

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
М. В. ЕРОХИНА

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	6
1.1 Актуальность и степень разработанности темы исследования.....	6
1.2 Цель исследования	9
1.3 Задачи исследования	9
1.4 Объект и предмет исследования	10
1.5 Научная новизна	10
1.6 Теоретическая и практическая значимости работы	10
1.7 Методология исследования	10
1.8 Достоверность.....	11
1.9 Положения, выносимые на защиту.....	11
1.10 Апробация работы.....	11
1.11 Публикации	11
1.12 Финансовая поддержка	12
1.13 Личный вклад автора в проведение исследования.....	12
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
2.1 R-gr: общая характеристика и роль при туберкулезном воспалении.....	13
2.1.1 <i>Общая характеристика R-gr</i>	13
2.1.2 <i>Локализация R-gr в нормальных тканях и его физиологическая роль</i>	18
2.1.3 <i>Влияние R-gr на фармакокинетику лекарственных препаратов</i>	21
2.1.4 <i>Регуляция экспрессии гена белка R-gr</i>	23
2.1.5 <i>R-gr при туберкулезном воспалении</i>	26
2.1.6 <i>R-gr как иммунорегулятор</i>	27
2.2 Характеристика туберкулезного воспаления.....	29
2.3 «Терапия, направленная на хозяина» и иммуномодулирующие свойства противотуберкулезных препаратов	32
2.3.1 <i>Иммуномодулирующие эффекты рифампицина</i>	33
2.3.2 <i>Иммуномодулирующие эффекты бедаквилина</i>	37
2.4 Роль макрофагов в регуляции ТБ воспаления	39
2.5 Заключение по литературному обзору	41
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
3.1. Материалы и методы клинической части исследования	43
3.1.1. <i>Операционный материал легких больных</i>	43
3.1.2. <i>Гистологические исследование</i>	43
3.1.3. <i>Анализ экспрессии генов в операционном материале</i>	43
3.1.4. <i>Обработка данных и статический анализ</i>	45
3.2. Материалы и методы экспериментальной части <i>in vitro</i> исследования.....	46
3.2.1. <i>Клеточные линии</i>	46
3.2.2. <i>Экспериментальные концентрации препаратов</i>	46
3.2.3. <i>Дизайн экспериментов по исследованию влияния фармакологического ингибирования R-gr на макрофаги TНP-1, в том числе и под воздействием противотуберкулезных препаратов</i>	47
3.2.4. <i>Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени</i>	48
3.2.5. <i>Определение концентрации цитокинов в культуральной среде</i>	49
3.2.6. <i>Исследование влияния препаратов на функциональную активность R-gr</i> ...49	

3.2.8.	<i>Анализ данных проточной цитофлуориметрии</i>	51
3.2.9.	<i>Сканирующая электронная микроскопия</i>	51
3.2.10.	<i>Лентивирусная трансформация клеточной линии THP-1</i>	51
3.2.10.1.	<i>Разработки плазмиды со шпилечной РНК против гена ABCB1</i>	51
3.2.10.2.	<i>Лентивирусная трансдукция клеток разработанной плазмидой со шпилечной РНК</i>	53
3.2.11.	<i>Инфицирование макрофагов THP-1 M. tuberculosis</i>	54
3.2.12.	<i>Статистическая обработка данных</i>	55
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ	56
4.1	Взаимосвязь между экспрессией гена ABCB1 и экспрессией генов, регулирующих воспаление, в легочной ткани больных туберкулезом в зависимости от активности воспалительного процесса	56
4.1.1	<i>Морфологическая характеристика туберкулом с умеренной и высокой активностью воспаления</i>	56
4.1.2	<i>Экспрессия генов ABC-транспортеров (P-gr, MRP1, BCRP) в перифокальной области туберкулом с умеренной и высокой активностью воспаления</i>	58
4.1.3	<i>Анализ экспрессии генов в легких больных ТБ в зависимости от активности воспаления</i>	59
4.1.4	<i>Корреляционный анализ экспрессии генов в легочной ткани больных</i>	60
4.1.5	<i>Выявление сигнатур генов, связанных с высокой и низкой экспрессией гена ABCB1 при высокой активности воспаления</i>	62
4.2	Влияние бедаквилина и рифампицина, инкапсулированного в полимер молочной кислоты, на функциональную активность P-gr	67
4.2.1	<i>Влияние рифампицина, инкапсулированного в полимер молочной кислоты, на функциональную активность P-gr</i>	67
4.2.2	<i>Влияние бедаквилина на функциональную активность P-gr</i>	69
4.3	Влияние противотуберкулезных препаратов на экспрессию гена ABCB1 в макрофагах человека	70
4.4	Влияние фармакологического ингибирования P-gr на провоспалительные свойства макрофагов в процессе их дифференцировки и под воздействием рифампицина и бедаквилина	71
4.4.1	<i>Влияние фармакологического ингибирования P-gr на экспрессию и секрецию цитокинов в макрофагах THP-1 в процессе их дифференцировки</i>	72
4.4.2	<i>Влияние фармакологического ингибирования P-gr на экспрессию генов и секрецию цитокинов в макрофагах человека под воздействием рифампицина</i>	74
4.4.3	<i>Влияние фармакологического ингибирования на экспрессию генов и секрецию цитокинов в макрофагах человека под воздействием бедаквилина</i>	75
4.4.4	<i>Влияние фармакологического ингибирования на экспрессию фагоцитарных рецепторов в макрофагах THP-1 при действии рифампицина и бедаквилина</i>	77
4.5	Влияние инфицирования M. tuberculosis на экспрессию ABCB1 и фенотип макрофагов THP-1	80
4.6	Характеристика полученной клеточной линии моноцитов с нокдауном гена ABCB181	
4.6.1	<i>Оценка эффективности нокдауна гена ABCB1</i>	81

4.6.2	Оценка стабильности генетической конструкции при длительном культивировании и после криоконсервации клеток	84
4.6.3	Оценка эффективности фагоцитоза в трансдуцированных ТНР-1 макрофагах	85
5.	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	87
5.1	Экспрессия гена <i>ABCB1</i> в перифокальной области туберкулом в зависимости от активности ТБ воспаления.....	87
5.2	Влияние рифампицина, инкапсулированного в полимер молочной кислоты, и бедаквилина на функциональную активность Р-гр	93
5.3	Влияние рифампицина и бедаквилина на экспрессию гена <i>ABCB1</i> в процессе дифференцировки ТНР-1 макрофагов	95
5.4	Влияние фармакологического ингибирования Р-гр на провоспалительные свойства макрофагов человека как самостоятельно, так и под воздействием противотуберкулезных препаратов, в процессе их дифференцировки.....	98
5.5	Влияние инфицирования <i>M. tuberculosis</i> на экспрессию <i>ABCB1</i> и провоспалительный фенотип макрофагов ТНР-1	101
6.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
7.	ВЫВОДЫ.....	105
8.	ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ.....	106
9.	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЛПС	-	липополисахарид
МЛУ	-	множественная лекарственная устойчивость
ПТП	-	противотуберкулезные препараты
ТБ	-	туберкулез
ABC	-	АТФ связывающая кассета
BCRP	-	Breast Cancer Resistance Protein, белок устойчивости к раку молочной железы
BDQ	-	бедаквилин
CD	-	кластер дифференцировки
FACS	-	fluorescence-activated cell sorting, активируемая флуоресценцией сортировка клеток
GFP	-	зеленый флуоресцентный белок
HDT	-	host directed therapy, терапия, направленная на хозяина
IgG	-	иммуноглобулин G
IL	-	интерлейкин
INF γ	-	интерферон гамма
HIF	-	hypoxia-inducible factor, гипоксией индуцируемый фактор
<i>M.tb</i>	-	<i>M. tuberculosis</i> , микобактерии туберкулеза
MRP	-	Multidrug Resistance associated Protein, ассоциированный с лекарственной устойчивостью белок
NBD	-	нуклеотид-связывающий домен
NF- κ B	-	Nuclear factor- κ B, ядерный фактор каппа В
NO	-	оксид азота
P-gp	-	P-glycoprotein, P-гликопротеин
PMA	-	форболовый эфир
PXR	-	pregnane X receptor, ядерный прегнанный рецептор
RIF	-	рифампицин
shRNA	-	шпилечная РНК
STAT	-	Signal transducer and activator of transcription, сигнальный белок и активатор транскрипции из семейства белков STAT
TGM2	-	тканевая трансглутаминаза 2
Th	-	Т-хелперные лимфоциты
TMD	-	трансмембранный домен
VER	-	верапамил

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Актуальность и степень разработанности темы исследования

Туберкулез (ТБ) – инфекционное заболевание, возбудителем которого является *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*). По данным Всемирной Организации Здравоохранения ТБ входит в десятку ведущих причин смертности в мире. Благодаря глобальным усилиям заболеваемость снижается на 2% в год, но при этом растет число случаев лекарственно-устойчивого ТБ: в 2019 году было выявлено и поставлено на учет на 10% больше человек с ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) или с устойчивостью к рифампицину по сравнению с 2018 годом (“Global Tuberculosis Report,” 2022). Если стандартный курс терапии лекарственно-чувствительного ТБ длится 6 месяцев, то лечение МЛУ-ТБ может растягиваться на годы и требует применения дорогостоящих и имеющих высокую токсичность новейших антибиотиков. Но даже в этом случае эффективность терапии остается невысокой (Dartois and Rubin, 2022). Следует учесть, что на разработку и внедрение новых противотуберкулезных препаратов (ПТП) требуется не один десяток лет, что хорошо видно на примере бедаквилина (BDQ). BDQ – новый ПТП, разработанный впервые за последние 50 лет, используется в клинической практике для лечения МЛУ-ТБ (Worley and Estrada, 2014). Однако и к нему уже зафиксировано появление резистентности у *M.tb* (Ismail et al., 2022). 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 к антибиотикам (Al-Ghafli and Al-Hajoj, 2019). Но понятие «устойчивость к лекарственным препаратам» применимо и для клеток млекопитающих. Почти 50 лет назад был открыт гликопротеин, который обеспечивал резистентность опухолевых клеток яичника китайского хомячка к колхицину. Этот белок был назван Р-гликопротеин (P-gp), заглавная буква «Р» в названии белка от слова Permeability, что означает, что белок оказывал влияние на проницаемость различных типов химиотерапевтических препаратов внутрь клетки (Juliano and Ling, 1976). Уже в этой работе авторы обнаружили, что клетки были устойчивы не только к колхицину, но и к широкому ряду противоопухолевых амфифильных агентов. За эту способность P-gp был назван белком множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). На сегодняшний день открыто еще несколько белков МЛУ, большинство из которых принадлежит к суперсемейству АВС-транспортеров (ATP Binding Cassette, АТФ-связывающая кассета). Это такие белки как MRP1-5 (Multidrug Resistance associated protein, ассоциированный с лекарственной устойчивостью белок) и BCRP (Breast cancer resistance protein, белок устойчивости к раку молочной железы). Гидролизую АТФ, эти белки транспортируют из клеток широкий спектр

химиотерапевтических агентов, снижая их внутриклеточные концентрации и не позволяя им достигать своих мишеней. P-gr обнаруживается во многих, преимущественно барьерных, тканях организма, в том числе в клетках легкого (Campbell et al., 2003) и в различных популяциях иммунных клеток (van de Ven et al., 2009; Bossennec et al., 2018), где он выполняет разнообразные физиологические функции. Несмотря на то, что белки МЛУ были открыты в опухолевых клетках и феномен МЛУ рассматривается в основном применительно к терапии онкологических заболеваний, появляется все больше исследований, свидетельствующих о том, что активность белков МЛУ, в особенности P-gr, может влиять на успешность лекарственной терапии целого ряда нейродегенеративных (Rapposelli et al., 2009), неврологических (Gidal, 2014) и аутоиммунных (Richaud-Patin et al., 2004) заболеваний.

