyte Scavenger Receptor CD163 in Populations with Different Tuberculosis Infection Statuses // *BMC Infectious Diseases*, 2019, 19(1).

198. Liu R., Muliadi V., Mou W., Li H., Yuan J., Holmberg J., Chambers B.J., Ullah W., Wurth J., Alzrigat M., Schlisio S., Carow B., Larsson L.G., Rottenberg M.E. HIF-1 Stabilization in T Cells Hampers the Control of Mycobacterium tuberculosis Infection // *Nature Communications*, 2022, 13(1), P. 5093.

199. Liu T., Huang T., Li J., Li A., Li C., Huang X., Li D., Wang S., Liang M. Optimization of Differentiation and Transcriptomic Profile of THP-1 Cells into Macrophage by PMA // *PLOS ONE*, 2023, 18(7), e0286056.

200. Liu Y., Lo Y.-C., Qian L., Crews F.T., Wilson B., Chen H.-L., Wu H.-M., Chen S.-H., Wei K., Lu R.-B., Ali S., Hong J.-S. Verapamil Protects Dopaminergic Neuron Damage Through a Novel Anti-Inflammatory Mechanism by Inhibition of Microglial Activation // *Neuropharmacology*, 2011, 60(2-3), P. 373-380.

201. Loo T.W., Clarke D.M. The Transmembrane Domains of the Human Multidrug Resistance P-Glycoprotein Are Sufficient to Mediate Drug Binding and Trafficking to the Cell Surface // *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, P. 24759–65.

202. López-Fernández L.A. ATP-Binding Cassette Transporters in the Clinical Implementation of Pharmacogenetics // *J. Pers. Med.*, 2018, 8, P. 40.
203. Lyadova I.V., Pantelev A.V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers // *Mediators of Inflammation*, 2015, 2015, P. 854507.
204. Lyadova I.V., Tsiganov E.N., Kapina M.A., et al. In Mice, Tuberculosis Progression Is Associated with Intensive Inflammatory Response and the Accumulation of Gr-1dim Cells in the Lungs // *PLoS ONE*, 2010, 5(5), e10469.
205. Lyamzaev K.G., Nepryakhina O.K., Saprunova V.B., Bakeeva L.E., Plet-jushkina O.Y., Chernyak B.V., Skulachev V.P. Novel Mechanism of Elimination of Malfunctioning Mitochondria (Mitoptosis): Formation of Mitoptotic Bodies and Extrusion of Mitochondrial Material from the Cell // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2008, 1777(7–8), P. 817-25.
206. Lyu X.-L., Lin T.-T., Gao J.-T., Jia H.-Y., Zhu C.-Z., Li Z.-H., Dong J., Sun Q., Shu W., Wang S.-S., Pan L.-P., Huang H.-R., Zhang Z.-D., Li Q. Effects of Bedaquiline on Antimicrobial Activity and Cytokine Secretion of Macrophages Infected with Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains // *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2022, 2022, e2703635.
207. Magnarin M., Morelli M., Rosati A., Bartoli F., Candussio L., Giraldi T., Decorti G. Induction of Proteins Involved in Multidrug Resistance (P-Glycoprotein, MRP1, MRP2, LRP) and of CYP 3A4 by Rifampicin in LLC-PK1 Cells // *Eur Journal of Pharmacology*, 2004, 483(1), P. 19-28.
208. Maliepaard M., Scheffer G.L., Faneyte I.F., van Gastelen M.A., Pijnenborg A.C., Schinkel A.H., van De Vijver M.J., Scheper R.J., Schellens J.H. Subcellular Localization and Distribution of the Breast Cancer Resistance Protein Transporter in Normal Human Tissues // *Cancer Research*, 2001, 61(8), P. 3458-64.
209. Mantovani A., Biswas S.K., Galdiero M.R., Sica A., Locati M. Macrophage Plasticity and Polarization in Tissue Repair and Remodeling // *J. Pathol.*, 2013, 229(2), P. 176–185.
210. Mao S., Guo C., Shi Y., Li L.C. Recent Advances in Polymeric Microspheres for Parenteral Drug Delivery. Part 1 // *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2012a, 6, P. 1161-76.
211. Mao S., Guo C., Shi Y., Li L.C. Recent Advances in Polymeric Microspheres for Parenteral Drug Delivery. Part 2 // *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2012b, 9, P. 1209-23.
212. Marino S., Cilfone N.A., Mattila J.T., Linderman J.J., Flynn J.L., Kirschner D.E. Macrophage Polarization Drives Granuloma Outcome during Mycobacterium Tuberculosis Infection // *Infection and Immunity*, 2015, 83(1), P. 324–38.
213. Martin C., Higgins C.F., Callaghan R. The Vinblastine Binding Site Adopts High- and Low-Affinity Conformations during a Transport Cycle of P-Glycoprotein // *Biochemistry*, 2001, 40, P. 15733-42.
214. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage Activation and Polarization // *Front. Biosci.*, 2008, 1(13), P. 453–461.
215. Master S.S., Rampini S.K., Davis A.S., et al. Mycobacterium tuberculosis Prevents Inflammasome Activation // *Cell Host Microbe*, 2008, 3(4), P. 224–32.
216. Mattu C., Pabari R.M., Boffito M., Sartori S., Ciardelli G., Ramtoola Z. Comparative Evaluation of Novel Biodegradable Nanoparticles for the Drug Targeting to Breast Cancer Cells // *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85, P. 463–72.

