

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Павлова Екатерина Николаевна

**Функциональная роль Р-гликопротеина в нормальных и
инфицированных макрофагах человека при действии
противотуберкулезных препаратов**

1.5.22 – клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена на кафедре клеточной биологии и гистологии
биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научный руководитель** – ***Ерохина Мария Владиславовна***, доктор биологических наук
- Официальные оппоненты** – ***Макарова Марина Витальевна***, доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения г. Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения г. Москвы.
- Пащенко Михаил Владимирович***, доктор медицинских наук, и.о. заведующего лабораторией клинической иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства
- Челомбитько Мария Александровна***, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела математических методов в биологии Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «14» ноября 2023 г. в 17 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.9 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 12, биологический факультет, ауд.М-1

Е-mail: dis_kalsov@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.9/2657>.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.Н. Калистратова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. Туберкулез (ТБ) – инфекционное заболевание, возбудителем которого является *Mycobacterium tuberculosis (M.tb)*, входит в десятку ведущих причин смертности в мире по данным ВОЗ. На разработку и внедрение новых противотуберкулёзных препаратов (ПТП) требуется не один десяток лет, что хорошо видно на примере бедаквила (BDQ). BDQ – новый противотуберкулёзный препарат, разработанный впервые за последние 50 лет. Однако и к нему уже зафиксировано появление резистентности у *M.tb*. В связи с этим остро стоит вопрос о поиске новых стратегий повышения эффективности терапии ТБ.

Снижение эффективности ПТП в первую очередь связывают с устойчивостью возбудителя. Но понятие «устойчивость к лекарственным препаратам» применимо и для клеток млекопитающих. Почти 50 лет назад был открыт Р-гликопротеин (Р-gr), который обеспечивает резистентность опухолевых клеток к широкому ряду противоопухолевых препаратов. За эту способность Р-gr был назван белком множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Несмотря на то, что феномен МЛУ рассматривается в основном применительно к терапии онкологических заболеваний, появляется все больше исследований, свидетельствующих о том, что активность Р-gr может влиять на успешность лекарственной терапии целого ряда нейродегенеративных, неврологических и аутоиммунных заболеваний. Изучение активности Р-gr актуально и при туберкулёзном воспалении. Известно, что в макрофагах персистирует *M.tb* и они являются одной из основных мишеней ПТП. Так как в макрофагах присутствует функционально активный Р-gr, в целях разработки стратегий повышения эффективности терапии ТБ особенно актуальным является вопрос о взаимодействии ПТП с данным белком.

Различные факторы воспаления могут влиять на экспрессию гена *ABCBI* (кодирующего Р-gr) и функциональную активность Р-gr, которая может изменяться под воздействием провоспалительных цитокинов, внутриклеточных патогенов и гипоксии. В том числе показано, что экспрессия гена Р-gr увеличивается в макрофагах человека при инфицировании вирулентными штаммами *M.tb*. Вопрос о том, какие факторы воспаления влияют на экспрессию гена Р-gr у больных ТБ в очаге воспаления в лёгких, до сих пор остается открытым и требующим изучения. Ответ на него крайне важен, так как высокая активность Р-gr может препятствовать

достижению оптимальных концентраций ПТП в очагах ТБ воспаления и влиять на эффективность лечения. Макрофаги являются ключевыми регуляторами воспалительного процесса, связывая врожденный и адаптивный иммунитет в борьбе с возбудителем ТБ. От функциональной активности макрофагов зависит успешность элиминации внутриклеточных форм *M.tb*. В связи с этим, изучение молекулярных и клеточных механизмов, через которые возможно терапевтически «улучшить» или изменить потенциал макрофагов, рассматривается в качестве перспективного и актуального научного направления для поиска путей повышения эффективности лечения больных ТБ.

Цель исследования – выявить функциональную роль Р-гликопротеина в нормальных и инфицированных *M. tuberculosis* макрофагах человека при действии противотуберкулезных препаратов.

Задачи исследования:

1) В операционном материале легких больных туберкулезом определить взаимосвязь между экспрессией гена *ABCB1* и экспрессией генов, регулирующих воспаление, в зависимости от его активности.

2) Проанализировать иммуномодулирующие эффекты терапевтических концентраций рифампицина и бедаквила на провоспалительные свойства макрофагов.

3) Определить влияние фармакологического ингибирования Р-гликопротеина на провоспалительные свойства макрофагов в процессе их дифференцировки и под воздействием рифампицина и бедаквила.

4) Выявить влияние инфицирования *M. tuberculosis* на экспрессию гена *ABCB1* и провоспалительный фенотип макрофагов.

5) Получить и охарактеризовать клеточную линию моноцитов ТНР-1 с конститутивным нокдауном гена *ABCB1*.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования являются ТНР-1 макрофаги человека на различных стадиях макрофагальной дифференцировки, а также операционный материал легких больных ТБ. Предметом исследования является экспрессия гена и функциональная активность белка Р-гр, экспрессия генов цитокинов и фагоцитарных рецепторов и секреция цитокинов в ТНР-1 макрофагах при разных условиях воздействия: противотуберкулезные препараты, фармакологическое ингибирование функции Р-гр, инфицирование *M. tb*. А также

экспрессия гена *ABCB1* (белка Р-гр) и генов, регулирующих воспаление, в перифокальной области туберкулом легких больных ТБ.

Научная новизна. Впервые проанализирована взаимосвязь между экспрессией гена *ABCB1* белка Р-гр и экспрессией генов, регулирующих воспаление, в легких больных ТБ в зависимости от активности воспалительного процесса. Впервые исследовано влияние фармакологического ингибирования Р-гр на провоспалительный фенотип макрофагов в процессе их дифференцировки и при действии ПТП. Впервые получена стабильная клеточная линия моноцитов человека с нокадауном гена *ABCB1*.

Теоретическая и практическая значимости работы. В результате выполнения работы получены результаты, которые имеют важное фундаментальное и клиническое значение для понимания значимости Р-гр как при туберкулезном воспалении, так и в макрофагах человека. Идентифицированные молекулярно-генетические сигнатуры в легких больных ТБ расширяют знания об иммунопатологии данного заболевания. Исследование влияния ингибирования Р-гр на свойства макрофагов человека и иммуномодулирующие эффекты ПТП является перспективным направлением для разработки новых стратегии повышения эффективности лечения ТБ путём модуляции иммунобиологических функций макрофагов.

Методология исследования. В основе данной диссертационной работы лежат современные методы клеточной и молекулярной биологии, а также гистологии.

Достоверность. Результаты работы характеризуются высокой степенью достоверности. В исследовании клинической части работы был проанализирован резекционный материал, полученный от 56 больных ТБ. Все *in vitro* эксперименты были проведены не менее чем в 3 биологических повторностях. Анализ данных проводился с помощью релевантных методов статистической обработки.

Апробация работы. По результатам работы сделано 8 докладов на российских и международных конференциях.

Публикации. По материалам работы опубликовано 6 статей, 4 из которых опубликованы в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ им. М. В. Ломоносова по специальности и отрасли наук.

Финансовая поддержка. Работа поддержана грантом РФФИ № 20–34–90161.

Личный вклад автора в проведение исследования. Автору диссертационного исследования принадлежит основная роль в анализе литературных данных, постановке задач исследования, подготовке и проведении экспериментов, статистической обработке данных, подготовке тезисов и публикаций по теме исследования.

Положения, выносимые на защиту

1) Экспрессия гена *ABCBI* белка P-gr в туберкуломах ассоциирована с разными молекулярно-генетическими сигнатурами, характеризующими активность туберкулезного воспаления в легких.