Изучение активности P-gr актуально и при ТБ (Te Brake et al., 2018a). Известно, что в инфицированных макрофагах персистирует возбудитель ТБ *M.tb*, и они являются одной из основных клеточных мишеней ПТП. Так как в макрофагах присутствует функционально активный P-gr (Cory et al., 2016), в целях разработки стратегий повышения эффективности терапии ТБ особенно актуальным является вопрос о взаимодействии ПТП с данным белком. Для одного из основных ПТП – рифампицина (RIF), уже показано, что он является не только субстратом для P-gr (Fardel et al., 1995; Hartkoorn et al., 2007), но и может повышать уровень экспрессии его гена *ABCBI* и функциональную активность белка в эпителиальных клетках (Geick et al., 2001; Kim et al., 2015; Martinec et al., 2021). Возможность индукции экспрессии P-gr в макрофагах, особенно при действии терапевтических концентраций RIF, остается малоизученным вопросом. Ранее на моделях экспериментального ТБ было показано, что применение фармакологического ингибитора P-gr верапамила (VER) совместно с RIF способствует повышению бактерицидных эффектов этого антибиотика, в том числе и в отношении устойчивых к RIF штаммов *M.tb* (Demitto et al., 2015; Gupta et al., 2013). Также было показано, что VER усиливает бактерицидный эффект и BDQ (Adams et al., 2014; Gupta et al., 2015; Xu et al., 2018; Viljoen et al., 2019). При этом не получены ответы на вопросы, является ли BDQ субстратом для P-gr и какое он оказывает влияние на экспрессию его гена и функциональную активность белка.

Различные факторы воспаления могут влиять на экспрессию гена и функциональную активность P-gr. Уровень экспрессии *ABCBI* может изменяться под воздействием провоспалительных цитокинов (Puddu et al., 1999; Ho and Piquette-Miller, 2006; Liptrott et al., 2009), внутриклеточных патогенов (Gollapudi et al., 1994; Sigal et al., 2015) и гипоксии (Ding et al., 2010; Xie et al., 2018). В том числе показано, что экспрессия гена P-gr увеличивается в макрофагах человека при инфицировании патогенными штаммами *M.tb* (Wu et al., 2019).

Ранее нами было показано, что экспрессия *ABCBI* в тканях легких больных ТБ была значительно выше по сравнению с генами других МЛУ транспортеров (Ерохина и др., 2016). У мышей на модели экспериментального ТБ также было обнаружено, что экспрессия генов белка Р-гр (*Abcb1a* и *Abcb1b*) в легких возрастает в процессе прогрессирования туберкулезного воспаления, что может свидетельствовать о том, что факторы, сопровождающие воспаление, выступают в качестве индукторов экспрессии гена Р-гр (Ерохина и др., 2019). Вопрос о том, какие факторы воспаления влияют на экспрессию гена Р-гр 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-гр может препятствовать достижению оптимальных концентраций ПТП в очагах ТБ воспаления и снижать эффективность лечения.

Другой перспективной стратегией повышения эффективности лечения ТБ, особенно МЛУ-ТБ, является модуляция иммунных функций клеток больных ТБ, которая будет способствовать усилению бактерицидных эффектов ПТП (Tobin, 2015; Tiberi et al., 2018). 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* (Marino et al., 2015). 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 (Park et al., 2021).

Известно что ПТП, кроме непосредственного бактерицидного эффекта, могут обладать иммуномодулирующими свойствами. RIF является не только субстратом для Р-гр, но также оказывает влияние на иммунный ответ. То, что RIF обладает противовоспалительными свойствами, было показано еще в 70-х годах прошлого века (Păunescu, 1970; Litwin et al., 1974).

Так как BDQ был введен в клиническую практику не так давно, с 2013 года (Perrin et al., 2022), на сегодняшний день практически отсутствуют данные о его иммуномодулирующих свойствах или мишенях в клетках человека, в отличие от RIF. Только недавно для BDQ был обнаружен сильный иммуномодулирующий эффект на *in vitro* модели макрофагов человека: антибиотик активировал лизосомальный компартмент клеток, что приводило к усилению их бактерицидных свойств (Giraud-Gatineau et al., 2020).

Кроме влияния Р-гр на фармакокинетику лекарственных препаратов, которые являются субстратами для данного белка, в последние десятилетия появились данные, которые свидетельствуют о важной роли Р-гр и как регулятора иммунного ответа. Так,

мышь с нокаутом генов белка P-gr характеризуются сниженной секрецией провоспалительных цитокинов и меньшим количеством иммунных клеток в зоне воспаления по сравнению с контролем (van der Deen et al., 2007; Kooij et al., 2009). Также есть данные, предполагающие, что P-gr может участвовать в транспорте цитокинов из иммунных клеток (Drach et al., 1996; Pawlik et al., 2005). Это позволяет предположить, что ингибирование P-gr может влиять на иммунные свойства макрофагов, в том числе и под воздействием ПТП.

Таким образом, имеются данные, которые позволяют предположить, что не только ПТП могут влиять на функциональную активность P-gr и иммунные свойства макрофагов, но и P-gr может оказывать влияние на транспорт ПТП, а также модулировать иммунные свойства макрофагов и влиять на иммуномодулирующие эффекты ПТП. В этой связи является актуальным выявление особенностей влияния ПТП как на иммунные свойства макрофагов человека, так и на пути их взаимодействия с основным белком МЛУ – P-gr. Другим важным вопросом является определение того, какие факторы воспаления влияют на экспрессию гена P-gr в легких больных ТБ, так как высокая активность P-gr может препятствовать достижению оптимальных концентраций ПТП в очагах туберкулёзного воспаления и снижать их эффективность. Понимание этих аспектов важно для разработки новых стратегий лечения ТБ, направленных на организм самого больного.

1.2 Цель исследования

Цель работы – выявить функциональную роль P-гликопротеина в нормальных и инфицированных *M. tuberculosis* макрофагах человека при действии противотуберкулёзных препаратов.

1.3 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 бедаквилина на провоспалительные свойства макрофагов.
- 3) Определить влияние фармакологического ингибирования P-гликопротеина на провоспалительные свойства макрофагов в процессе их дифференцировки и под воздействием рифампицина и бедаквилина.
- 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 нокаутом гена *ABCB1*.

1.4 Объект и предмет исследования

Объектом исследования данной диссертационной работы являются ТНР-1 макрофаги человека на различных стадиях макрофагальной дифференцировки, а также резекционный материал, полученный из перифокальной области туберкулом легких больных ТБ. Предметом исследования в диссертации 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. tuberculosis*. А также экспрессия гена *ABCB1* (Р-гр) и генов – маркеров макрофагов, цитокинов и факторов транскрипции, регулирующих воспаление, в перифокальной области туберкулом легких больных туберкулезом.

1.5 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 нокдауном гена *ABCB1*.

1.6 Теоретическая и практическая значимости работы

В результате выполнения работы были 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, ассоциированные с высокой активностью воспаления в легких больных, расширяют знания об иммунопатологии ТБ и могут быть использованы при разработке терапевтических подходов, направленных на регуляцию туберкулезного воспаления и предотвращение повреждения легких, опосредованного высокой активностью воспаления. Исследование влияния ингибирования Р-гр на свойства макрофагов человека и иммуномодулирующие эффекты противотуберкулезных препаратов является перспективным направлением для разработки новой стратегии лечения туберкулеза путём модуляции иммунобиологических функций макрофагов.

1.7 Методология исследования

В основе данной диссертационной работы лежат современные методы клеточной и молекулярной биологии, гистологии. Анализ данных проводился с помощью релевантных методов статистической обработки данных. Анализ экспрессии генов был выполнен с помощью количественной ПЦР в реальном времени; функциональную активность Р-гр и

активность фагоцитоза оценивали с помощью проточной цитометрии; секрецию цитокинов – с помощью мультиплексного флуоресцентного анализатора MagPlex, используя готовые панели MILLIPLEX; для получения стабильной клеточной линии моноцитов THP-1 клетки трансформировали с помощью лентивирусных частиц, содержащих плазмиду с разработанной автором шпилечной РНК, направленной на мРНК гена *ABCBI*. Инфицирование макрофагов THP-1 *M.tb* (вирулентный штамм H37Rv) проводили в сертифицированном для данного вида работ vivарии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (ФГБНУ «ЦНИИТ»).

1.8 Достоверность

Результаты работы характеризуются высокой степенью достоверности. В исследовании клинической части работы был проанализирован резекционный материал, полученный от 56 больных с диагнозом «множественные туберкуломы легких», направленных на плановую операцию в ФГБНУ «ЦНИИТ». Все *in vitro* эксперименты были проведены не менее, чем в 3 биологических повторностях.

1.9 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.

1.10 Апробация работы

Результаты работы были представлены на 8 российских и международных конференциях, в том числе: X юбилейной всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Развитие науки и перспективы фтизиатрии: прикладные и фундаментальные аспекты» (Новосибирск, 10–11 февраля 2022 г.); X Конгрессе Национальной Ассоциации Фтизиатров (Санкт-Петербург, Россия, 25-26 ноября 2021); 31th European Respiratory Society International virtual Congress (Испания, 5-8 сентября 2021); Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Современные инновационные технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей» (Москва, Россия, 24-26 марта 2021)

1.11 Публикации

По материалам работы было 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. Список публикаций представлен в разделе 8.

1.12 Финансовая поддержка

Работа была поддержана грантом РФФИ № 20–34–90161

1.13 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.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 P-gp: общая характеристика и роль при туберкулезном воспалении

2.1.1 Общая характеристика P-gp

P-gp был открыт в 1976 году Juliano R. L. и Ling V. (Juliano and Ling, 1976). Белок был обнаружен на плазматической мембране резистентных к колхицину опухолевых клетках яичника китайского хомячка и отсутствовал в клетках дикого типа. Относительное количество данного белка на мембране клеток коррелировало со степенью резистентности клеток к колхицину. Кроме того, уже в этой работе было показано, что устойчивые к колхицину клетки демонстрировали перекрестную резистентность к широкому спектру амфифильных агентов. За способность транспортировать широкий спектр лекарственных соединений P-gp получил название «Белок множественной лекарственной устойчивости» (МЛУ или MDR, Multidrug Resistance).

Ген P-gp впервые был клонирован в 1985 году (Riordan et al., 1985). Он расположен на 7 хромосоме и содержит 29 экзонов, 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 фосфорилированием и N-гликозилированием. 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 протеин-киназой С, влияет на его транспортную функцию и связанную с ней активность АТФ-азы, а также на траффик белка в клетке (Idriss et al., 2000).