217. McMillan S.J., Kearley J., Campbell J.D., Zhu X.W., Larbi K.Y., Shipley J.M., Senior R.M., Nourshargh S., Lloyd C.M. Matrix Metalloproteinase-9 Deficiency Results in Enhanced Allergen-Induced Airway Inflammation // *J. Immunol.*, 2004, 172(4), P. 2586–94.

218. Mealey K.L., Bentjen S.A., Gay J.M., Cantor G.H. Ivermectin Sensitivity in Collies Is Associated with a Deletion Mutation of the MDR1 Gene // *Pharmacogenetics*, 2001, 11, P. 727–733.

219. Mealey K.L., Burke N.S. Identification of a Nonsense Mutation in Feline ABCB1 // *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 2015, 38, P. 429–433.

220. Mealey K.L., Owens J.G., Freeman E. Canine and Feline P-Glycoprotein Deficiency: What We Know and Where We Need to Go // *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 2023, 46, P. 1–16.

221. Medellin-Garibay S.E., Huerta-Garcia A.P., Rodriguez-Baez A.S., et al. A Population Approach of Rifampicin Pharmacogenetics and Pharmacokinetics in Mexican Patients with Tuberculosis // *Tuberculosis*, 2020, 124, 101982.

222. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm // *The Journal of Immunology*, 2000, 164(12), P. 6166-73.

223. Mohandas S., Vairappan B. Role of Pregnane X-Receptor in Regulating Bacterial Translocation in Chronic Liver Diseases // *World Journal of Hepatology*, 2017, 9(32), P. 1210-1226.

224. Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor // *Annual Review of Immunology*, 2001, 19(1), P. 683–765.

225. Moorkoth D., Nampoothiri K.M. Synthesis, Colloidal Properties and Cytotoxicity of Biopolymer Nanoparticles // *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 174, P. 2181–94.

226. Muller R.L., Taylor M.G. The Specific Differentiation of Schistosome Eggs by the Ziehl-Neelsen Technique // *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1972, 66, P. 18-19.

227. Naidoo A., Chirehwa M., Ramsuran V., et al. Effects of Genetic Variability on Rifampicin and Isoniazid Pharmacokinetics in South African Patients with Recurrent Tuberculosis // *Pharmacogenomics*, 2019, 20(4), P. 225-240.

228. Nasiri M.J., Haeili M., Goudarzi H., Ghazi M., Pormohammad A., Fooladi A.A.I., Mehdi F.M. New Insights into the Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria // *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8, P. 681.

229. Nguyen H.A., Rajaram M.V., Meyer D.A., Schlesinger L.S. Pulmonary Surfactant Protein A and Surfactant Lipids Upregulate IRAK-M, a Negative Regulator of TLR-Mediated Inflammation in Human Macrophages // *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2012, 303(7), P. 608-616.

230. Oswald I.P., Wynn T.A., Sher A., James S.L. Interleukin 10 Inhibits Macrophage Microbicidal Activity by Blocking the Endogenous Production of Tumor Necrosis Factor Alpha Required as a Costimulatory Factor for Interferon Gamma-Induced Activation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(18), P. 8676-8680.