2) P-gr опосредует секрецию провоспалительных цитокинов и тем самым участвует в формировании фенотипа макрофагов человека в процессе их дифференцировки и влияет на иммуномодулирующие свойства противотуберкулезных препаратов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Материалы и методы клинической части исследования.

В исследование были включены образцы легких от 56 пациентов, направленных на оперативное лечение с диагнозом «множественные туберкуломы легких» в ФГБУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза (ЦНИИТ). Для гистологического исследования образцы ткани немедленно фиксировали после резекции и готовили парафиновые срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Для анализа экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени образец легочной ткани (около 25-50 мг) вырезали на расстоянии около 0,5 см от стенки туберкуломы и немедленно замораживали в азоте для дальнейшего выделения РНК. Относительные уровни экспрессии рассчитывали как $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$, где ΔCt — разница между пороговыми циклами целевого гена и гена домашнего хозяйства *B2M*.

Статистическую обработку проводили с помощью статистического пакета GraphPad Prism. Для сравнения двух групп использовали U-критерий Манна-Уитни, а для множественных сравнений – критерий Крускала-Уоллиса с post-hoc тестом Данна. Корреляцию между переменными оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (*r*). Иерархический кластерный анализ и тепловые карты были выполнены с использованием инструмента ClustVis 2.0.

Материалы и методы экспериментальной части *in vitro* исследования.

Эксперименты проводили на клеточной линии THP-1 и субклоне IS9 клеточной линии K562 с гиперэкспрессией P-gr. Макрофагальную дифференцировку клеток THP-1 индуцировали 100 нМ форболового эфира. В работе использовали «терапевтические» концентрации BDQ – 5 мкг/мл и рифампицина (RIF) – 10 мкг/мл. Функциональную активность P-gr ингибировали R-верапамил гидрохлоридом (VER) в концентрации 10 мкМ. Данная концентрация VER полностью блокирует функциональную активность P-gr в макрофагах THP-1. Экспрессию генов определяли методом количественной ПЦР в реальном времени. Относительные уровни экспрессии исследуемых генов (RQ) выражены как значения $2^{-\Delta\Delta C_t}$, нормализованные к уровням генов домашнего хозяйства *B2M* и *RPL37A*. Концентрацию цитокинов определяли на приборе MagPix Luminex с помощью набора MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel. Исследования влияния препаратов на функциональную активность P-gr проводили на клеточной линии K569/IS9 в соответствии с протоколом MDR1 Efflux Assay (Sigma-Aldrich). Интенсивность флуоресценции родамина 123 анализировали с помощью проточной цитометрии. Значение фактора ингибирования активности P-gr, рассчитывали по следующей формуле: $\text{ФИА}_{P-gr} = 1 - [(\text{МИФ}_{\text{винбластин}} - \text{МИФ}_{\text{препарат или среда}}) / \text{МИФ}_{\text{винбластин}}] \times 100$, где МИФ – показатель медианы интенсивности флуоресценции родамина 123 в клетках в присутствии винбластина 22 мкМ, который полностью ингибирует функциональную активность P-gr (ФИА=100) или исследуемых препаратов. Для анализа фагоцитарной активности макрофагов использовали карбоксилатные латексные частицы диаметром 1.00 мкм, опсонизированные человеческим IgG или D-маннаном. Фагоцитарную активность клеток оценивали по медиане интенсивности флуоресценции частиц с помощью проточной цитометрии. Инфицирование макрофагов THP-1 вирулентным штаммом *M.tb* H37Rv (10 микобактерий на 1 макрофаг) и микробиологический анализ проводили в сертифицированном для данного вида работ виварии ЦНИИТ.

Клеточную линию с нокдауном по гену *ABCBI* получали путем лентивирусной трансформации с использованием вектора, содержащего шпилечную РНК (shRNA). Целевую последовательность shRNA подбирали в соответствии с критериями лаборатории Tyler Jacks и тестировали с помощью веб-ресурса siRNA-Check. В соответствии с этой последовательностью были разработаны последовательности

олигонуклеотидов для последующего клонирования в плазмиду pLB (Addgene, #11619). Lentивирусные частицы были получены в Центре высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им Н.И. Пирогова (при сотрудничестве с к.б.н. Э.Б. Дашинимаяевым).

Статистическую обработку проводили с помощью статистического пакета GraphPad Prism. Соответствие данных нормальному распределению проверяли критерием Шапиро-Уилка, для проверки равенства дисперсий – критерий Фишера. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD). Использовали t-критерии Стьюдента или One-Way ANOVA для множественных сравнений с последующим тестом Тьюки – Крамера. Различия считали значимыми для $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Взаимосвязь между экспрессией гена *ABCBI* и экспрессией генов, регулирующих воспаление, в легочной ткани больных туберкулезом в зависимости от активности воспалительного процесса.

В зависимости от активности воспаления туберкуломы различаются по морфологическим признакам. В туберкуломах при умеренной активности воспалительного процесса фиброзный слой капсулы хорошо выражен и преобладает над грануляционным слоем (рис.1). При высокой активности воспаления в центре туберкуломы наблюдается казеозный некроз с признаками распада, в капсуле преобладает грануляционный слой, в то время как фиброзный слой выражен слабо, в перифокальной области туберкулом наблюдаются многочисленные лимфоидные узелки, а также «очаги отсева» – лимфогематогенные зоны распространения туберкулезной инфекции (рис.2). По результатам морфологического анализа из 30 образцов, полученных в период с 2017 по 2018 гг., 13 имели признаки умеренной, а 17 – высокой активности воспаления; из 35 образцов, полученных в период с 2021 по 2022 гг., 15 имели признаки умеренной, а 20 – высокой активности воспаления.

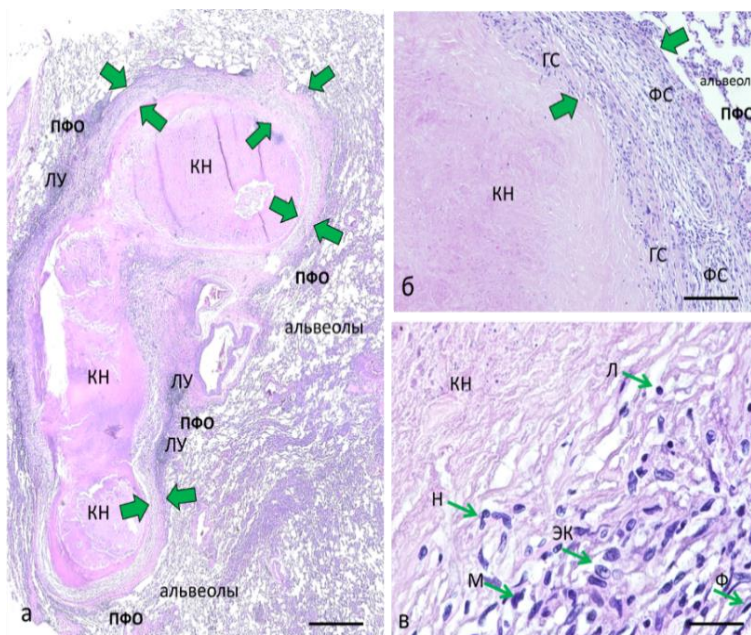


Рис. 1. Туберкулома легкого с признаками умеренной активности воспаления. а – туберкулома с уплотненным некрозом, зеленые стрелки показывают границы капсулы туберкуломы; б – увеличенный фрагмент туберкуломы; в – крупный фрагмент стенки капсулы. КН – казеозный некроз, ГС – грануляционный слой, ФС – фиброзный слой. ПФО – перифокальная область туберкуломы. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок: а = 500 мкм, б= 100 мкм, в = 20 мкм.