P-gp является членом суперсемейства ABC-транспортёров (ATP Binding Cassette, АТФ связывающая кассета). Белок состоит из 2-ух гомологичных половин. Каждая половина включает в себя трансмембранный домен (TMD), состоящий из 6 α -спиралей, пересекающих мембрану, и одного нуклеотид-связывающего домена (NBD), расположенного на цитоплазматической стороне. Нуклеотид-связывающие домены содержат 3 высоко консервативные последовательности: мотивы Walker A и B, которые обнаружены во многих АТФ-связывающих белках, и мотив С, который уникален именно для суперсемейства ABC-белков. Две гомологичные половины соединены цитоплазматическим линкером (CL), который обеспечивает пространственное взаимодействие двух гомологичных половин (Zhou, 2008) (рис.1).

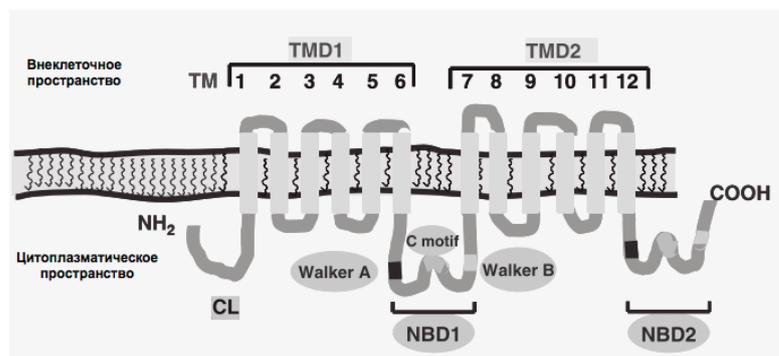


Рис.1. Топология Р-гр (рисунок сделан на основе Zhou, 2008).

Показаны 2 трансмембранных домена (ТМД1 и ТМД2), каждый из которых состоит из 6 пересекающих мембрану спиралей, 2 нуклеотид-связывающих домена (NBD), которые содержат мотивы Walker A, Walker B, С-мотив, а также цитоплазматический линкер (CL)

В 2005 году Rosenberg с соавторами была получена трехмерная структура Р-гр методом криоэлектронной микроскопии с разрешением 8Å, которая подтвердила наличие 12 трансмембранных спиралей в трансмембранном регионе и двух тесно связанных нуклеотид-связывающих доменов в цитоплазматическом пространстве (Rosenberg et al., 2005). В 2009 году была получена первая кристаллографическая структура Р-гр мыши с разрешением 4,35–4,4 Å в конформации, обращенной внутрь цитоплазмы клетки, без связывания с АТФ и в присутствии ингибиторов Р-гр (Aller et al., 2009) (рис.2).

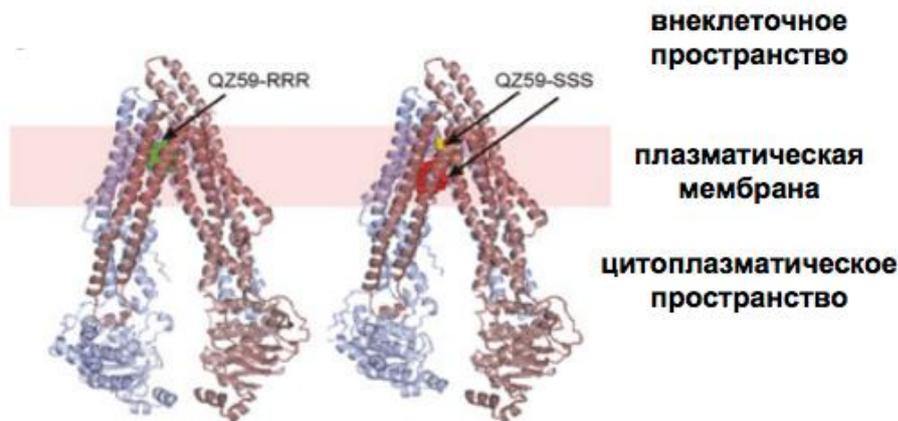


Рис. 2. Структура Р-гр мыши, полученная методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 4,35–4,4 Å, в присутствии ингибиторов Р-гр (рисунок сделан на основе Aller et al, 2009).

Слева – изображение в присутствии ингибитора QZ59-RRR (зеленый), справа – изображение Р-гр в присутствии одновременно двух ингибиторов QZ59-SSS (красный и желтый). Плазматическая мембрана обозначена розовой полосой

Как и ожидалось, карман для связывания с субстратами был доступен из внутреннего цитоплазматического слоя мембраны. Область связывания 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 6000Å, и может одновременно вмещать по меньшей мере 2 молекулы одного субстрата с помощью различных наборов взаимодействий.

Несмотря на то, что Р-гр активно исследуется уже более 40 лет, его способность распознавать и транспортировать широкий спектр соединений до сих пор недостаточно изучена. Считается, что одной из причин, которая бы могла объяснить широкую субстратную специфичность Р-гр – это наличие нескольких сайтов связывания с субстратами.

Еще в 1997 году Shapiro A.B. и Ling V. описали 2 сайта связывания: Н-сайт, названный так за специфичность связывания с Hoechst 33342 (а также с колхицином) и R-сайт, связывающий родамин 123 и антрациклины, такие как доксорубин и даунорубин (Shapiro and Ling, 1997). Эти сайты действуют кооперативно: субстрат, транспортируемый через R-сайт связывания, стимулирует перенос субстрата через Н-сайт. Так колхицин стимулировал перенос родамина 123 и ингибировал перенос Hoechst 33342, а антрациклины стимулировали транспорт Hoechst 33342 и ингибировали транспорт родамина 123. То есть уже тогда было установлено, что связывание субстратов на одном сайте связывания носит конкурентный, а на разных – неконкурентный характер.

Использование фотоактивных аналогов субстратов и ингибиторов Р-гр, таких как винбластин, колхицин, родамин 123, паклитаксел, верапамил и прочих, а также эксперименты по конкуренции субстратов позволили Safa A.R. выделить до 7 различных сайтов связывания и установить между ними связи (Safa, 2004) (рис.3).

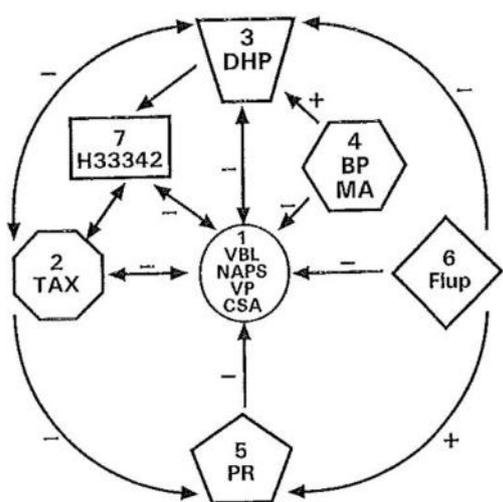


Рис. 3. Предполагаемая классификация множественных сайтов связывания лекарственных средств с Р-гр (рисунок Safa A. R., 2004).

Стрелки указывают на положительную и отрицательную связь между этими сайтами. (1) сайт связывания винбластина, а также NAPS, верапамила (VP) и циклоспорин А (CsA), (2) сайт связывания таксола, (3) сайт связывания блокатора кальциевых каналов дигидропиридина, (4) сайт связывания блокатора кальциевых каналов бепридила (BP) и мегестролацетата (МА), (5) сайт связывания флупентикса, (6) сайт связывания IAAP и (7) сайт связывания Hoechst 33342.

Множественные сайты Р-гр проявляют комплексные аллостерические взаимодействия, через которые связывание лекарственного средства на одном сайте

переключает другие сайты между конформациями высокой или низкой аффинности. Например, связывание P-gr с винбластином на 1-ом сайте препятствует связыванию других субстратов во всех сайтах связывания – отрицательная связь, в то же время прениламин и мегестролацетат (4-й сайт) усиливают связывание дигидропиридина (3 сайт).

Наиболее важным результатом этой и большинства других экспериментальных работ по идентификации сайтов связывания субстратов с P-gr является установление факта, что субстраты могут иметь более одного сайта связывания с разной степенью аффинностью и каждый из них способен к транспортной функции. Кроме того, разные субстраты P-gr могут влиять на его транспортную функцию, переключая другие сайты между конформациями с высокой и низкой аффинностью, тем самым усиливая или снижая связывание субстрата с P-gr. Таким образом, существование нескольких сайтов и их влияние друг на друга генерирует молекулярную гибкость, что позволяет объяснить широкую субстратную специфичность P-gr (Chufan et al., 2013).

По данным сайта DrugBank.org на сегодняшний день идентифицировано уже более 600 соединений размером от 330 до 4000 Да, которые являются субстратам P-gr. Так как большинство субстратов являются гидрофобными соединениями, данный белок называют также «гидрофобным пылесосом».

Изначально существовала модель P-gr как помпы, в рамках которой субстраты из клетки транспортировались непосредственно из цитоплазмы. Но позднее было показано, что такие субстраты как Hoechst 33342 и родамин 123 переносятся непосредственно из липидного бислоя мембраны, а не из водной фазы (Shapiro and Ling, 1998). На сегодняшний день существуют 2 принятые модели, которые описывают перенос субстратов P-gr из липидного бислоя мембраны: модель «гидрофобного пылесоса» и модель P-gr как флиппазы (Higgins and Gottesman, 1992).

В модели «гидрофобного пылесоса» субстраты спонтанно транслоцируются в цитоплазматическую мембрану и получают доступ к связывающему субстрат карману P-gr во внутреннем слое, откуда они экстрагируются во внеклеточную водную фазу. В модели флиппазы субстрат связывается с субстрат-связывающим карманом во внутреннем слое плазматической мембраны, а затем переворачиваются («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», и нет экспериментальных моделей, которые могли бы подтвердить одну или опровергнуть другую, кроме того, эти модели не являются взаимоисключающими (Sharom, 2014).

Транспортировка субстратов Р-гр зависит от гидролиза АТФ. В структуре Р-гр есть два NBD. Исследования бактериальных АВС-белков привели к общепринятой концепции, что NBD должны димеризоваться, чтобы обеспечить гидролиз АТФ.

Ниже представлена одна из моделей каталитического цикла Р-гр, которая была получена в результате анализа конформационных изменений методом поверхностного плазмонного анализа в бислойных липидных нанодисках (Ritchie et al., 2011) (рис.4.).

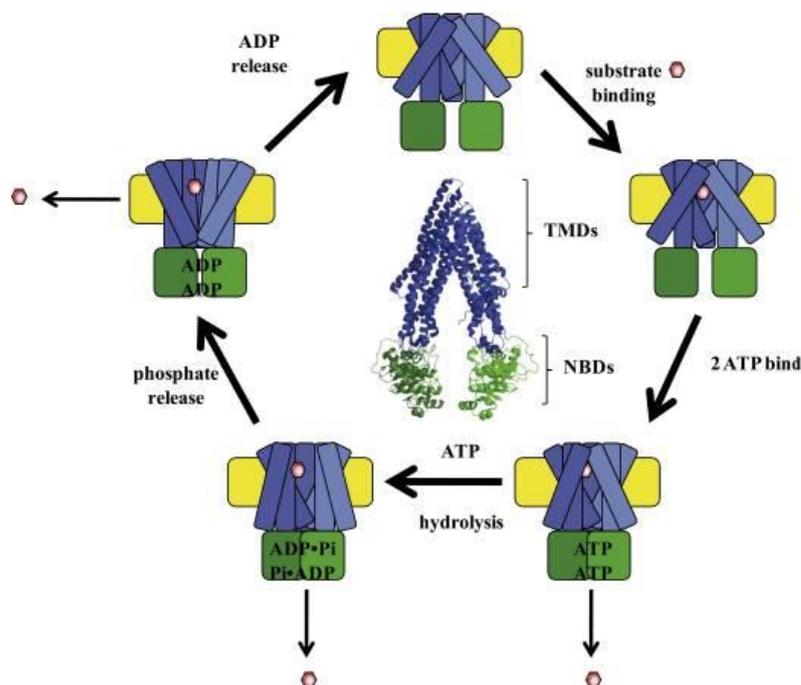


Рис. 4. Каталитический цикл Р-гр (рисунок Ritchie et al, 2011).