231. Palucci I., Maulucci G., De Maio F., Sali M., Romagnoli A., Petrone L., Fimia G.M., Sanguinetti M., Goletti D., De Spirito M., Piacentini M., Delogu G. Inhibition of Transglutaminase 2 as a Potential Host-Directed Therapy Against *Mycobacterium tuberculosis* // *Frontiers in Immunology*, 2019, 10, P. 3042.
232. Park H.-J., Lee S.J., Kim S.-H., Han J., Bae J., Kim S.J., Park C.-G., Chun T. IL-10 Inhibits the Starvation Induced Autophagy in Macrophages via Class I Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Pathway // *Molecular Immunology*, 2011, 48(4), P. 720-727.
233. Pathak Y., Mishra A., Choudhir G., Kumar A., Tripathi V. Rifampicin and Letemovir as Potential Repurposed Drug Candidates for COVID-19 Treatment: Insights from an In-Silico Study // *Pharmacological Reports*, 2021, 73(3), P. 926-938.
234. Păunescu E. In Vivo and In Vitro Suppression of Humoral and Cellular Immunological Response by Rifampicin // *Nature*, 1970, 228(5277), P. 1188-1190.
235. Pavlova E.N., Lepekha L.N., Rybalkina E.Yu., et al. High and Low Levels of ABCB1 Expression Are Associated with Two Distinct Gene Signatures in Lung Tissue of Pulmonary TB Patients with High Inflammation Activity // *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(19), P. 14839.
236. Pawlik A., Baskiewicz-Masiuk M., Machalinski B., Gawronska-Szklarz B. Involvement of P-Glycoprotein in the Process of Apoptosis in Peripheral Blood Mononuclear Cells // *International Immunopharmacology*, 2005, 5(5), P. 821-828.
237. Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A. Advanced Targeted Therapies in Cancer: Drug Nanocarriers, the Future of Chemotherapy // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015, 93, P. 52-79.
238. Piacentini M., D'Eletto M., Farrace M.G., Rodolfo C., Del Nonno F., Ippolito G., Falasca L. Characterization of Distinct Sub-Cellular Location of Transglutaminase Type II: Changes in Intracellular Distribution in Physiological and Pathological States // *Cell and Tissue Research*, 2014, 358(3), P. 793-805.
239. Pinto S.M., Kim H., Subbannayya Y., Giambelluca M.S., Bösl K., Ryan L., Sharma A., Kandasamy R.K. Comparative Proteomic Analysis Reveals Varying Impact on Immune Responses in Phorbol 12-Myristate-13-Acetate-Mediated THP-1 Monocyte-to-Macrophage Differentiation // *Frontiers in Immunology*, 2021, 12, P. 679458.
240. Plasschaert S., Groninger E., Boezen M., Kema I., Devries E., Uges D., Veerman A., Kamps W., Vellenga E., Degraaf S. Influence of Functional Polymorphisms of the Gene on Vincristine Pharmacokinetics in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia // *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2004, 76, P. 220–229.
241. Pontual Y., Pacheco V.S.S., Monteiro S.P., Quintana M.S.B., Costa M.J.M., Rola V.C., de Castro L. ABCB1 Gene Polymorphism Associated with Clinical Factors Can Predict Drug-Resistant Tuberculosis // *Clinical Science*, 2017, 131(15), P. 1831-1840.
242. Ponnusamy N., Arumugam M. Meta-Analysis of Active Tuberculosis Gene Expression Ascertain Host Directed Drug Targets // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12, P. 1010771.
243. Price D.F., Luscombe C.N., Eddershaw P.J., Edwards C.D., Gumbleton M. The Differential Absorption of a Series of P-Glycoprotein Substrates in Isolated Perfused Lungs from Mdr1a/1b Genetic Knockout Mice Can Be Attributed to Distinct Physico-Chemical Properties: An Insight into Predicting Transporter-Mediated, Pulmonary Specific // *Pharm Res*, 2017, 34, P. 2498-2516.

244. Prideaux B., Via L.E., Zimmerman M.D., Eum S., Sarathy J., O'Brien P., Chen C., Kaya F., Weiner D.M., Chen P.Y., Song T., Lee M., Shim T.S., Cho J.S., Kim W., Cho S.N., Olivier K.N., Barry C.E., Dartois V. The Association Between Sterilizing Activity and Drug Distribution into Tuberculosis Lesions // *Nature Medicine*, 2015, 21(10), P. 1223-27.

245. Pu W., Zhao C., Wazir J., Su Z., Niu M., Song S., Wei L., Li L., Zhang X., Shi X., Wang H. Comparative Transcriptomic Analysis of THP-1-Derived Macrophages Infected with Mycobacterium tuberculosis H37Rv, H37Ra, and BCG // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, 25(22), P. 10504-10520.

246. Puddu P., Fais S., Luciani F., Gherardi G., Dupuis M.L., Romagnoli G., Ramoni C., Cianfriglia M., Gessani S. Interferon-Gamma Up-Regulates Expression and Activity of P-Glycoprotein in Human Peripheral Blood Monocyte-Derived Macrophages // *Lab Invest.*, 1999, 79, P. 1299–1309.

247. Riordan J.R., Deuchars K., Kartner N., Alon N., Trent J., Ling V. Amplification of P-Glycoprotein Genes in Multidrug-Resistant Mammalian Cell Lines // *Nature*, 1985, 316(6031), P. 817–19.

248. Riordan J.R., Ling V. Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability // *J. Biol. Chem.*, 1979, 254(24), P. 12701–5.