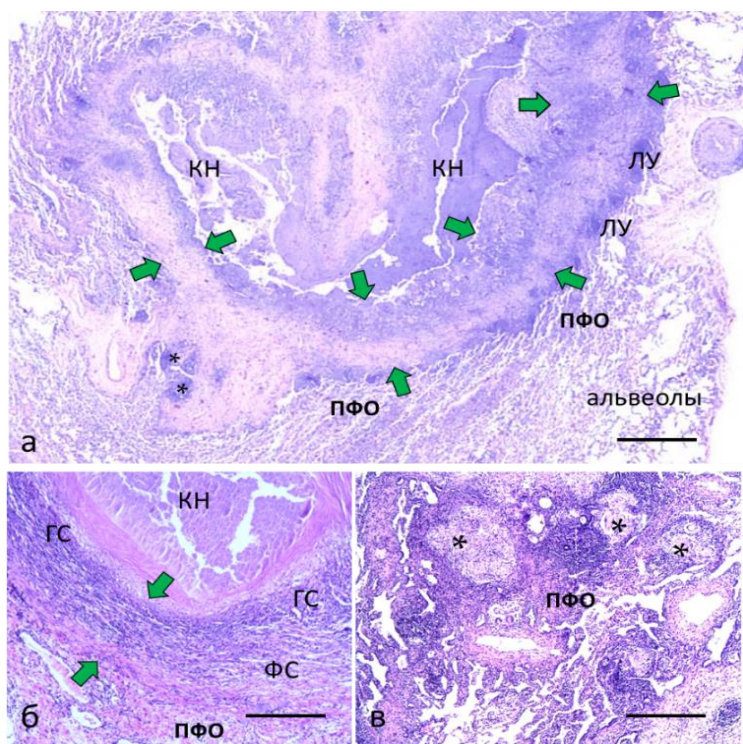


Рис. 2. Туберкулома легкого с признаками высокой активности воспаления. а – общий вид туберкуломы; зеленые стрелки показывают границы капсулы туберкуломы; б – увеличенный фрагмент туберкуломы; в – очаги отсева в перифокальной области туберкуломы (обозначены *). КН – казеозный некроз, ГС – грануляционный слой, ФС – фиброзный слой, ЛУ – лимфоидные узелки. ПФО – перифокальная область туберкуломы. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок: а = 500 мкм, б, в = 100 мкм.

В исследовании, проведенном на операционном материале 2017-2018 гг, относительный уровень экспрессии гена *ABCBI* был достоверно выше в образцах с высокой (группа «АВ») активностью воспаления по сравнению с умеренной (группа «УВ») (рис.3). В группе «АВ» были идентифицированы 2 подгруппы с разным уровнем экспрессии *ABCBI*: подгруппа с высокой экспрессией гена (фигура с красной заливкой, рис.3), значения в которой превышали значения в группе «УВ», и

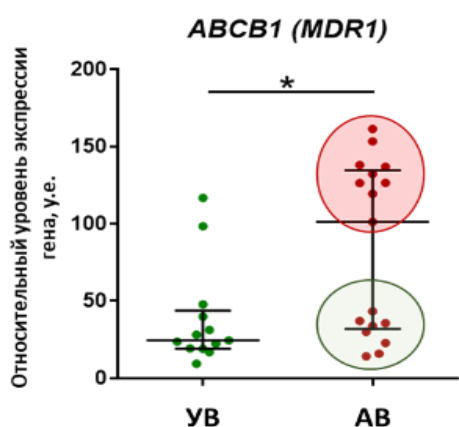


Рис. 3. Экспрессия гена *ABCB1* в легких больных ТБ при умеренной (УВ) и высокой (АВ) активности воспаления. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. * – значимые различия при $p < 0,05$.

подгруппа с низкой экспрессией (фигура с зеленой заливкой, рис.3), в которой значения совпали с таковыми в группе «УВ».

Это позволило предположить, что экспрессия гена *ABCB1* при высокой активности воспаления неоднородна и может зависеть от различных факторов, опосредующих высокую активность воспаления при ТБ легких. Это предположение было проверено на операционном материале легких больных ТБ, полученном в период 2021-2022 гг., и результаты представлены ниже.

Относительный уровень экспрессии генов цитокинов, таких как *IL1b*, *TGFb1* и *TNFa*, и маркеров макрофагов *CD86*, *CD163* и *CD206* был выше в группе «АВ» по сравнению с «УВ» (рис.4).

Статистически значимых различий в уровне экспрессии всех остальных исследованных генов обнаружено не было.

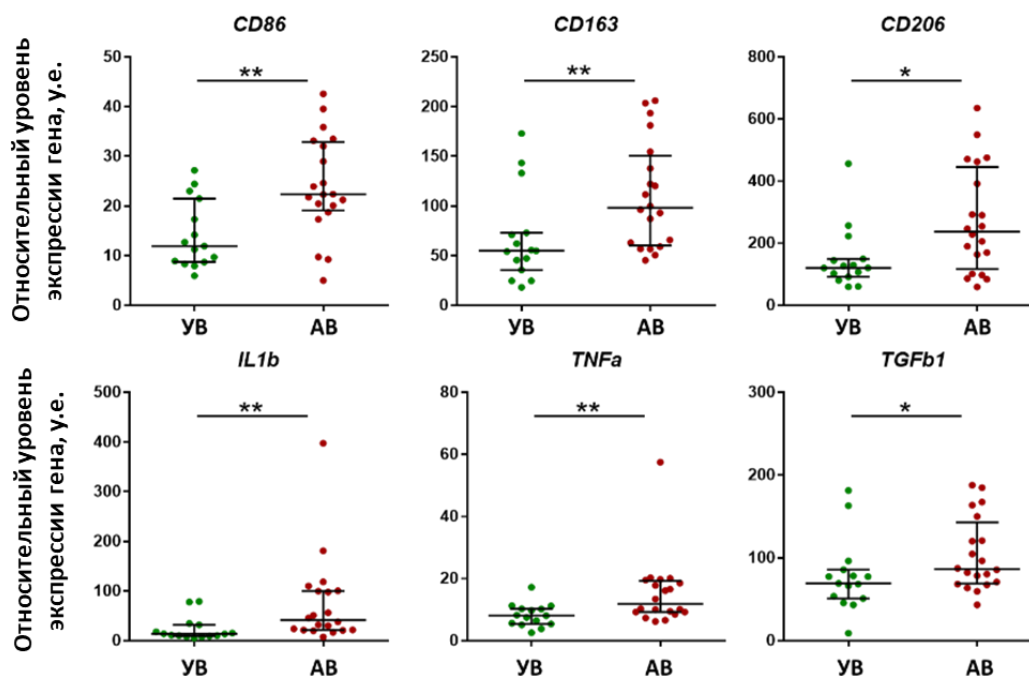


Рис. 4. Различия в уровнях экспрессии генов между умеренной (УВ) и высокой активностью (АВ) воспалением в легких больных ТБ. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Значимые различия: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

С помощью корреляционного анализа было установлено, что экспрессии гена *ABCB1* в наибольшей степени коррелировала со *STAT3* и *SOCS3* ($r = 0,76$ и $0,71$ соответственно); сильная корреляция также обнаружена для генов *TGM2* ($r = 0,69$), *HIF1A* ($r = 0,65$) и *IL6* ($r = 0,65$). Экспрессия *ABCB1* имела положительную умеренную корреляцию со *STAT6* ($r = 0,52$) и умеренно отрицательную с геном интерферона гамма (INFg, $r = -0,54$). С помощью дальнейшего иерархического кластерного анализа, основанного на корреляции между генами, были идентифицированы 3 больших кластера совместно экспрессируемых генов. На основании профилей экспрессии генов, 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 подгруппу «АВ-2» – образцы с номерами строк 27 – 35 ($n = 9$) (рис. 5).