Структура Р-гр показана схематично: синие – трансмембранные домены (TMD), которые подвергаются конформационным изменениям при связывании с субстратом (красный шестиугольник) и АТФ (АТФ), и зеленые – нуклеотид-связывающиеся домены (NBD), которые подвергаются нуклеотид-зависимым конформационным изменениям

В данной работе было показано, что Р-гр подвергается конформационным изменениям после связывания субстрата с трансмембранными доменами и двух молекул АТФ с двумя нуклеотид-связывающими доменами (происходит запираение субстрата в канале Р-гр). Для высвобождения субстрата во внеклеточную среду необходим гидролиз АТФ с высвобождением пирофосфата (Pi), в результате чего происходит последующее конформационное изменение структуры Р-гр и открытие его канала во внеклеточную среду.

Кроме субстратов Р-гр описан также целый класс соединений, которые могут влиять на транспортную функцию Р-гр, так называемые модуляторы Р-гр. Эти вещества могут или ингибировать транспортную функцию Р-гр (ингибиторы), или усиливать ее (сенситизаторы). Как и субстраты, модуляторы Р-гр структурно разнообразны.

Модуляторы могут ингибировать транспортную функцию P-gr несколькими способами и способ их действия на молекулярном уровне не всегда понятен. Некоторые из них сами транспортируются, например, циклоспорин А и, следовательно, работают как конкурирующие субстраты, в то время как другие (например, LY335979), связываются с P-gr в кармане связывания в течение продолжительного времени и не транспортируются. Некоторые модуляторы взаимодействуют с NBD (например, стероиды и дисульфиды) и препятствуют гидролизу АТФ (Sharom, 2011). Некоторые детергенты, такие как Triton X-100 и Tween 80, могут выступать в качестве ингибиторов P-gr, вероятно, за счет модификации липидного бислоя (Li-Blatter et al., 2009).

2.1.2 Локализация P-gr в нормальных тканях и его физиологическая роль

На сегодняшний день известно, что P-gr экспрессируется в широком спектре нормальных тканей с экскреторной (тонкий и толстый кишечник, печень, почки) и барьерной функцией (гематоэнцефалический барьер, гематотестикулярный барьер, плацента), где участвует в выполнении физиологических функций организма (Staud et al., 2010). Белок расположен преимущественно на плазматической мембране клеток (Fu, 2013). Исследование мышей с дефицитом P-gr показало, что этот транспортер ограничивает поглощение перорально вводимых лекарств, способствуя выведению лекарств в желчь, мочу и фекалии, и защищает различные органы от потенциально токсичных ксенобиотиков (Fromm, 2004).

P-gr также экспрессируется в различных типах клеток легких и бронхов. Методом иммуногистохимического окрашивания была показана локализация белка 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).

В работе Scheffer с соавторами (2002) была показана локализация P-gr как на апикальной, так и на базальной поверхности эпителия бронхов и бронхиол, в серозных и, в меньшей степени, слизистых клетках желез, а также в альвеолярных макрофагах (Scheffer et al., 2002). Однако интенсивность окрашивания в альвеолярных макрофагах не была одинакова для всех образцов тканей легкого. Как указывают авторы статьи, это может быть обусловлено различным активационным состоянием макрофагов, связанным с выраженностью воспалительной реакции, так как образцы были получены от пациентов с раком легких.

В работе Campbell с соавторами (2003) методом иммуногистохимического окрашивания показана локализация P-gr на апикальной поверхности альвеолоцитов 1 типа

и в реснитчатом эпителии бронхов человека (Campbell et al., 2003) (рис.5).

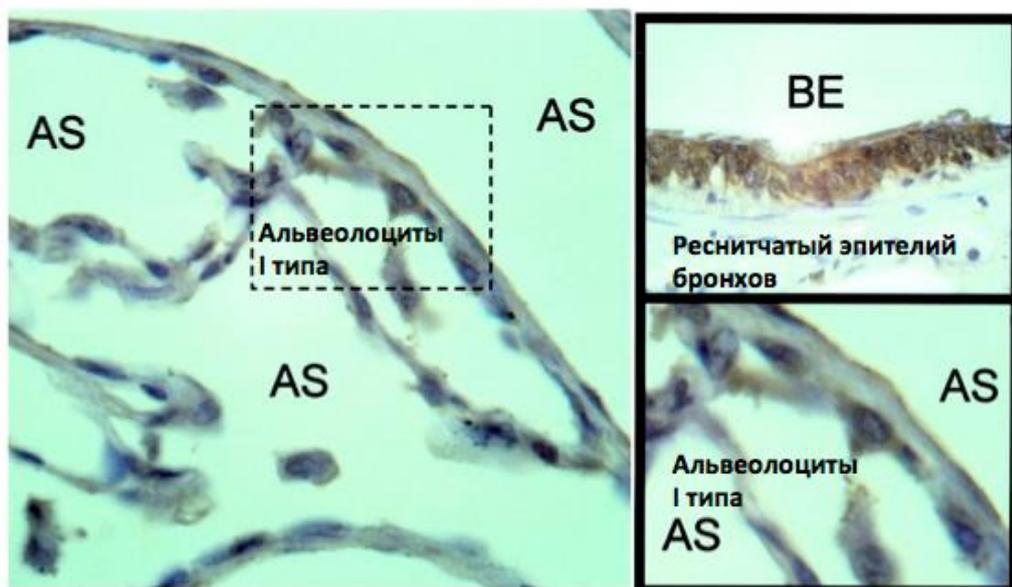


Рис. 5. Иммуногистохимическое окрашивание на Р-гр в нормальной легочной ткани человека (рисунок сделан на основе Campbell et al, 2003).

Апикальные мембраны альвеолоцитов I типа маркированы антителами к Р-гр. Также маркирование наблюдается в реснитчатых клетках бронхиального эпителия. AS – альвеолярное пространство, BE – бронхиальный эпителий. Увеличение $\times 67$ и $\times 100$

Также функционально активный Р-гр был обнаружен в альвеолоцитах I типа, в то время как в альвеолоцитах II типа активность белка была обнаружена в первичной культуре только на 8 день (Endter et al., 2007). В другой работе Р-гр был обнаружен не только в альвеолярных макрофагах, но также и в клетках альвеолярного эпителия, которые были положительными по маркеру TTF1 (тиреоидный фактор транскрипции 1), характерного для альвеолоцитов II (рис. 6) (Berg et al., 2018).

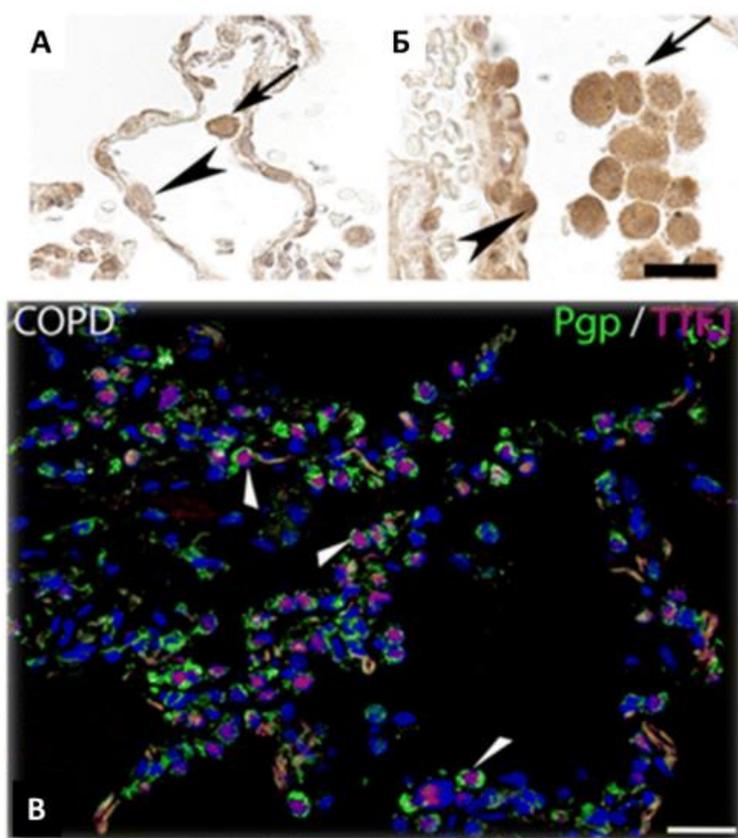


Рис. 6. Экспрессия белка P-гр в легких (рисунок сделан на основе Berg et al, 2018). Парафиновые срезы легочной ткани человека от здоровых людей (А), а также от бывших курильщиков с ХОБЛ (COPD) (Б, В) были иммуноокрашены антителами против P-гр. Экспрессия P-гр в альвеолярных макрофагах (стрелки) и альвеолярных эпителиальных клетках (наконечник стрелки) (А, Б). Экспрессия P-гр в альвеолярных клетках типа II (TTF1-положительные) после совместного окрашивания антителами к P-гр (зеленый) и к TTF1 (красный) показана стрелками (В).

Функциональное значение P-гр в тканях легких скорее всего заключается в транспорте различных ксенобиотиков и загрязнителей окружающей среды, поступающих с воздухом, из альвеолоцитов обратно в альвеолярное пространство (Campbell et al., 2003).

P-гр есть и в иммунных клетках, однако роль и функции P-гр в них исследованы недостаточно (van de Ven et al., 2009; Bossennec et al., 2018). Вероятнее всего P-гр отвечает за транспорт ксенобиотиков, а также, предположительно, участвует в транспорте цитокинов.

Наиболее высокие уровни экспрессии гена *ABCB1* свойственны NK-клеткам и Т-лимфоцитам, при этом экспрессия в CD8+ клетках выше, чем в CD4+ лимфоцитах. Уровень экспрессии *ABCB1* в В-лимфоцитах выше по сравнению с макрофагами, но ниже чем в Т-лимфоцитах и снижается при их активации и дифференцировке В-лимфоцитов в клетки памяти (Klimecki et al., 1994).

Для моноцитов не свойственна экспрессия гена *ABCB1*, но при дифференцировке моноцитов в макрофаги в них обнаруживается функционально-активный P-гр (van de Ven

et al., 2009). Кроме того, существуют различия в функциональной активности P-гp между 2 типами макрофагов: в макрофагах с фенотипом M2 (противовоспалительные) она выше по сравнению с макрофагами с провоспалительным фенотипом M1 (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 M1 на противовоспалительное состояние M2 (Marino et al., 2015; Cho et al., 2020).