249. Ritchie T.K., Kwon H., Atkins W.M. Conformational Analysis of Human ATP-Binding Cassette Transporter ABCB1 in Lipid Nanodiscs and Inhibition by the Antibodies MRK16 and UIC2 // *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(45), P. 39489–96.

250. Robbiani D.F., Finch R.A., Jäger D., Muller W.A., Sartorelli A.C., Randolph G.J. The Leukotriene C(4) Transporter MRP1 Regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-Dependent Mobilization of Dendritic Cells to Lymph Nodes // *Cell*, 2000, 103(5), P. 757-68.

251. Robert M., Miossec P. Reactivation of Latent Tuberculosis with TNF Inhibitors: Critical Role of the Beta 2 Chain of the IL-12 Receptor // *Cellular and Molecular Immunology*, 2021, 18(7), P. 1644-1651.

252. Roden D.M., McLeod H.L., Relling M.V., Williams M.S., Mensah G.A., Peterson J.F., Van Driest S.L. Pharmacogenomics // *Lancet (London, England)*, 2019, 394(10197), P. 521–32.

253. Rodríguez-Castillo J.A., Arce-Mendoza A.Y., Quintanilla-Siller A., Rendon A., Salinas-Carmona M.C., Rosas-Taraco A.G. Possible Association of Rare Polymorphism in the ABCB1 Gene with Rifampin and Ethambutol Drug-Resistant Tuberculosis // *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 2015, 95(5), P. 532-537.

254. Rosenberg M.F., Callaghan R., Modok S., Higgins C.F., Ford R.C. Three-Dimensional Structure of P-Glycoprotein: The Transmembrane Regions Adopt an Asymmetric Configuration in the Nucleotide-Bound State // *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(4), P. 2857-62.

255. Rosenberg M.F., Velarde G., Ford R.C., Martin C., Berridge G., Kerr I.D., Callaghan R., Schmidlin A., Wooding C., Linton K.J., Higgins C.F. Repacking of the Transmembrane Domains of P-Glycoprotein during the Transport ATPase Cycle // *EMBO Journal*, 2001, 20, P. 5615-25.

256. Rottenberg M.E., Carow B. SOCS3 and STAT3, Major Controllers of the Outcome of Infection with *Mycobacterium tuberculosis* // *Seminars in Immunology*, 2014, 26(6), P. 518-532.
257. Safa A.R. Identification and Characterization of the Binding Sites of P-Glycoprotein for Multidrug Resistance-Related Drugs and Modulators // *Current Medicinal Chemistry*, 2004, 4(1), P. 1-17.
258. Sakaeda T., Nakamura T., Horinouchi M., Kakumoto M., Ohmoto N., Sakai T., Morita Y., Tamura T., Aoyama N., Hirai M., Kasuga M., Okumura K. MDR1 Genotype-Related Pharmacokinetics of Digoxin after Single Oral Administration in Healthy Japanese Subjects // *Pharm. Res.*, 2001, 18, P. 1400–1404.
259. Sakamoto A., Matsumaru T., Yamamura N., Uchida Y., Tachikawa M., Ohtsuki S., Terasaki T. Quantitative Expression of Human Drug Transporter Proteins in Lung Tissues: Analysis of Regional, Gender, and Interindividual Differences by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry // *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 102(9), P. 3395-3406.
260. Saraiva M., O'Garra A. The Regulation of IL-10 Production by Immune Cells // *Nature Reviews Immunology*, 2010, 10(3), P. 170–81.
261. Sarkadi B., Özvegy-Laczka C., Németh K., Váradi A. ABCG2 - A Transporter for All Seasons // *FEBS Letters*, 2004, 567(1), P. 116-20.
262. Sasaki T., Matsuura H., Tanaka K. Preparation and Drug-Release Kinetics of Porous Poly(L-Lactic Acid)/Rifampicin Blend Particles // *ISRN Polymer Science*, 2015, 2014, P. 1-6.
263. Saunders B.M., Frank A.A., Orme I.M., Cooper A.M. Interleukin-6 Induces Early Gamma Interferon Production in the Infected Lung but Is Not Required for Generation of Specific Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* Infection // *Infection and Immunity*, 2000, 68(6), P. 3322–6.
264. Saunders B.M., Tran S., Ruuls S., Sedgwick J.D., Briscoe H., Britton W.J. Transmembrane TNF Is Sufficient to Initiate Cell Migration and Granuloma Formation and Provide Acute, but Not Long-Term, Control of *Mycobacterium tuberculosis* Infection // *Journal of Immunology*, 2005, 174(8), P. 4852-4859.
265. Sawyer A.J., Patrick E., Edwards J., Wilmott J.S., Fielder T., Yang Q., Barber D.L., Ernst J.D., Britton W.J., Palendira U., Chen X., Feng C.G. Spatial Mapping Reveals Granuloma Diversity and Histopathological Superstructure in Human Tuberculosis // *The Journal of Experimental Medicine*, 2023, 220(6), e20221392.
266. Schaefer M., Roots I., Gerloff T. In-Vitro Transport Characteristics Discriminate Wild-Type ABCB1 (MDR1) from ALA893SER and ALA893THR Polymorphisms // *Pharmacogenetics and Genomics*, 2006, 16(12), P. 855–61.
267. Scheffer G.L., Pijnenborg A.C., Smit E.F., Müller M., Postma D.S., Timens W., van der Valk P., de Vries E.G.E., Scheper R.J. Multidrug Resistance Related Molecules in Human and Murine Lung // *Journal of Clinical Pathology*, 2002, 55(5), P. 332-39.
268. Schinkel A.H. P-Glycoprotein, a Gatekeeper in the Blood-Brain Barrier // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1999, 36, P. 179-94.
269. Schinkel A.H. The Physiological Function of Drug-Transporting P-Glycoproteins // *Seminars in Cancer Biology*, 1997, 8(3), P. 161-70.