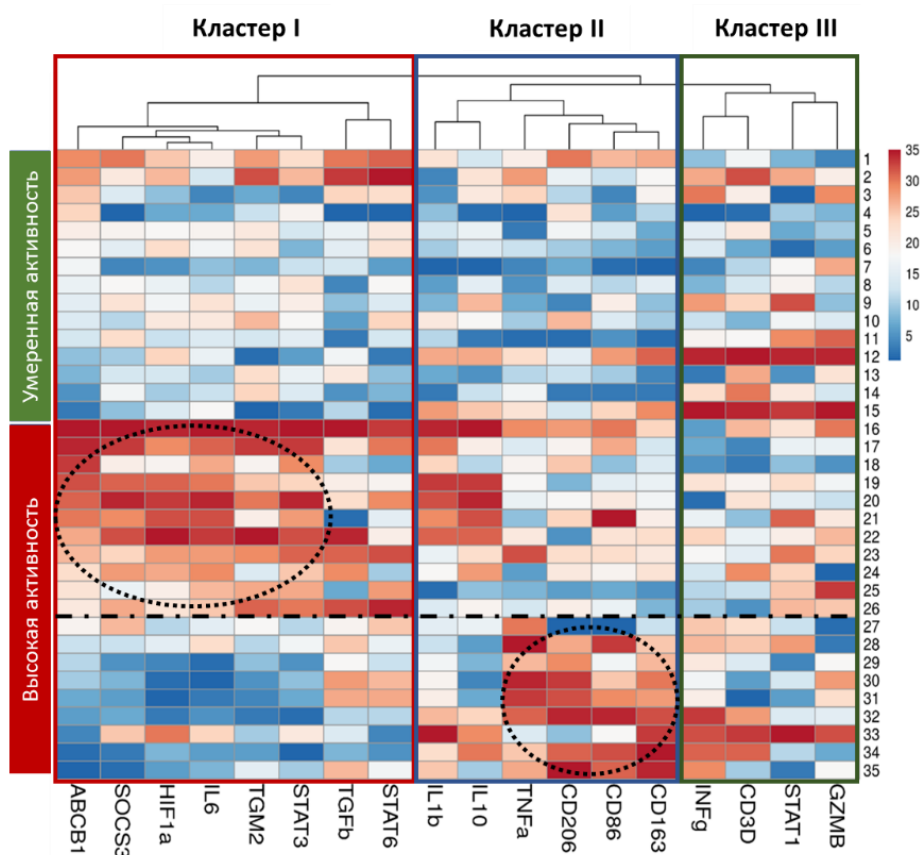


Рис. 5. Тепловая карта, демонстрирующая неоднородность молекулярно-генетических профилей в группе с высокой активностью воспаления. Трехцветная шкала: синий – низкий, белый – средний, а красный – высокий относительный уровень экспрессии генов. Тепловая карта была создана с использованием веб-инструмента ClustVis.

Был проведен анализ экспрессии всех генов в этих двух выделенных подгруппах по сравнению с группой с умеренной активностью воспаления. Это позволило

выявить две разные молекулярно-генетические сигнатуры, связанные с высокой активностью воспаления (рис.6).

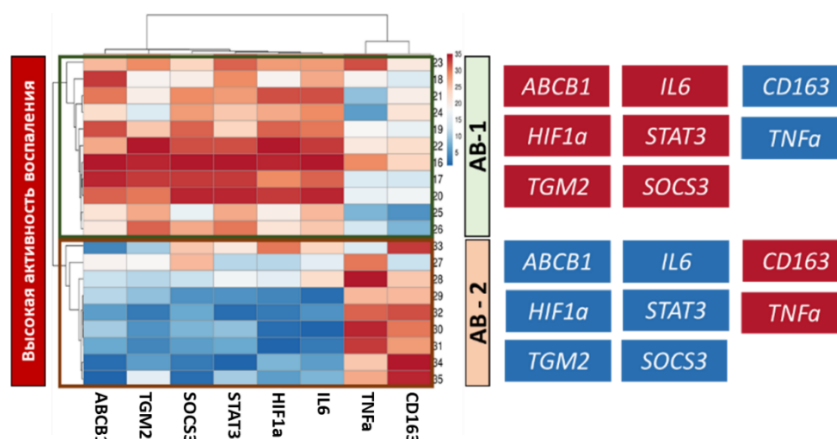


Рис. 6. Молекулярно-генетические сигнатуры экспрессии генов, характерных для каждой из подгрупп с высокой активностью воспаления в легочной ткани больных туберкулезом. Трехцветная шкала: синий – низкий, красный – высокий относительный уровень экспрессии генов. Тепловая карта была создана с использованием веб-инструмента ClustVis.

Таким образом, при анализе экспрессии генов в перифокальной области туберкулом больных ТБ мы обнаружили, что несмотря на сходство морфологических характеристик высокой активности воспаления, молекулярно-генетический профиль образцов различается.

Влияние бедаквилина на экспрессию гена ABCB1 и функциональную активность P-гр.

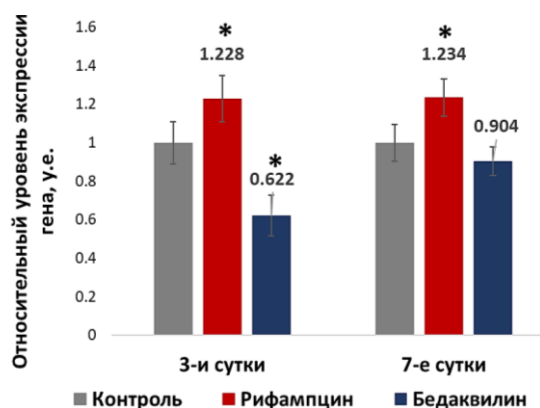


Рис. 7. Влияние бедаквилина и рифампицина на экспрессию гена ABCB1 на 3 и 7 сутки дифференцировки макрофагов THP-1. Данные представлены как среднее и SD. * – значимые различия по сравнению с контролем (принят за 1) $p < 0,05$.

Если под действием RIF в процессе дифференцировки макрофагов THP-1 увеличивается экспрессия гена ABCB1, то под действием BDQ экспрессии гена статистически значимо снижается на 3 сутки макрофагальной дифференцировки, но не отличается от контроля на 7 сутки (рис. 7).

Таким образом, терапевтические концентрации RIF и BDQ обладают разными эффектами на экспрессию гена ABCB1 в дифференцирующихся макрофагах THP-1.

Для ответа на вопрос, может ли BDQ быть субстратом P-гр, был проанализирован выброс родамина 123 клетками K562/IS9 в присутствии различных концентраций BDQ и рассчитан фактор ингибирования активности P-гр (Таблица 1).

Таблица 1. Значения фактора ингибирования активности P-гр в клетках K562/IS9 под воздействием различных концентраций бедаквилина

ФИА_{P-гр} 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_{P-гр} = средние значения фактора ингибирования активности P-гр ± стандартное отклонение по результатам 3-х экспериментов. BDQ – бедаквилин, RIF – рифампицин. * – статистически значимые различия в сравнении с выбросом родамина 123 в среде, $p < 0,05$.

Ингибирующий эффект BDQ на функциональную активность P-гр проявляется только при концентрации в 10 раз превышающую терапевтическую, по сравнению с RIF, который ингибирует активности P-гр уже при терапевтической концентрации. Это может свидетельствовать о том, что BDQ обладает более слабой субстратной специфичностью к P-гр в сравнении с RIF.

Влияние фармакологического ингибирования P-гр на провоспалительные свойства макрофагов под воздействием рифампицина и бедаквилина в процессе их дифференцировки.