2.1.3 Влияние P-гp на фармакокинетику лекарственных препаратов

В исследовании Schinkel с соавторами (1995) было показано, что отсутствие *Abcb1a* у нокаутных по данному гену мышей может оказывать значительное влияние на распределение в тканях таких лекарственных препаратов, как дексаметазон, дигоксин и циклоспорин А (Schinkel et al., 1995). Инъекция этих радиоактивно меченных лекарств у *Abcb1a* (-/-) мышей приводила к многократному (в 20–50 раз) повышению их уровней в мозге. Это исследование впервые продемонстрировало, что P-гp может быть основным определяющим фактором фармакокинетики определенных лекарственных препаратов.

В настоящее время исследователи все чаще признают, что транспорт лекарственных препаратов через человеческие, а также микобактериальные плазматические мембраны является одним из важных аспектов в проблеме лечения ТБ (te Brake et al., 2018b). При пероральном приеме ПТП, прежде чем достигнуть *M.tb*, они должны будут пройти через ряд клеточных мембран, где они будут взаимодействовать с P-гp, активно транспортирующим из цитоплазмы во внеклеточное пространство разнообразные лекарственные препараты (рис.7).

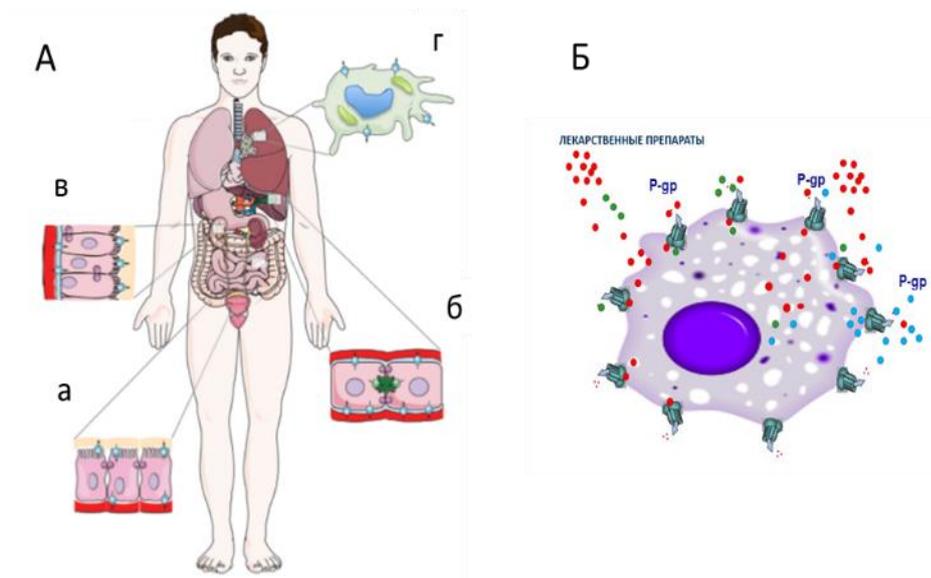


Рис. 7. Схема локализации P-гр в органах (А) и клетках (Б) человека и его вероятное влияние на фармакокинетику лекарственных препаратов.

А. Транспортёры, локализованные в кишечнике (а), влияют на абсорбцию, а в печени (б) и почках (в) – на экскрецию лекарственных препаратов. Транспортёры, локализованные на плазматической мембране инфицированных макрофагов (г), определяют локальные концентрации антибиотиков внутри клетки (рисунок сделан на основе te Brake et al, 2018). Б. Локализация P-гр на плазматической мембране в клетках человека.

Так как RIF – субстрат P-гр (Fardel et al., 1995), предполагается, что функциональная активность транспортера будет способствовать снижению внутриклеточных концентраций данного антибиотика. В работе Hartkoorn с соавторами было показано, что при ингибировании функциональной активности P-гр требовались значительно меньшие концентрации RIF и этамбутола для внутриклеточного уничтожения *M. tb* (Hartkoorn et al., 2007). Таким образом, ряд исследователей выдвинули предположение, что использование фармакологических ингибиторов P-гр совместно с антибиотиками может рассматриваться в качестве перспективной стратегии повышения эффективности терапии при ТБ. Действительно, использование фармакологического ингибитора P-гр VER совместно с RIF способствовало усилению бактерицидных эффектов антибиотика, в том числе и в отношении устойчивых к RIF штаммов *M.tb* (Gupta et al., 2013; Demitto et al., 2015). Также VER усиливал бактерицидный эффект BDQ (Adams et al., 2014; Gupta et al., 2015; Xu et al., 2018; Viljoen et al., 2019), хотя на сегодняшний день нет исследований, в которых бы было определено, что BDQ является субстратом для P-гр или оказывает влияние на его функциональную активность.

Хотя необходимо учитывать, что ингибиторы P-гр могут блокировать активность бактериальных АТФ-связывающих белков-транспортеров и тем самым снижать жизнеспособность возбудителя под воздействием ПТП (Chen et al., 2018). Кроме того, VER

может активировать аутофагию в макрофагах, что также может способствовать увеличению бактерицидных свойств клеток (Abate et al., 2016). Для ответа на вопрос, обусловлено ли усиление бактерицидных свойств антибиотиков снижением функциональной активности P-gr или эффектами самих фармакологических ингибиторов на другие мишени в клетках или возбудителе, необходимо проведение экспериментов на клеточных линиях и животных с нокадауном или нокаутом гена *ABCB1*.

2.1.4 Регуляция экспрессии гена белка P-gr

Множество транскрипционных факторов были идентифицированы в промоторной области гена *ABCB1*. Такие транскрипционные факторы, как AP-1 и NF-kB, связываются непосредственно с промоторной областью гена *ABCB1* (Chen et al., 2014).

Показано, что ядерная транслокация транскрипционного фактора AP-1 индуцирует экспрессию *ABCB1* в клеточной линии SGC-7901, резистентной к винкристину (рак желудка человека) и в резистентных к винбластину Caco-2 (колоректальная аденокарцинома человека). Но в то же время экспрессия AP-1 подавляет транскрипцию *ABCB1* в таких клеточных линиях эпителия, как H460 (крупноклеточных рак легкого), SKOV3 (аденокарцинома яичника), A498 (аденокарцинома почки) (Chen et al., 2014).

Также было показано, что инактивация NF-kB в резистентных к доксорубину клетках рака молочной железы через HSP1 и HSP27 (белки теплового шока) подавляла экспрессию *ABCB1* (Kanagasabai et al., 2011). Таким образом, NF-kB является одним из важных путей в транскрипционной регуляции гена белка P-gr. Сигнальный путь NF-kB активируется и при воспалении. Активация или подавление экспрессии *ABCB1* через данный сигнальный путь делает P-gr важным участником воспалительного процесса.

Также в ряде исследований было показано, что витамин D повышает экспрессию и транспортную активность P-gr в изолированных капиллярах мозга крысы (Durk et al., 2012). Ответный элемент (специфическая область ДНК, с которой связывается транскрипционный фактор) для ядерного рецептора витамина D (VDR) был идентифицирован в промоторе гена *ABCB1*. Было показано, что VDR регулирует экспрессию гена белка P-gr в клетках Caco-2, в клетках печени и почках крысы, в почках и мозге мыши *in vivo*. Стоит также указать, что витамин D используется для дифференцировки моноцитов в макрофагальном направлении (Schwende et al., 1996). С другой стороны, есть ряд исследований, который показывает важную роль витамина D в профилактике и лечении туберкулеза (Kearns and Tangpricha, 2014). VDR конститутивно экспрессируется в макрофагах. Считается, что активация VDR в макрофагах усиливает фагоцитоз и выработку антимикробных пептидов (Veldman et al., 2000).

Также в качестве регуляторов транскрипционной активности *ABCB1*

идентифицированы 2 ядерных рецептора CAR (конститутивный андростан-рецептор) и PXR (прегнановый X рецептор) (Chen et al., 2012). CAR и PXR являются зависимыми от лиганда факторами транскрипции. Лиганд, связываясь с рецептором в цитоплазме, активирует его и способствует транслокации в ядро. Для CAR и PXR был идентифицирован DR4 мотив, который расположен на расстоянии 7800 п.н. от сайта начала транскрипции гена *ABCB1* (Geick et al., 2001). Так как RIF является лигандом для PXR и CAR, то это позволяет предположить, что он может регулировать экспрессию и функциональную активность P-гр. Действительно, увеличение экспрессии и функциональной активности P-гр под воздействием RIF было обнаружено в эпителиальных клетках, ответственных за абсорбцию и выведение антибиотика: гепатоцитах, энтероцитах, эпителии почечных канальцев (Geick et al., 2001; Magnarin et al., 2004; Kim et al., 2015).

Один из возможных механизмов индукции P-гр RIF – это активация PXR. RIF связывается с PXR, который после этого транслоцируется в ядро, связывается с промотором гена *ABCB1* и повышает его экспрессию. В работе Geick с соавторами (2001) подтвердили индукцию *ABCB1* в энтероцитах, вызванную RIF, именно за счет транслокации PXR в ядро (Geick et al., 2001). В этой работе также была показана зависимость экспрессии *ABCB1* от длительности воздействия и концентрации RIF. Чем выше концентрация RIF, и чем более длительному воздействию подвергаются клетки, тем выше уровень экспрессии гена *ABCB1*.

В работе Kim с соавторами (2015) в качестве одной из клеточных моделей также была выбрана клеточная линия LS174T (рак толстой кишки человека) (Kim et al., 2015). Авторами работы был предложен иной механизм индукции *ABCB1* RIF через PXR: RIF активирует казеин-киназу 2, которая в свою очередь приводит к фосфорилированию HSP80 β , а фосфорилирование белка теплового шока вызывает стабилизацию PXR, который перемещается в ядро и запускает транскрипцию гена *ABCB1* (рис.8).

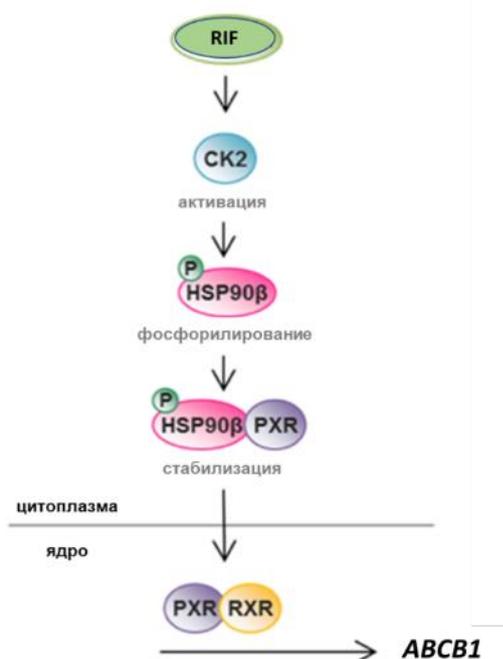


Рис. 8. Механизм индукции гена Р-гр рифампицином через активацию казеин-киназы 2 (СК2) с последующим фосфорилированием белка теплового шока HSP90 β , что в свою очередь приводит к стабилизации ядерного прегнанового рецептора (PXR) и его транслокации в ядро, после чего активируется транскрипция гена белка Р-гр (рисунок сделан на основе схемы Kim et al, 2015).