270. Schinkel A.H., Mayer U., Wagenaar E., Mol C.A., van Deemter L., Smit J.J., van der Valk M.A., Voordouw A.C., Spits H., van Tellingen O., Zijlmans J.M., Fibbe W.E., Borst P. Normal Viability and Altered Pharmacokinetics in Mice Lacking Mdr1-Type (Drug-Transporting) P-Glycoproteins // *Medical Sciences*, 1997, 94(8), P. 4028-33.

271. Schinkel A.H., Smit J.J.M., van Tellingen O., Beijnen J.H., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C.A.A.M., van der Valk M.A., Robanus-Maandag E.C., te Riele H.P.J., Berns A.J.M., Borst P. Disruption of the Mouse Mdr1a P-Glycoprotein Gene Leads to a Deficiency in the Blood-Brain Barrier and to Increased Sensitivity to Drugs // *Cell*, 1994, 77, P. 491-502.

272. Schuetz E.G., Schinkel A.H., Relling M.V., Schuetz J.D. P-Glycoprotein: A Major Determinant of Rifampicin-Inducible Expression of Cytochrome P4503A in Mice and Humans // *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(9), P. 4001-5.

273. Scotto K.W. Transcriptional Regulation of ABC Drug Transporters // *Oncogene*, 2003, 22(47), P. 7496-7511.

274. Severina I.I., Skulachev V.P., Zorov D.B. Coupling Membranes as Energy-Transmitting Cables. II. Cyanobacterial Trichomes // *J Cell Biol*, 1988, 107(2), P. 497-501.

275. Shapiro A.B., Ling V. Positively Cooperative Sites for Drug Transport by P-Glycoprotein with Distinct Drug Specificities // *European Journal of Biochemistry*, 1997, 250(1), P. 130-37.

276. Shapiro A.B., Ling V. Transport of LDS-751 from the Cytoplasmic Leaflet of the Plasma Membrane by the Rhodamine-123-Selective Site of P-Glycoprotein // *European Journal of Biochemistry*, 1998, 254(1), P. 181-88.

277. Sharma M.K., Al-Azem A., Wolfe J., Hershfield E., Kabani A. Identification of a Predominant Isolate of Mycobacterium tuberculosis Using Molecular and Clinical Epidemiology Tools and In Vitro Cytokine Responses // *BMC Infectious Diseases*, 2003, 3, P. 3.

278. Sharom F.J. Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function // *Frontiers in Oncology*, 2014, 4, P. 41.

279. Shen L.X., Basilion J.P., Stanton V.P. Single-Nucleotide Polymorphisms Can Cause Different Structural Folds of mRNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(14), P. 7871-76.

280. Sigal N., Kaplan Zeevi M., Weinstein S., Peer D., Herskovits A.A. The Human P-Glycoprotein Transporter Enhances the Type I Interferon Response to *Listeria Monocytogenes* Infection // *Infection and Immunity*, 2015, 83(6), P. 2358-68.

281. Sileshi T., Mekonen G., Makonnen E., Aklillu E. Effect of Genetic Variations in Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Transporters on the Pharmacokinetics of Rifamycins: A Systematic Review // *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 2022, 15, P. 561-71.

282. Silvério D., Gonçalves R., Appelberg R., Saraiva M. Advances on the Role and Applications of Interleukin-1 in Tuberculosis // *mBio*, 2021, 12(6), e03134-21.

283. Skulachev V.P. Mitochondrial Physiology and Pathology; Concepts of Programmed Death of Organelles, Cells and Organisms // *Mol Aspects Med*, 1999, 20(3), P. 139-84.