Анализ секреции цитокинов показал, что при фармакологическом ингибировании P-гр концентрация секретируемых провоспалительных цитокинов IL1b, TNF α и IL6 на ранних сроках макрофагальной дифференцировки снижается, в то время как экспрессия генов соответствующих цитокинов не изменяется (за исключением IL6). На 7 сутки дифференцировки повышается экспрессия генов всех исследованных цитокинов, в то время как уровень секреции IL1b снижается, уровни TNF α и IL6 не отличаются, а секреция цитокина IL10 повышается по сравнению с контролем (рис.8).

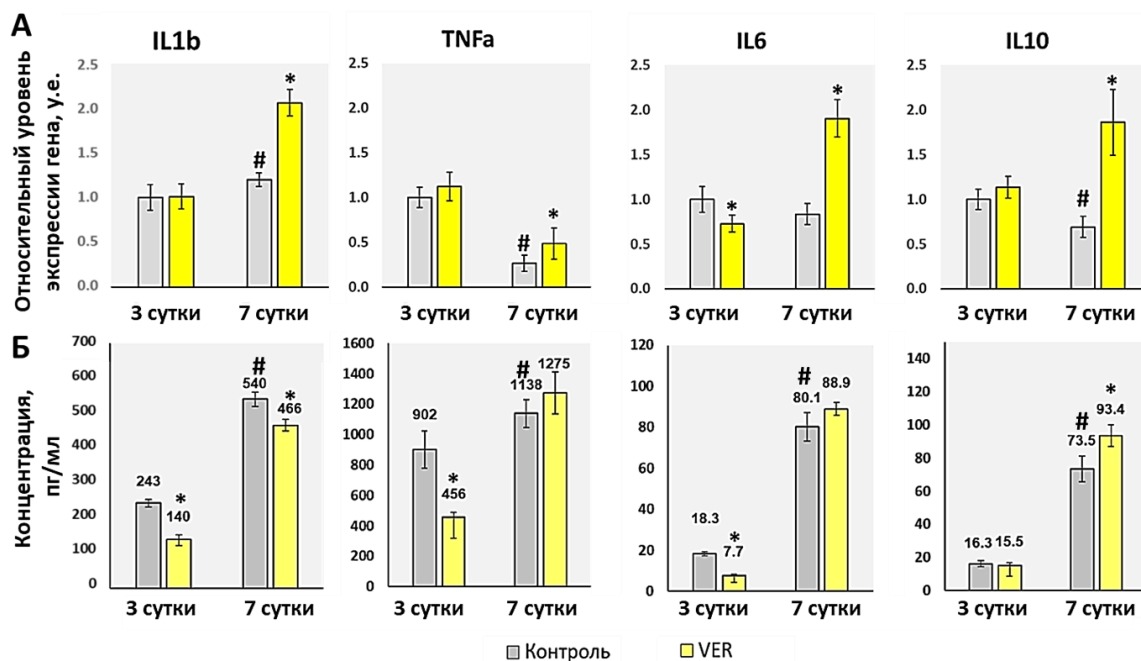


Рис. 8. Влияние фармакологического ингибирования на (А) экспрессию генов и (Б) секрецию цитокинов в макрофагах ТНР-1 в процессе дифференцировки. VER – R-верапамил. Относительный уровень экспрессии генов в контроле на 3 сутки принят за 1. Статистически значимые различия, $p < 0,05$ * – по сравнению с контролем на соответствующие сутки дифференцировки, # – между 3 и 7 сутками. Данные представлены как среднее и SD.

Сопоставление уровней экспрессии генов соответствующих цитокинов с их секрецией позволяет предположить, что фармакологическое ингибирование R-гр препятствует секреции всех анализируемых провоспалительных цитокинов. На ранних сроках макрофагальной дифференцировки этот эффект выражен для всех трёх провоспалительных цитокинов, а на поздних сроках – в первую очередь для IL1b. Отсутствие возрастания уровней секреции TNFa и IL6 на этом сроке на фоне возросшей экспрессии их генов, также может свидетельствовать об ингибировании их секреции.

RIF снижает не только экспрессию генов, но и секрецию провоспалительных цитокинов на всех сроках макрофагальной дифференцировки, т.е. RIF оказывает противовоспалительный эффект (рис. 9).

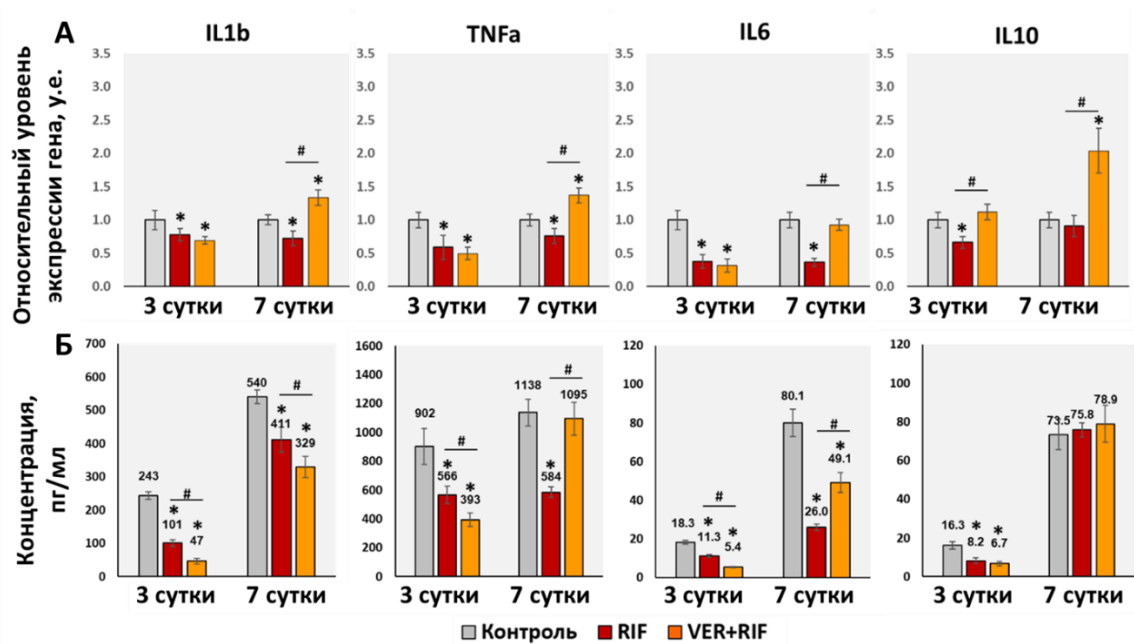


Рис. 9. Влияние фармакологического ингибирования P-гр на (А) экспрессию генов и (Б) секрецию цитокинов в макрофагах THP-1 под воздействием рифампицина. * – статистически значимые различия по сравнению с контролем, # – между рифампицином (RIF) и R-верапамилом и рифампицином (VER+RIF), $p < 0,05$. Данные представлены как среднее и SD. Относительный уровень экспрессии генов в контроле на 3 и 7 сутки принят за 1.

Если анализировать эффекты RIF при фармакологическом ингибировании P-гр VER, то на 3 сутки дифференцировки VER не оказывает дополнительного влияния на сниженную экспрессию генов провоспалительных цитокинов, которые наблюдаются при действии RIF; при этом VER в еще большей степени снижает секрецию этих цитокинов по сравнению только с RIF. На 7 сутки макрофагальной дифференцировки при совместной инкубации VER и RIF происходит увеличение экспрессии генов всех исследованных цитокинов и увеличение секреции TNFα и IL6 по сравнению только с RIF, т.е. происходит частичная отмена противовоспалительного эффекта RIF. Таким образом, фармакологическое ингибирование P-гр усиливает противовоспалительные эффекты RIF на ранних сроках макрофагальной дифференцировки, но на поздних сроках дифференцировки – частично их отменяет.