Большое количество исследований о возможности индукции *ABCB1* под воздействием RIF были сделаны на эпителиальных клетках, которые характеризуются высоким базальным уровнем экспрессии как *ABCB1*, так и *PXR*. Данные о возможности индуцировать *ABCB1* RIF в иммунных клетках не столь однозначны. В работе Owen с соавторами (2006) была показана индукция *ABCB1* в мононуклеарах периферической крови RIF в концентрации 25 мкМ (Owen et al., 2006). Уровень Р-гр на мембране клеток оценивался методом проточной цитометрии (с использованием моноклональных антител UIC2), а уровень экспрессии гена – ПЦР в реальном времени. Было показано, что уровень мРНК возрастает в 3,7 раз после 6-часовой инкубации с RIF, а уровень белка 7,6 раз после 72-часовой инкубации относительно контроля. В отличие от предыдущей работы, в исследовании Мансеау с соавторами (2010) было показано, что RIF не влияет на экспрессию гена и уровень белка Р-гр на плазматической мембране ни в мононуклеарах периферической крови человека, ни в клеточной линии CCRF-CEM (лимфобластная лимфома) (Мансеау et al., 2010). Так же, как и в работе Owen, максимальное время инкубации с RIF составляло 72 часа, а концентрация антибиотика была немного ниже – 20 мкМ. В качестве сравнения в данной работе была выбрана линия LS174Т (аденокарцинома толстой кишки человека), где было обнаружено значимое увеличение как мРНК гена *ABCB1* (в 5 раз), так и увеличение функциональной активности Р-гр на 40%. Отсутствие

индукции *ABCB1* как в периферических мононуклеарах, так и в клеточной линии лимфобластной лимфомы авторы объясняют низким уровнем экспрессии PXR, который определяли методом ПЦР в реальном времени. Эти данные согласуются с работой Vesquemont с соавторами (2000), в которой было показано отсутствие усиления функциональной активности P-гр и экспрессии его гена в мононуклеарах периферической крови 13 добровольцев, которые принимали 600 мг RIF ежедневно в течение 4 суток (Vesquemont et al., 2000). В работе Asghar с соавторами (2002) были получены противоречивые данные: у 42% из 50 здоровых добровольцев, которые принимали RIF в течение 7 дней в суточной дозе 600 мг, было обнаружено снижение уровня экспрессии *ABCB1* в периферических мононуклеарах, в то же время как у 58% было зарегистрировано увеличение экспрессии данного гена (Asghar et al., 2002). Таким образом, данные о возможности RIF индуцировать экспрессию *ABCB1* в иммунных клетках неоднозначны.

2.1.5 P-гр при туберкулезном воспалении

На уровень экспрессии гена белка P-гр могут оказывать влияния различные факторы, актуальные при туберкулезном воспалении. Такие провоспалительные цитокины, как IL1b, IL6, IL12, INFg, TNF α и TGFb играют важную роль в патогенезе ТБ у людей (Silva Miranda et al., 2012). В ряде экспериментальных работ было показано, что именно эти цитокины могут оказывать влияние на экспрессию гена *ABCB1* в иммунных клетках.

В работе Puddu с соавторами (1999) было показано, что INFg увеличивает уровень экспрессии *ABCB1* в макрофагах (Puddu et al., 1999). В работе Liptrott с соавторами (2009) было продемонстрировано, что в мононуклеарах периферической крови такие цитокины как IL2, IL6, IL12, TGFb, TNFa и INFg повышают экспрессию *ABCB1* (Liptrott et al., 2009).

На клеточных линиях CCRF-CEM (острая лимфобластная лейкемия) и THP-1 (острый моноцитарный лейкоз) было продемонстрировано, что уровень экспрессии *ABCB1* увеличивается под воздействием как ЛПС, так и таких цитокинов как TNFa, IL1b, IL6 и IL17 (Liu et al., 2015). При этом в лимфоцитах TNFa и IL17 оказывали наиболее сильные стимулирующие эффекты и увеличивали 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 в 15,2 раза; TNFa увеличивал экспрессию *ABCB1* в 7,1 раз.

Таким образом, провоспалительные цитокины могут оказывать влияние на уровень экспрессии *ABCB1* в иммунных клетках.

Имеются данные, что патогенные внутриклеточные микроорганизмы могут влиять на экспрессию P-гр как в эпителиальных, так и в иммунных клетках. Так, в работе Gollapudi с соавторами (1994) рассматривалось влияние *M.tb* на изменение уровня экспрессии *ABCB1*

в клеточной линии промоноцитов U1 (субклон линии U937, хронически инфицированных вирусом ВИЧ) (Gollapudi et al., 1994). Было показано, что макрофаги с персистирующим ВИЧ повышают экспрессию гена при заражении *M.tb*. Для исходной клеточной линии моноцитов U937 без ВИЧ достоверных различий в уровне экспрессии показано не было. В другой работе была показана индукция транскрипции гена *ABCB1* в моноцитах THP-1 при их заражении бактерией *Listeria monocytogenes* (Sigal et al., 2015). В работе Yagdiran с соавторами (2016) исследовали влияние *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* на экспрессию *ABCB1*, а также генов других МЛЮ транспортеров *MRP1* и *BCRP* в эпителиальных клетках HC11 (эпителий молочных желез) (Yagdiran et al., 2016). Было обнаружено статистически значимое повышение уровня экспрессии только гена *ABCB1*, для *BCRP* и *MRP1* такого эффекта обнаружено не было. Стоит также отметить, что авторы работы обнаружили сильную корреляцию между экспрессией *ABCB1* и гена цитокина IL6 в ответ на инфицирование. Также было показано, что экспрессия *ABCB1* увеличивается в макрофагах человека, полученных из моноцитов периферической крови, при их инфицировании патогенными штаммами *M.tb*, но только на поздних стадиях инфекции (Wu et al, 2019).

На модели экспериментального ТБ воспаления было показано, что уровень экспрессии *Abcb1a/b* в легких мышей возрастает в 3–3,5 раза по сравнению с контролем: экспрессия гена *Abcb1a* возрастала в 2,8 раза на 21-й день после инфицирования и в 3,5 раза на 90-й день эксперимента, а экспрессия гена *Abcb1b* повышалась к 45 дню эксперимента в 2 раза и оставалась на этом же уровне, несмотря на дальнейшее прогрессирование воспаления (Ерохина и др, 2019).

На экспрессию P-гр может влиять гипоксия (Якушева и др, 2016). В исследовании Belton с соавторами (2016) была выявлена выраженная гипоксия в легких пациентов, пораженных ТБ (Belton et al., 2016). На культуре клеток LS513 (карцинома толстой кишки человека) было показано, что гипоксия индуцирует экспрессию *HIF1a* и *ABCB1*, а ингибирование HIF1a в свою очередь приводило к снижению экспрессии *ABCB1* (Ding et al., 2010). На клеточной линии немелкоклеточной карциномы легкого человека было продемонстрировано, что ингибирование HIF1a приводило к снижению уровня экспрессии гена *ABCB1* и уровня P-гр в клетках (Chen et al., 2016).

Таким образом, на экспрессию и функциональную активность P-гр могут оказывать влияние различные факторы, актуальные при ТБ воспалении.

2.1.6 P-гр как иммунорегулятор

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

Так, мыши с тройным нокаутом по генам *Mrp1/Abcb1a/ Abcb1b* демонстрировали сниженный воспалительный ответ на воздействие сигаретным дымом. Кроме снижения уровня провоспалительных цитокинов, в легких мышей с тройным нокаутом было заметно меньше воспалительных инфильтратов, и они различались клеточным составом. В инфильтратах мышей дикого типа была значительно больше макрофагов и В-лимфоцитов. Кроме того, содержание некоторых цитокинов и хемокинов в легких мышей было ниже, чем у мышей дикого типа, вне зависимости от воздействия сигаретного дыма (van der Deen et al., 2007).

В работе Коої с соавторами (2009) на модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита было показано, что мыши с двойным нокаутом по генам *Abcb1a* и *Abcb1b* демонстрировали снижение клинических признаков заболевания по сравнению с животными дикого типа как на острой, так и на прогрессирующей стадии. Наблюдаемые различия в клинических признаках были связаны как с более низким уровнем демиелинизации нейронов в головном мозге нокаутных мышей, так 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) фазе заболевания. Также *in vitro* было показано, что способность дендритных клеток, полученных от нокаутных мышей, к аллогенной пролиферации Т-лимфоцитов была ниже по сравнению с мышами дикого типа.

Ряд исследователей указывает на возможную роль Р-гр в транспорте различных цитокинов, таких как: TNF α , IL2, IL4, IL12, INF γ , так как ингибирование Р-гр уменьшало секрецию данных цитокинов из Т-лимфоцитов (Drach et al., 1996).

Также есть сведения, что Р-гр участвует в цитотоксической эффекторной функции как CD8⁺ Т-лимфоцитов (Gupta et al., 1992), так и НК-клеток (Klimecki et al., 1994). Эффекторные ответы НК-клеток человека были снижены в присутствии ингибиторов, блокирующих функции Р-гр. Хотя 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).

Р-гр может быть необходим для созревания и активации дендритных клеток. Ингибирование функциональной активности Р-гр венлафаксином препятствовало созреванию и активации дендритных клеток, что подтверждалось низкой экспрессией костимулирующих молекул (CD80, CD86, МНСI, МНСII) и снижением уровня цитокинов IL1 α , IL10 и IL12 в ответ на стимуляцию ЛПС (Lee et al., 2011). Кроме фенотипических изменений, ингибирование функциональной активности Р-гр влияло на функции

дендритных клеток, уменьшая их способность стимулировать аллогенную пролиферацию Т-клеток. Таким образом, многочисленные результаты исследований как *in vitro*, так и *in vivo* подтверждают иммуномодулирующую роль Р-гр.

2.2 Характеристика туберкулезного воспаления

Заражение *M.tb* происходит в подавляющем большинстве случаев аэрозольно, при вдыхании человеком капель, содержащих живые микобактерии туберкулеза (Churchyard et al., 2017). На вероятность заражения может влиять как продолжительность контакта с больным ТБ с активным бактериовыделением, так и статус иммунной системы инфицированного человека и наличие сопутствующих заболеваний (Mathema et al., 2017). Развитие ТБ протекает через разные стадии: от бессимптомной латентной инфекции до активных форм ТБ с различной степенью тяжести (Behr et al., 2019). В то время как большинство людей, инфицированных *M.tb*, имеют статус латентно-инфицированных, то есть не имеют клинических признаков болезни, у 5-10% развивается активная форма ТБ (Sia and Rengarajan, 2019).

ТБ в первую очередь считается легочным заболеванием, однако *M.tb* могут распространяться по всему телу, поражая различные органы и ткани. Под воздействием *M.tb* в паренхиме легких развивается специфическое воспаление. Формирование туберкулом (гранулем), представляющих собой агрегаты иммунных клеток, является отличительной чертой воспаления при ТБ (Silva Miranda et al., 2012). Классическая туберкулома представляет собой объемное образование диаметром более 12 мм. В центре туберкуломы располагается область казеозного некроза, отграниченного капсулой от зоны альвеол. Капсула туберкуломы 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). Сам процесс формирования туберкулом может находиться на разной стадии. Кроме туберкулом с некрозом в центре, в легких больных с активным ТБ также обнаруживаются туберкуломы без некротического центра, а также лимфоидные агрегаты (рис.9.) (Sawyer et al., 2023).