284. Smith D., Hänsch H., Bancroft G., Ehlers S. T-Cell-Independent Granuloma Formation in Response to *Mycobacterium avium*: Role of Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  and Interferon- $\gamma$  // *Immunology*, 1997, 92(4), P. 413-421.
285. Song W., Zhang C.-L., Gou L., He L., Gong Y.-Y., Qu D., Zhao L., Jin N., Chan T.F., Wang L., Tian X.Y., Luo J.-Y., Huang Y. Endothelial TFEB (Transcription Factor EB) Restrains IKK (I $\kappa$ B Kinase)-p65 Pathway to Attenuate Vascular Inflammation in Diabetic db/db Mice // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2019, 39(4), P. 719-730.
286. Stone K.C., Mercer R.R., Gehr P., Stockstill B., Crapo J.D. Allometric Relationships of Cell Numbers and Size in the Mammalian Lung // *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1992, 6, P. 235-43.
287. Suresh M.V., Balijepalli S., Solanki S., Aktay S., Choudhary K., Shah Y.M., Raghavendran K. Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  and Its Role in Lung Injury: Adaptive or Maladaptive // *Inflammation*, 2023, 46(2), P. 491-508.
288. Suzuki Y., Shirai M., Asada K., Miwa S., Karayama M., Nakamura Y., Inui N., Shirai T., Hayakawa H., Baba S., Suda T. Utility of Macrophage-Activated Marker CD163 for Diagnosis and Prognosis in Pulmonary Tuberculosis // *Annals of the American Thoracic Society*, 2017, 14(1), P. 57-64.
289. Suzuki Y., Shirai M., Asada K., Yasui H., Karayama M., Hozumi H., Furuhashi K., Enomoto N., Fujisawa T., Nakamura Y., Inui N., Shirai T., Hayakawa H., Suda T. Macrophage Mannose Receptor, CD206, Predict Prognosis in Patients with Pulmonary Tuberculosis // *Scientific Reports*, 2018, 8, P. 13129.
290. Tang S., Cui H., Yao L., Hao X., Shen Y., Fan L., Sun H., Zhang Z., Huang J.A. Increased Cytokines Response in Patients with Tuberculosis Complicated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease // *PLoS ONE*, 2013, 8(4).
291. te Brake L.H.M., de Knegt G.J., de Steenwinkel J.E., van Dam T.J.P., Burger D.M., Russel F.G.M., van Crevel R., Koenderink J.B., Aarnoutse R.E. The Role of Efflux Pumps in Tuberculosis Treatment and Their Promise as a Target in Drug Development: Unraveling the Black Box // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2018, 58, P. 271-291.
292. Thanassi D.G., Hultgren S.J. Multiple Pathways Allow Protein Secretion across the Bacterial Outer Membrane // *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, 12, P. 420-30.
293. Theodoulou F.L., Kerr I.D. ABC Transporter Research: Going Strong 40 Years On // *Biochemical Society Transactions*, 2015, 43(5), P. 1033-40.
294. Tomblin G., Bartholomew L.A., Urbatsch I.L., Senior A.E. Combined Mutation of Catalytic Glutamate Residues in the Two Nucleotide Binding Domains of P-Glycoprotein Generates a Conformation That Binds ATP and ADP Tightly // *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279, P. 31212-20.
295. Trussardi-Regnier A., Millot J.M., Gorisse M.C., Delvincourt C., Prevost A. Detection of Drug-Resistance Genes Using Single Bronchoscopy Biopsy Specimens // *Oncol Rep.*, 2007, 18, P. 703-8.
296. Tsao T.C.Y., Hong J.-H., Li L.F., et al. Imbalances Between Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  and Its Soluble Receptor Forms, and Interleukin-1 $\beta$  and Interleukin-1 Receptor Antagonist in BAL Fluid of Cavitory Pulmonary Tuberculosis // *Chest*, 2000, 117(1), P. 103-9.

297. van de Ven R., Oerlemans R., van der Heijden J.W., Scheffer G.L., de Gruijl T.D., Jansen G., Scheper R.J. ABC Drug Transporters and Immunity: Novel Therapeutic Targets in Autoimmunity and Cancer // *Journal of Leukocyte Biology*, 2009, 86(5), P. 1075-87.

298. van der Deen M., Timens W., Timmer-Bosscha H., van der Strate B.W., Scheper R.J., Postma D.S., de Vries E.G., Kerstjens H.A. Reduced Inflammatory Response in Cigarette Smoke Exposed Mrp1/Mdr1a/1b Deficient Mice // *Respiratory Research*, 2007, 8, P. 49.