Если о противовоспалительных эффектах RIF известно, то свойства BDQ на макрофаги только начинают изучать. На ранних сроках дифференцировки под действием BDQ снижаются уровни экспрессии генов *IL1b* и *IL6* и увеличивается экспрессия гена *IL10*. На 7 сутки уровни экспрессии генов *TNFα*, *IL6* и *IL10* значительно повышаются (рис.10).

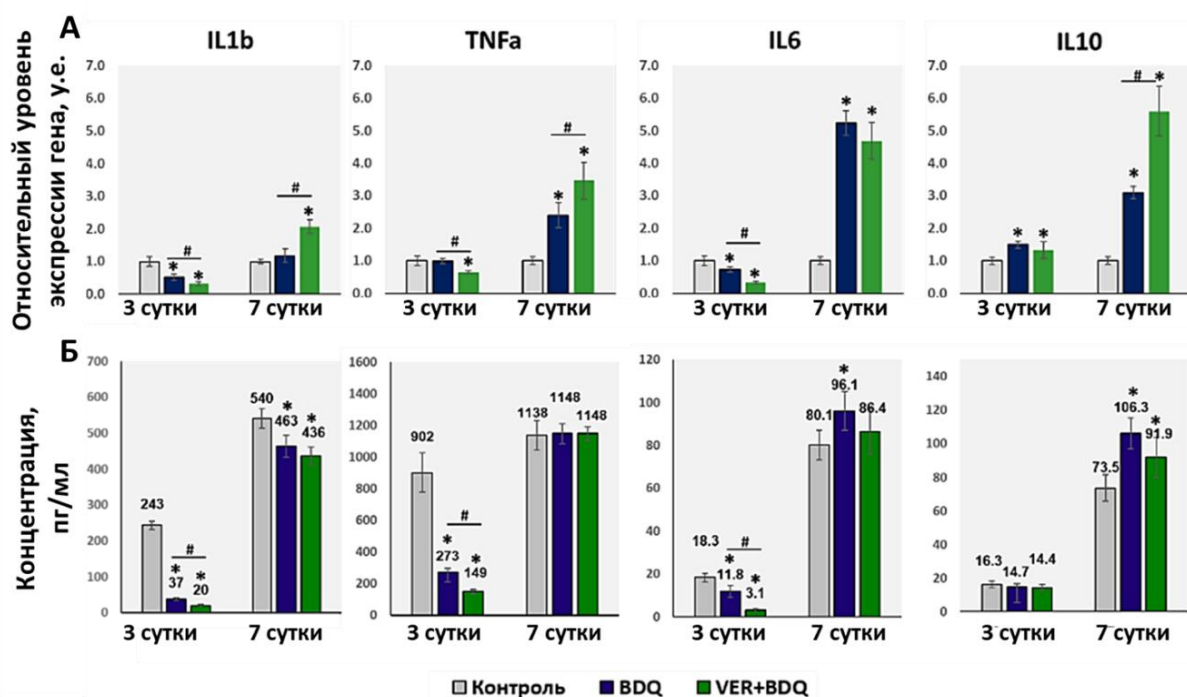


Рис. 10. Влияние фармакологического ингибирования Р-гр на (А) экспрессию генов и (Б) секрецию цитокинов в макрофагах ТНР-1 под воздействием бедаквилина. * – статистически значимые различия по сравнению с контролем, # – между бедаквилином (BDQ) и R-верапамилом и бедаквилином (VER+BDQ), $p < 0,05$. Данные представлены как среднее и SD. Относительный уровень экспрессии генов в контроле на 3 и 7 сутки принят за 1.

Уровни секреции провоспалительных цитокинов на ранних сроках макрофагальной дифференцировки снижаются при действии BDQ, в то время как на поздних сроках дифференцировки, по сравнению с контролем, уровень секреции IL1b снижается, TNFa не изменяется, несмотря на значительное повышение экспрессии гена, а секреция IL6 незначительно, но статистически значимо, повышается. Таким образом, BDQ оказывает различные эффекты на макрофаги ТНР-1 в зависимости от стадии их дифференцировки. Если на ранних сроках BDQ проявляет выраженный противовоспалительный эффект, то на поздних сроках наблюдается повышенный уровень секреции как IL6, так и IL10.

При фармакологическом ингибировании Р-гр в макрофагах под воздействием BDQ на 3 сутки дифференцировки уровни экспрессии *IL1b*, *TNFa* и *IL6* ниже, чем при инкубации макрофагов только с BDQ. Но на 7 сутки, напротив, наблюдается увеличение экспрессии генов *IL1b* и *TNFa*, а экспрессия *IL10* увеличивается почти в 2 раза. При этом уровни секреции цитокинов на 3 сутки повторяют динамику изменения экспрессии генов и статистически значимо снижаются по сравнению с воздействием только BDQ, т.е. фармакологическое ингибирование Р-гр усиливает

противовоспалительные эффекты BDQ на ранних сроках дифференцировки. На поздних сроках дифференцировки фармакологическое ингибирование Р-гр не влияет на эффекты BDQ.

Также был обнаружено, что BDQ в терапевтической концентрации оказывает выраженный эффект на экспрессию генов фагоцитарных рецепторов на ранних сроках макрофагальной дифференцировки, как *CD64* ($RQ=3,70 \pm 0,48$) – гена Fc-рецептора к IgG, так и *CD209* ($RQ=5,26 \pm 0,40$) – гена лектинового рецептора. На 7 сутки повышенная экспрессия наблюдается только для гена *CD209*. Анализ фагоцитарной активности ТНР-1 макрофагов показал, что BDQ усиливает фагоцитоз IgG опсонизированных латексных частиц на ранних сроках макрофагальной дифференцировки, а на поздних сроках сохраняется повышенная активность фагоцитоза через Fc-рецепторы к IgG, но также увеличивается активность фагоцитоза опсонизированных D-маннаном частиц. Таким образом, BDQ увеличивает экспрессию генов фагоцитарных рецепторов и активирует рецепторный фагоцитоз.

Влияние инфицирования *M. tuberculosis* на экспрессию *ABCB1* и фенотип макрофагов ТНР-1.

Была проанализирована экспрессия про- и противовоспалительных генов цитокинов и фагоцитарных рецепторов в макрофагах ТНР-1 через 24 часа после их инфицирования *M.tb*. Данные об относительном уровне экспрессии (RQ) генов представлены ниже (рис.11).

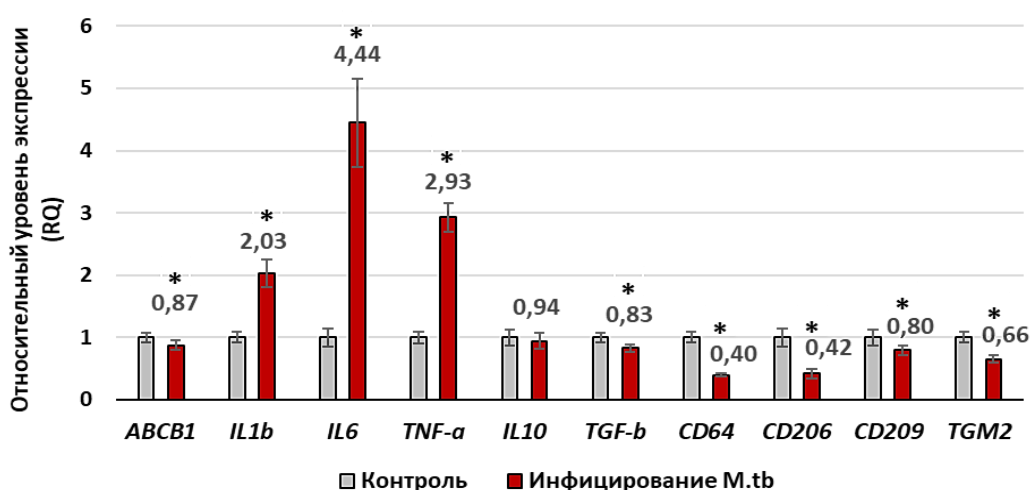


Рис. 11. Экспрессия генов в ТНР-1 макрофагах через 24 часа после инфицирования вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. На графике представлены средние значения относительного уровня экспрессии генов (RQ) \pm SD, RQ в контроле принят за 1. * – статистически значимые различия, $p < 0,05$.