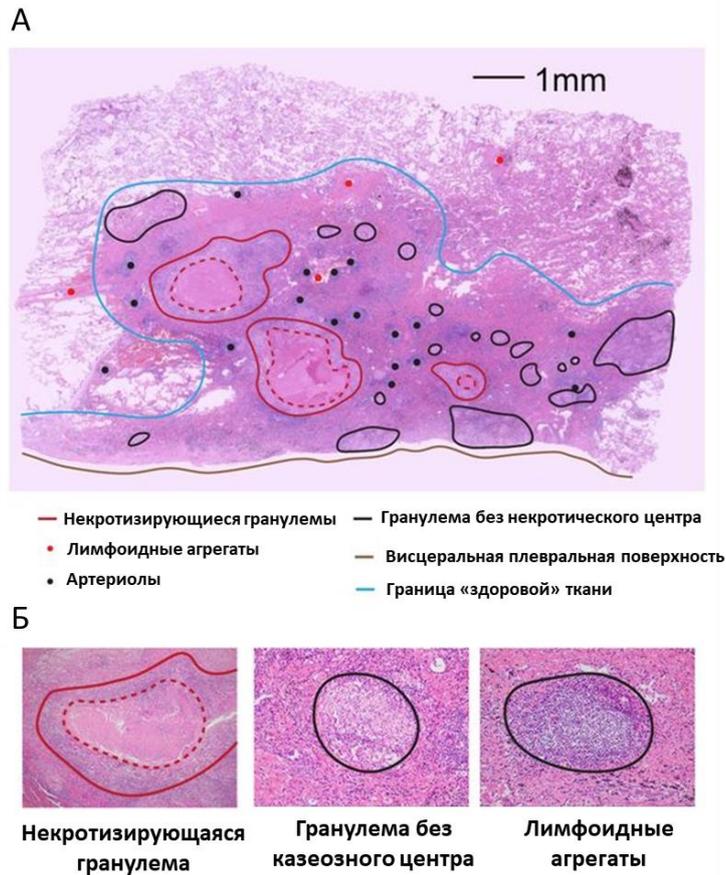


Рис. 9. Различные гистопатологические структуры в легких больных с активным ТБ (рисунок сделан на основе Sawyer et al, 2023). (А) Срез легочной ткани туберкулеза, окрашенный гематоксилином и эозином, с указанием различных гистологических и гистопатологических особенностей. (Б) Увеличенные примеры изображений различных типов поражений, указанных в (А).

Фенотипирование иммунных клеток в легких больных ТБ, проведенное Sawyer с соавторами (2023) выявило, что иммунные инфильтраты в очагах инфекции были преимущественно обусловлены накоплением клеток, экспрессирующих маркеры В-лимфоцитов (CD20), а также маркеры Т-лимфоцитов: CD4 и CD8. В-клетки и CD4 Т-клетки были более многочисленны в гранулемах без некротического центра, в то время как CD68 макрофаги были многочисленны в некротизирующихся гранулемах. CD8 Т-клетки распределялись одинаково равномерно между некротизирующими и ненекротизирующими гранулемами (Sawyer et al., 2023).

В другом исследовании, опубликованном McCaffrey с соавторами (2022), также было показано, что в составе гранул преобладали Т-клетки и миелоидные клетки, при этом соотношение миелоидных клеток к лимфоидным составляло в среднем 2,4 (McCaffrey et al., 2022). Миелоидные клетки состояли из различных субпопуляций макрофагов, дендритных клеток и моноцитов с различной степенью экспрессии маркеров CD11c, CD11b, CD209,

CD68, CD14, CD16 и CD206. В то время как лимфоидный состав был представлен преимущественно CD4+ лимфоцитами (42,8%), CD8+ лимфоцитами (30,6%), а также В-лимфоцитами (23,9%) (рис. 10.).

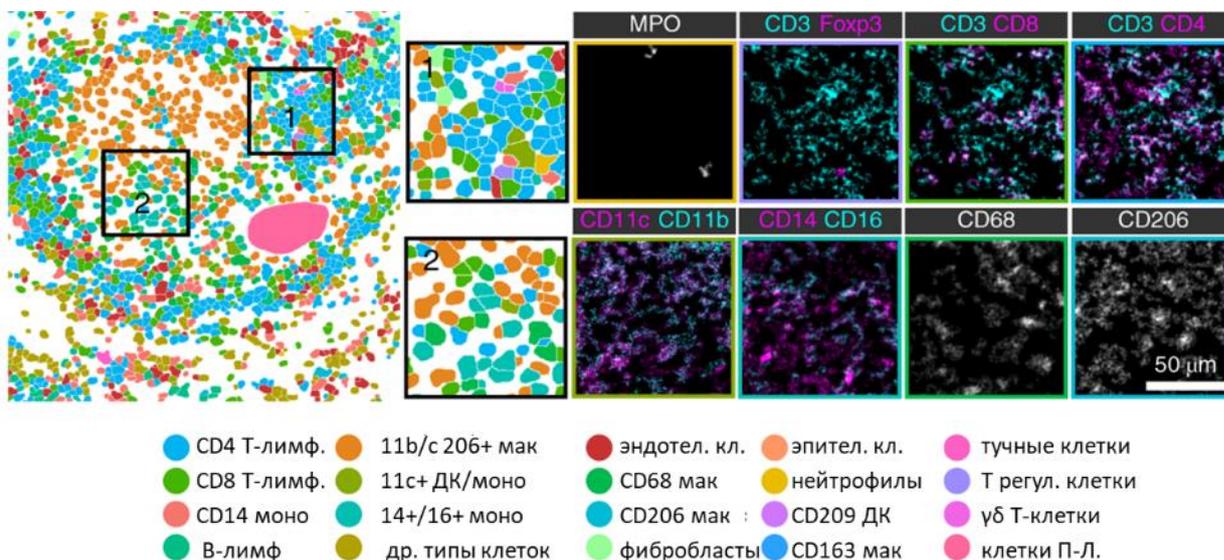


Рис. 10. Различные типы иммунных клеток в гранулемах легких больных активным туберкулезом (рисунок сделан на основе McCaffrey et al, 2022). лимф – лимфоциты. мак – макрофаги, мон – моноциты, кл – клетки, клетки П-Л клетки – клетки Пирогова-Лангханса.

Различные цитокины, секретируемые преимущественно иммунными клетками, являются основными регуляторами воспаления при ТБ. При этом, при всей сложности ТБ и его форм, сложно однозначно сказать, какие цитокины играют защитную роль, способствуя установлению контроля над инфекцией, а какие патологическую, способствуя прогрессированию заболевания или повреждению тканей (Domingo-Gonzalez et al., 2016). Наличие динамического баланса между про- и противовоспалительными цитокинами необходимо для достижения правильного формирования гранулемы и контроля инфекции *M.tb* (Marino et al., 2015). В таблице ниже приведены сведения о некоторых ключевых цитокинах и описана как их положительная, так и отрицательная роль при ТБ (таблица 1):

Таблица 1. Роль основных цитокинов в регуляции туберкулезного воспаления

Цитокин	Основной источник	Роль при ТБ
TNFα	M1 макрофаги	Положительная роль: инициирует и координирует продукцию множества провоспалительных цитокинов при ТБ, необходим для формирования гранулемы (Saunders et al., 2005), низкий уровень может способствовать реактивации латентных форм ТБ (Robert and Miossec, 2021). Отрицательная роль: способствует повреждению тканей (van Loo and Bertrand, 2023)

INFg	CD4+ T лимфоциты (Th1), CD8+ T лимфоциты, NK клетки	Положительная роль: также как TNF α , необходим для формирования гранулемы (Smith et al., 1997), дефицит продукции связан с повышенным риском развития активных форм ТБ, активирует фагоциты, ограничивает моноцитарную и нейтрофильную инфильтрацию в зоне воспаления (Kim et al., 2011)
TGFb	Миофибробласты, эпителиодные клетки, макрофаги	Положительная роль: необходим для заживления тканей в постинфекционный период, необходим для формирования гранулемы (Cronan et al., 2021a) Отрицательная роль: TGFb может подавлять продукцию IFNg (Gern et al., 2021; Othieno et al., 1999); высокий уровень секреции TGFb может вызывать чрезмерное образование рубцовой ткани и фиброз (DiFazio et al., 2016).
IL1b	Дендритные клетки, макрофаги	Положительная роль: активирует фагоцитоз, необходим для установления контроля над патогеном, сдерживает репликацию бактерий (Jayaraman et al., 2013) Отрицательная роль: может способствовать повреждению тканей на поздних этапах инфекции, способствует нейтрофильной инфильтрации паренхимы легких (Silvério et al., 2021)
IL10	T-регуляторные лимфоциты, M2 макрофаги	Положительная роль: необходим для ремоделирования тканей и заживления в постинфекционный период (Domingo-Gonzalez et al., 2016) Отрицательная роль: может блокировать созревание фагосом в макрофагах, презентацию антигена в дендритных клетках, ингибирует индукцию Th1 ответа лимфоцитами, ингибирует INFg-опосредованную активацию макрофагов (Oswald et al., 1992)
IL6	Многие типы клеток, как миелоидные, так и лимфоидные	Положительная роль: обеспечивает ранний иммунитет против <i>M.tb</i> , критически важен при высокой бактериальной нагрузке (Ladel et al., 1997) Отрицательная роль: способствует повреждению тканей, вызывает «цитокиновый шторм» при ТБ воспалении (Boni et al., 2022)

Таким образом, за последние годы значительно расширились не только представления о клеточном составе туберкулом, но и о спектре и роли цитокинов, продуцируемых этими клетками. Развитие этой области знаний способствовало интенсивному формированию нового направления в терапии ТБ – терапии, направленной на пациента или «терапии, направленной на хозяина» (HDR, от англ. Host-directed therapy).

2.3 «Терапия, направленная на хозяина» и иммуномодулирующие свойства противотуберкулезных препаратов

ТБ, особенно МЛУ-ТБ, по-прежнему остается угрозой для здравоохранения во всем мире, несмотря на большое количество проводимых исследований, более глубокое понимание взаимодействия патогена с организмом «хозяина» и открытие новых мишеней

для терапевтического воздействия. Совсем недавно были предложены новые стратегии терапии ТБ с участием иммунной системы «хозяина», которые, как полагают, могут повысить эффективность существующих антибиотиков (Young et al., 2020). Однако отсутствие всестороннего понимания эффектов ПТП, в том числе препаратов первого ряда и недавно введенных в клиническую практику антибиотиков, на иммунные клетки ограничивает разработку эффективных терапевтических стратегий для борьбы с *M.tb* (Park et al., 2021).

Для терапии лекарственно-чувствительного ТБ используют изониазид, RIF, пипразинамид и этамбутол в течение 2 месяцев, а затем изониазид и RIF последующие 4 месяца. Эта схема была разработана и реализована четыре десятилетия назад и с тех пор не изменилась (Dartois and Rubin, 2022). Таким образом, несмотря на то, что RIF был открыт в 1964 году, он до сих пор остается одним из важнейших препаратов для лечения ТБ, который ценится за его бактерицидную активность и способность сокращать сроки лечения (Grobbelaar et al., 2019). Он действует путем ингибирования синтеза бактериальных белков: связываясь с ДНК-зависимой РНК-полимеразой бактерий, он тем самым предотвращает транскрипцию РНК и последующий синтез белка.