299. van der Valk P., van Kalken C.K., Ketelaars H., Broxterman H.J., Scheffer G., Kuiper C.M., Tsuruo T., Lankelma J., Meijer C.J., Pinedo H.M. Distribution of Multi-Drug Resistance-Associated P-Glycoprotein in Normal and Neoplastic Human Tissues: Analysis with 3 Monoclonal Antibodies Recognizing Different Epitopes of the P-Glycoprotein Molecule // *Annals of Oncology*, 1990, 1(1), P. 56-64.

300. van Loo G., Bertrand M.J.M. Death by TNF: A Road to Inflammation // *Nature Reviews Immunology*, 2023, 23(5), P. 289-303.

301. Vasir J.K., Labhasetwar V. Biodegradable Nanoparticles for Cytosolic Delivery of Therapeutics // *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59, P. 718–28.

302. Verbon A., Juffermans N., Van Deventer S.J.H., et al. Serum Concentrations of Cytokines in Patients with Active Tuberculosis (TB) and After Treatment // *Clinical and Experimental Immunology*, 1999, 115(1), P. 110–3.

303. Verhalen B., Dastvan R., Thangapandian S., Peskova Y., Koteiche H.A., Nakamoto R., Tajkhorshid E., Mchaourab H. Energy Transduction and Alternating Access of the Mammalian ABC Transporter P-Glycoprotein // *Nature*, 2017, 543(7647), P. 738-41.

304. Verstuyft C., Schwab M., Schaeffeler E., Kerb R., Brinkmann U., Jaillon P., Funck-Brentano C., Becquemont L. Digoxin Pharmacokinetics and MDR1 Genetic Polymorphisms // *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2003, 58, P. 809–812.

305. Viljoen A., Raynaud C., Johansen M.D., Roquet-Banères F., Herrmann J.L., Daher W., Kremer L. Verapamil Improves the Activity of Bedaquiline against Mycobacterium Abscessus In Vitro and in Macrophages // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019, 63(9), e00705-19.

306. Walker J.E., Saraste M., Runswick M., Gay N.J. Distantly Related Sequences in the Alpha- and Beta-Subunits of ATP Synthase, Myosin, Kinases and Other ATP-Requiring Enzymes and a Common Nucleotide Binding Fold // *The EMBO Journal*, 1982, 1, P. 945-951.

307. Wang F., Huang G., Shen L., Peng Y., Sha W., Chen Z.W., Shen H. Genetics and Functional Mechanisms of STAT3 Polymorphisms in Human Tuberculosis // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11, P. 669394.

308. Wang Y., Zheng N., Sun T., Zhao H., Chen Y., Liu C. Role of TGM2 in T-Cell Lymphoblastic Lymphoma via Regulation of IL-6/JAK/STAT3 Signalling // *Molecular Medicine Reports*, 2022, 25(3), P. 76.

309. Whirl-Carrillo M., McDonagh E., Hebert J., Gong L., Sangkuhl K., Thorn C., Altman R.B., Klein T. Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine // *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2012, 92, P. 414–417.

310. Wijnholds J., Evers R., van Leusden M.R., Mol C.A., Zaman G.J., Mayer U., Beijnen J.H., van der Valk M., Krimpenfort P., Borst P. Increased Sensitivity to Anti-cancer Drugs and Decreased Inflammatory Response in Mice Lacking the Multidrug Resistance-Associated Protein // *Nat Med*, 1997, 3(11), P. 1275–79.
311. Wijnholds J., Evers R., van Leusden M.R., Mol C.A., Zaman G.J., Mayer U., Beijnen J.H., van der Valk M., Krimpenfort P., Borst P. Increased Sensitivity to Anti-cancer Drugs and Decreased Inflammatory Response in Mice Lacking the Multidrug Resistance-Associated Protein // *Nat Med.*, 1997, 3(11), P. 1275-79.
312. Winchell C.G., Mishra B.B., Phuah J.Y., et al. Evaluation of IL-1 Blockade as an Adjunct to Linezolid Therapy for Tuberculosis in Mice and Macaques // *Frontiers in Immunology*, 2020, 11.
313. Worley M.V., Estrada S.J. Bedaquiline: A Novel Antitubercular Agent for the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis // *Pharmacotherapy*, 2014, 34(11), P. 1187-1197.
314. Wu Q., Hossfeld A., Gerberick A., et al. Effect of Mycobacterium tuberculosis Enhancement of Macrophage P-Glycoprotein Expression and Activity on Intracellular Survival During Antituberculosis Drug Treatment // *The Journal of Infectious Diseases*, 2019, 220(12), P. 1989-1998.
315. Xu J., Tasneen R., Peloquin C.A., Almeida D.V., Li S.Y., Barnes-Boyle K., Lu Y., Nuermberger E. Verapamil Increases the Bioavailability and Efficacy of Bedaquiline but Not Clofazimine in a Murine Model of Tuberculosis // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 62(1), e01692-17.
316. Xu Q., Briggs J., Park S., Niu G., Kortylewski M., Zhang S., Gritsko T., Turkson J., Kay H., Semenza G.L., Cheng J.Q., Jove R., Yu H. Targeting Stat3 Blocks Both HIF-1 and VEGF Expression Induced by Multiple Oncogenic Growth Signaling Pathways // *Oncogene*, 2005, 24(36), P. 5552-5560.
317. Xue Q., Yan Y., Zhang R., Xiong H. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases // *Int. J. Mol. Sci.*, 2018, 19(12).
318. Yagdiran Y., Tallkvist J., Artursson K., Oskarsson A. Staphylococcus Aureus and Lipopolysaccharide Modulate Gene Expressions of Drug Transporters in Mouse Mammary Epithelial Cells Correlation to Inflammatory Biomarkers // *PLoS ONE*, 2016, 11(9), Article ID: e0161346.
319. Yang J., Liao X., Agarwal M.K., Barnes L., Auron P.E., Stark G.R. Unphosphorylated STAT3 Accumulates in Response to IL-6 and Activates Transcription by Binding to NFκB // *Genes & Development*, 2007, 21(11), P. 1396-1408.
320. Yee S.W., Brackman D.J., Ennis E.A., Sugiyama Y., Kamdem L.K., Blanchard R., Galetin A., Zhang L., Giacomini K.M. Influence of Transporter Polymorphisms on Drug Disposition and Response: A Perspective from the International Transporter Consortium // *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2018, 104(5), P. 803–17.
321. Yerramasetti R., Gollapudi S., Gupta S. Rifampicin Inhibits CD95-Mediated Apoptosis of Jurkat T Cells via Glucocorticoid Receptors by Modifying the Expression of Molecules Regulating Apoptosis // *Journal of Clinical Immunology*, 2002, 22(1), P. 37-47.