Анализ экспрессии генов показал, что при инфицировании макрофаги усиливают провоспалительный ответ, который выражается в увеличении экспрессии генов таких провоспалительных цитокинов как *IL1b*, *IL6*, а также *TNFa*. При этом снижается уровень экспрессии гена противовоспалительного цитокина *TGFb1*, в то время как экспрессия гена другого противовоспалительного цитокина *IL10* достоверно не изменяется. Также было выявлено снижение экспрессии гена *TGM2*, который является маркером противовоспалительных M2 макрофагов. Этот факт также свидетельствует о том, что через 24 часа после инфицирования вирулентным штаммом *M.tb* происходит усиление провоспалительного фенотипа макрофагов ТНР-1. Также наблюдалось значительное снижение (в среднем в 1,5–3 раза) экспрессии генов как лектиновых фагоцитарных рецепторов (*CD206*, *CD209*), так и гена Fc-рецептора к IgG *CD64*. Экспрессия гена *ABCB1*, незначительно, но достоверно снижалась через 24 часа после инфицирования по сравнению с неинфицированными макрофагами. Полученные данные свидетельствуют о том, что при усилении провоспалительного фенотипа макрофагов в ответ на инфицирование *M.tb* снижается экспрессия гена *ABCB1*.

Характеристика клеточной линии моноцитов с нокдауном гена *ABCB1*.

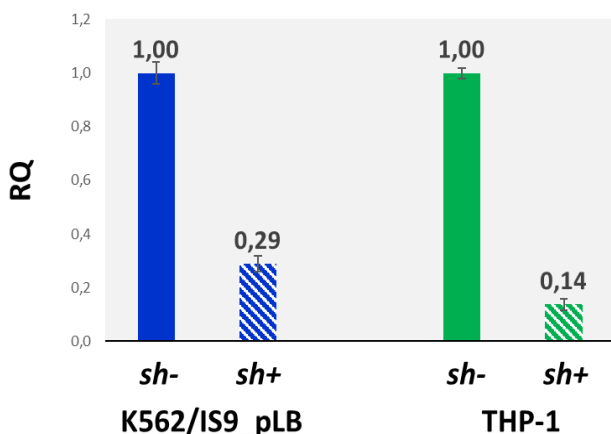


Рис. 12. Эффективность нокдауна *ABCB1* в трансдуцированных плазмидой pLB клетках. sh – шпилечная РНК против мРНК гена *ABCB1*. На графике представлены средние значения относительного уровня экспрессии гена (RQ) ± стандартное отклонение. RQ в клеточных линиях, трансдуцированных плазмидой без шпилечной РНК, приняты за 1.

Нами была сконструирована shRNA, направленная против мРНК гена *ABCB1*, которая была клонирована в плазмиду pLB. В клеточной линии K562/IS9 с гиперэкспрессией гена *ABCB1* уровень мРНК снизился более чем в 3 раза по сравнению с контрольной клеточной линией K562/IS9, трансдуцированной плазмидой без shRNA; в моноцитарной клеточной линии ТНР-1, в которой *ABCB1* изначально экспрессируется на низком уровне, экспрессия гена *ABCB1* также была снижена более чем в 7 раз по сравнению с контролем

(рис.12). Таким образом, разработанная shRNA для нокдауна гена *ABCBI* демонстрирует свою эффективность на обеих суспензионных экспериментальных линиях вне зависимости от исходного уровня экспрессии гена.

При индукции макрофагальной дифференцировки в клетках ТНР-1 под воздействием форболового эфира происходит значительное увеличение экспрессии

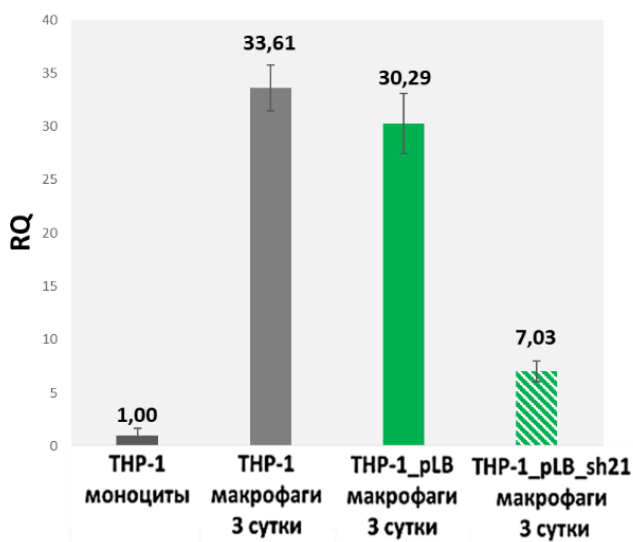


Рис. 13. Экспрессии гена *ABCBI* на 3 сутки макрофагальной дифференцировки. pLB – трансдуцированная плазмидой клеточная линия, pLB_sh21 – клетки, трансдуцированные плазмидой pLB со шпилечной РНК против мРНК гена *ABCBI*. На графике представлены средние значения относительного уровня экспрессии гена (RQ) \pm стандартное отклонение. RQ в моноцитах ТНР-1 принят за 1.

гена *ABCBI* – в среднем в 33,6 раза.

При сравнении с клеточной линией, трансдуцированной плазмидой без shRNA, не было обнаружено различий в экспрессии гена *ABCBI*, т.е. трансдукция клеток вирусными частицами, содержащих только плазмиду не приводит к изменениям экспрессии гена *ABCBI*. В то же время в клеточной линии,

трансдуцированной плазмидой, содержащей shRNA, уровень экспрессии гена *ABCBI* был снижен в 4 раза по сравнению с клеточной линией, содержащей только плазмиду (рис. 14). Таким образом, нами была продемонстрирована эффективность лентивирусной конструкции,

содержащей shRNA против мРНК гена *ABCBI* в клетках моноцитарной линии ТНР-1 при их макрофагальной дифференцировке.

Также важным является тот факт, что лентивирусная трансформация клеток ТНР-1, содержащих shRNA, не оказала влияния на морфологию клеток при индукции макрофагальной дифференцировки. Под воздействием форболового эфира клетки уходили в макрофагальную дифференцировку (рис.14).