322. Yuhas Y., Berent E., Ashkenazi S. Effect of Rifampin on Production of Inflammatory Mediators in HepG2 Liver Epithelial Cells // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(12), P. 5541-5546.

323. Yuhas Y., Berent E., Cohen R., Ashkenazi S. Roles of NF-kappaB Activation and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Inhibition in the Effect of Rifampin on Inducible Nitric Oxide Synthase Transcription in Human Lung Epithelial Cells // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(4), P. 1539-1545.

324. Zahra R., Furqan M., Ullah R., Mithani A., Saleem R.S.Z., Faisal A. A Cell-Based High-Throughput Screen Identifies Inhibitors that Overcome P-Glycoprotein (Pgp)-Mediated Multidrug Resistance // *PLoS ONE*, 2020, 15(6), e0233993.

325. Zhang X., Xiao W., Wang L., Tian Z., Zhang J. Deactivation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Reverses Chemotherapeutics Resistance of Leukemia Cells via Down-Regulating P-Gp // *PLoS ONE*, 2011, 6(6), e20965.

326. Zhong Z., Wen Z., Darnell J.E. Stat3: A STAT Family Member Activated by Tyrosine Phosphorylation in Response to Epidermal Growth Factor and Interleukin-6 // *Science*, 1994, 264(5155), P. 95-98.

327. Zhou C., Tabb M.M., Nelson E.L., Grün F., Verma S., Sadatrafiei A., Lin M., Mallick S., Forman B.M., Thummel K.E., Blumberg B. Mutual Repression Between Steroid and Xenobiotic Receptor and NF-κB Signaling Pathways Links Xenobiotic Metabolism and Inflammation // *The Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(8), P. 2280-2289.

328. Ziglam H.M., Daniels I., Finch R.G. Immunomodulating Activity of Rifampicin // *Journal of Chemotherapy*, 2004, 16(4), P. 357-361.

329. Zimenkov D.V., Nosova E.Yu., Kulagina E.V., Antonova O.V., Arslanbaeva L.R., Isakova A.I., Krylova L.Yu., Peretokina I.V., Makarova M.V., Safonova S.G., Borisov S.E., Gryadunov D.A. Examination of Bedaquiline- and Linezolid-Resistant Mycobacterium tuberculosis Isolates from the Moscow Region // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, 72(7), P. 1901-1906.



# **БЕЛКИ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПРИ ТУБЕРКУЛЁЗЕ ЛЁГКИХ**

М.В. Ерохина,  
Л.Н. Лепеха,  
Е.Н. Павлова,  
А.Э. Эргешов

Формат 70x100 1/16  
Гарнитура Times  
Усл.-п. л. 13,16 Уч.-изд. л.10,92  
Тираж 300 экз.

Издатель – Российская академия наук

Верстка – УНИД РАН

Издается по решению Научно-издательского совета  
Российской академии наук (НИСО РАН) от 13.02.2025 № 19  
и распространяется бесплатно