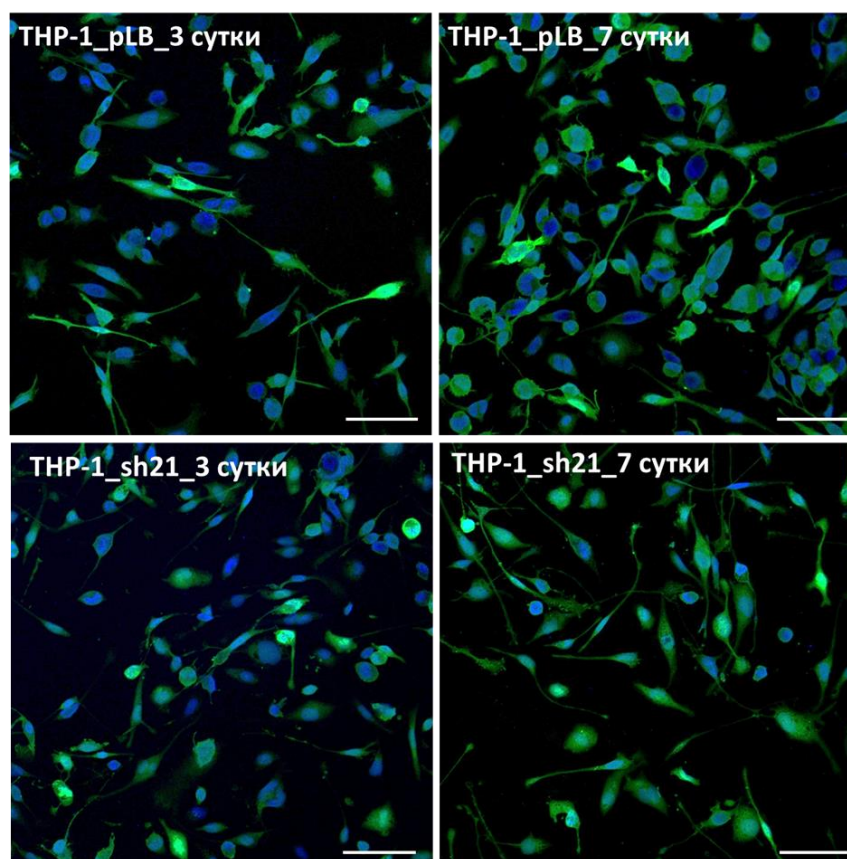


Рис. 14. Изображение трансдуцированных макрофагов THP-1 на 3 и 7 сутки дифференцировки. THP-1_sh21 – клетки, содержащие шпилечную РНК против мРНК гена *ABCB1*, THP-1_pLB – клетки с плазмидой pLB без shRNA. Зеленый – eGFP, синий – DAPI. Конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок – 50 мкм.

Также лентивирусная трансформация клеточной линии THP-1 вирусными частицами, содержащими плазмиду с shRNA к гену *ABCB1*, не оказывает влияния на фагоцитоз *M.tb* H37Rv макрофагами. Не было обнаружено статистически значимых различий между количеством колониеобразующих единиц (среднее количество КОЕ \pm стандартное отклонение) *M.tb*, полученных из макрофагов THP-1 (106 ± 28), в сравнении с трансдуцированными макрофагами, содержащими плазмиду с shRNA (93 ± 20) или только плазмиду (88 ± 31).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При выполнении данной работы впервые показано, что высокая экспрессия гена *ABCB1* коррелирует 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. tb*.

BDQ в терапевтических концентрациях не индуцирует экспрессию *ABCB1* в макрофагах человека и обладает слабой субстратной специфичностью к P-гр, в

отличие от RIF. Это может быть одним из факторов эффективности BDQ при терапии лекарственно-устойчивых форм ТБ. При этом он обладает иммуномодулирующими свойствами, а также является активатором фагоцитоза. В экспериментах с фармакологическим ингибированием Р-гр выявлено, что Р-гр опосредует транспорт цитокинов и тем самым участвует в формировании фенотипа макрофагов человека в процессе их дифференцировки, а также оказывает влияние на иммуномодулирующие свойства противотуберкулезных препаратов. Мы предполагаем, что фармакологическое ингибирование Р-гр является перспективным направлением для разработки новой стратегии лечения ТБ путём модуляции иммунобиологических функций макрофагов. При ТБ в очаг воспаления мигрируют моноциты и макрофаги, находящиеся на разных стадиях дифференцировки. Это подчеркивает важность исследования действия ПТП не только на зрелые макрофаги, но и на клетки, находящиеся в процессе дифференцировки.

Выводы

1. Выявлена взаимосвязь между высокой активностью специфического воспаления в легких больных туберкулезом и экспрессией гена *ABCBI*. Идентифицированы две молекулярно-генетические сигнатуры, ассоциированные с высокой активностью воспаления.
2. Рифампицин в терапевтической концентрации снижает экспрессию и секрецию провоспалительных цитокинов на всех сроках макрофагальной дифференцировки, а бедаквилин – только на раннем сроке. На поздних сроках бедаквилин увеличивает экспрессию генов и секрецию IL6 и IL10.
3. Фармакологическое ингибирование Р-гр влияет на провоспалительные свойства макрофагов в зависимости от стадии их дифференцировки: снижает секрецию провоспалительных цитокинов на раннем сроке и увеличивает секрецию противовоспалительного цитокина IL10 на позднем сроке дифференцировки. Фармакологическое ингибирование Р-гр усиливает эффекты рифампицина и бедаквилина только на раннем сроке дифференцировки макрофагов.
4. Инфицирование макрофагов *M. tuberculosis* снижает экспрессию гена *ABCBI* и усиливает экспрессию генов провоспалительных цитокинов.
5. Получена стабильная клеточная линия моноцитов ТНР-1 со сниженной экспрессией гена *ABCBI*.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

1. Pavlova E. N., Shaposhnikova D.A., Petrichuk S.V, Radygina T.V., Erokhina M.V. Quantitative analysis of latex beads phagocytosis by human macrophages using imaging flow cytometry with extended depth of field// *Methods in molecular biology*. — 2023. — Vol. 2635. — P. 203–215. **IF** (Scopus, SJR) = 0.422 (0.81/0.74)*
2. Павлова Е.Н., Ерохина М.В., Рыбалкина Е.Ю., Поташникова Д.М., Масютин А.Г., Лепеха Л.Н., Эргешов А.Э. Влияние рифампицина на индукцию активности MDR/P-gp в провоспалительных макрофагах человека// *Антибиотики и химиотерапия*. — 2022. — Т. 67, № 3-4. — С. 16–22. **IF** (РИНЦ) = 0.528 (0.74/0.50)*
3. Ерохина М. В., Павлова Е. Н., Тарасова Е. К., Курынина А. В., Поташникова Д. М., Лепеха Л. Н., Эргешов А. Э., Онищенко Г. Е. Наночастицы полимера молочной кислоты с рифампицином снижают активность мультилекарственного транспортёра P-gp в макрофагах человека// *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. — 2022. — Т. 77, № 3. — С. 166–172. **IF** (РИНЦ) = 0.630 (0.63/0.42)*
4. Yamansarov E. Y., Lopatukhina E. V., Evteev S. A., Skvortsov D. A., Lopukhov A. V., Kovalev S. V., Vaneev A. N., Shkil' D. O., Akasov R. A., Lobov A. N., Naumenko V. A., Pavlova E. N., Ryabaya O. O., Burenina O. Y., Ivanenkov Y. A., Klyachko N. L., Erofeev A. S., Gorelkin P. V., Beloglazkina E. K., Majouga A. G. Discovery of bivalent GalNac-conjugated betulin as a potent asgpr-directed agent against hepatocellular carcinoma// *Bioconjugate Chemistry*. — 2021. — Vol. 32, no. 4. — P. 763–781. **IF** (WoS) = 6.07 (2/0.10)*

Другие публикации по теме диссертации

1. Ерохина М.В., Лепеха Л.Н., Рыбалкина Е.Ю., Павлова Е.Н., Онищенко Г.Е. Влияние рифампицина и его инкапсулированной формы на функциональную активность белка множественной лекарственной устойчивости Pgp в миелоидных клетках человека// *Вестник ЦНИИТ*. — 2018. — Т. 2, № № 2. — С. 28–39. (0.69/0.32)*.
2. Ерохина М. В., Павлова Е. Н., Лепеха Л. Н., Эргешов А. Э. Влияние бедаквилина на белок лекарственной устойчивости P-gp// *Фундаментальные исследования во фтизиатрии под редакцией член-корр. РАН А.Э.Эргешова*. — ФГБНУ Центральный научно-исследовательский институт туберкулёза Москва: 2023. — С. 32–45. (0.69/0.26)*

*В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.