BDQ является первым препаратом с новым механизмом действия на *M.tb*, одобренным для лечения ТБ за последние 50 лет (Worley and Estrada, 2014). Он убивает как активно реплицирующиеся, так и латентные микобактерии, поскольку воздействует на АТФ-синтазу, ингибируя выработку энергии микобактериальной клеткой и оставляя их в состоянии энергетического голодания. Но, несмотря на то, что он используется в клинике только 10 лет, уже выявлены клинические изоляты *M.tb* с устойчивостью к данному антибиотику, в том числе и в России (Zimenkov et al., 2017).

Так как RIF уже очень давно используется в терапии ТБ, его клеточные мишени в достаточной степени изучены, при этом поиск клеточных мишеней для BDQ в организме человека находится только в самом начале пути.

2.3.1 Иммуномодулирующие эффекты рифампицина

То, что RIF обладает противовоспалительными свойствами, было показано еще в 70-х годах (Păunescu, 1970; Litwin et al., 1974). Первоначально эти свойства связывали с его способностью активировать глюкокортикостероидные рецепторы и сравнивали эффект RIF с кортикостероидами. Дальнейшие исследования опровергли влияние RIF на рецепторы к глюкокортикоидам. Так, в клеточной линии A549 (аденокарцинома легких человека) не было обнаружено ядерной транслокации глюкокортикоидного рецептора под воздействием RIF (Jaffuel et al., 1999).

То, что RIF не вызывает активацию глюкокортикоидного рецептора, было показано и

на нейрональных клетках человека SK-N-MC (нейробластома человека), и на мышинных клетках гиппокампа (HT22) (Herr et al., 2000). В то же время в работе Vi с соавторами (2011) было показано, что RIF ингибировал ЛПС-стимулированную экспрессию индуцируемой оксидом азота синтазы (iNOS), TNF α и IL1b, а также снижал уровень оксида азота (NO) и простагландина E2 в микроглиальных клетках BV2. Кроме того, антибиотик подавлял активацию NF-kB путем блокирования деградации ингибирующей субъединицы NF-kB (Vi et al., 2011).

В работе Ziglam с соавторами (2004) исследовали влияние RIF на уровень секреции цитокинов в стимулированных ЛПС периферических мононуклеарах человека (Ziglam et al., 2004). Было обнаружено, что RIF вызывает достоверное снижение выработки TNF α и IL1b, в то время как секреция IL6 и IL10 была достоверно выше по сравнению с контролем. На основании полученных результатов авторы сделали вывод о том, что RIF может модифицировать острую стадию воспаления, нарушая цитокиновый каскад в мононуклеарах периферической крови.

В целом, согласно различным исследованиями можно заключить, что RIF вызывает снижение уровней TNF α и iNOS и повышение уровней IL10 в периферических мононуклеарах и макрофагах.

Если RIF снижает уровень iNOS в периферических мононуклеарах, то на эпителиальные клетки антибиотик оказывает противоположный эффект. На клеточной линии A549 было показано, что RIF увеличивает экспрессию iNOS и продукцию NO (Yuhas et al., 2009). Инкубация клеток с цитокиновой смесью (TNF α , IL1b и INF γ) индуцировала экспрессию iNOS, а добавление RIF в терапевтической концентрации 10 мкг/мл увеличивало уровень экспрессии iNOS в 1,9 раз. Также при обработке RIF наблюдалась повышенная деградация ингибирующей субъединицы NF-kB и снижение уровня экспрессии гамма рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR) на 15% в ответ на стимуляцию цитокинов и еще на 40% после добавления RIF. Таким образом, на основании полученных результатов авторы делают вывод, что увеличение уровней активации NF-kB и индуцирование NO способствует терапевтическим эффектам RIF. Аналогичные результаты были получены теми же авторами ранее на гепатоцитах HepG2 (Yuhas et al., 2011). RIF вызывал увеличение продукции NO и повышение уровня IL8. Кроме того, RIF в концентрации 10 мкг/мл сам по себе вызывал повышение уровня IL8 в гепатоцитах, без дополнительной стимуляции смесью таких цитокинов, как TNF α , IL1b и INF γ .

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. Есть ряд исследований, который демонстрируют перекрестные помехи между основным медиатором воспаления NF-κB и PXR: активация NF-κB ингибирует функцию PXR, в то время как ингибирование NF-κB увеличивает активность PXR.

Так, на клеточной линии HepG2 было показано, что обработка клеток TNFα приводила к увеличению активности репортера NF-κB, но в то же время активность репортерного гена существенно подавлялась RIF в присутствии экспрессирующего вектора PXR. Причем RIF оказывал дозозависимый эффект. Обработка клеток RIF в отсутствие экспрессирующего вектора PXR не оказывала влияние на активность репортера NF-κB (Zhou et al., 2006).

На той же клеточной модели HepG2 было показано, что несмотря на то, что RIF увеличивал активность репортера PXR, добавление TNFα как индуктора NF-κB приводила к снижению его активности. Таким образом, между NF-κB и PXR существуют перекрестные помехи (Zhou et al., 2006). Стоит отметить, что в печени и кишечнике уровень экспрессии PXR существенно выше по сравнению с тканями легких или клетками крови. Возможно, в них PXR будет оказывать менее выраженный ингибирующий эффект на NF-κB и иммуносупрессивные эффекты.

На сегодняшний день существует несколько гипотез, которые описывают возможные механизмы ингибирования NF-κB. Один из возможных механизмов, который бы это объяснял, связан с возможным ингибированием пути NF-κB через PXR, активированным RIF в результате прямого воздействия на NF-κB (Li et al., 2017) (рис.11), или через увеличение экспрессии ингибитора IκB (Mohandas and Vairappan, 2017) (рис.12).

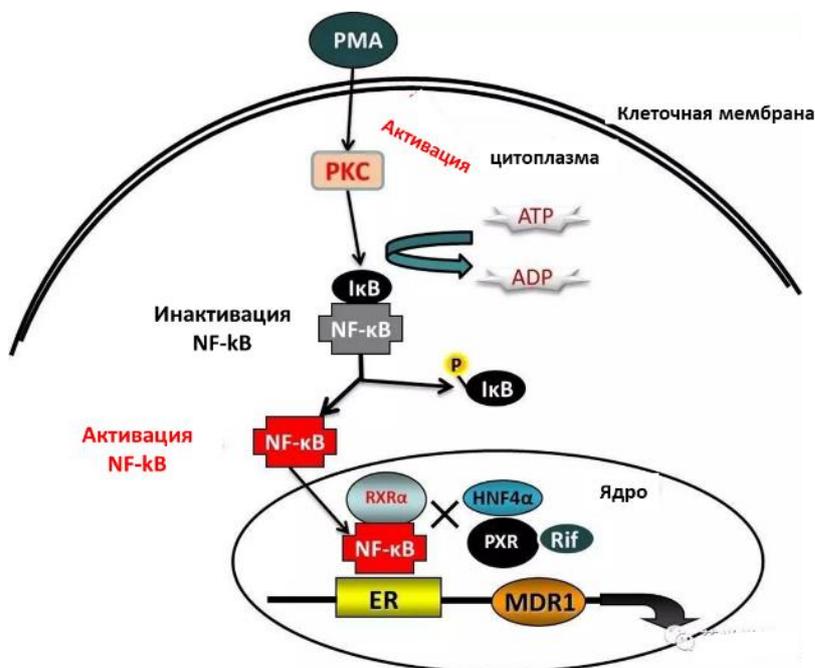


Рис. 11. Ингибирование NF-κB через активацию PXR рифампицином (рисунок сделан на основе Li et al., 2017).

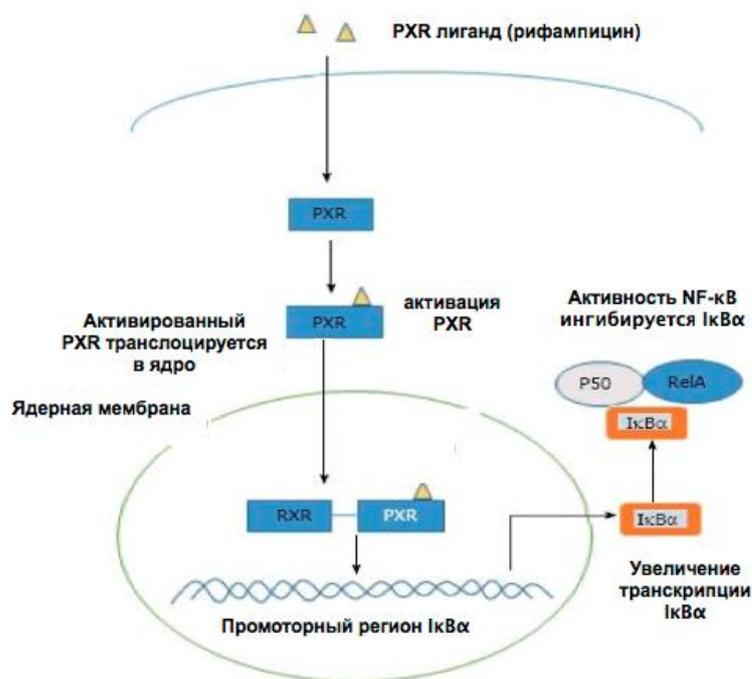


Рис. 12. Модель ингибирования пути NF-κB PXR через транскрипцию IκBα (рисунок сделан на основе Mohandas and Vaigappan, 2017).

M.tb взаимодействуют с макрофагами и эпителиальными клетками в альвеолярном пространстве легких, где они поглощаются и реплицируются в обоих типах клеток (Danelishvili et al., 2003). Важным механизмом патогенеза *M.tb* является способность контролировать пути гибели данных клеток: 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).

Согласно исследованию Ерохиной с соавторами (2013) одной из клеточных мишеней RIF в эпителиальных клетках являются митохондрии (Ерохина и др., 2013). Высокие концентрации препарата (IC₅₀, 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 RIF в клетках печени мыши наблюдался 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 RIF и его способность ингибировать апоптоз. Так, на клеточной линии Jurkat (Т-лимфоциты) было показано, что RIF уменьшал экспрессию Bax и CD95L и повышал экспрессию Bcl-2, ингибируя индуцированный анти-CD95 апоптоз в данных клетках

(Yerramasetti et al., 2002). Авторы объясняли данный эффект через активацию RIF глюкокортикостероидных рецепторов, хотя уже в данной работе было высказано предположение, что эффект RIF может быть обусловлен воздействием на сигнальный путь NF- κ B.

На клеточной линии A549 было показано, что RIF снижает цитотоксический эффект *A. baumannii*, не обладая при этом бактерицидным эффектом в отношении данного внутриклеточного патогена (Smani et al., 2011). Цитопротекторное свойство RIF (снижение количества гибнущих клеток, в том числе путем апоптоза) авторы объяснили снижением окислительного стресса и сниженной секрецией таких провоспалительных цитокинов, как TNF α и IL6.

2.3.2 Иммуномодулирующие эффекты бедаквилина

BDQ (или TMC207, торговое название Sirturo[®]) является новым противотуберкулезным препаратом, принадлежащим к группе диарилхинолинов, ингибирующим активность микобактериальной АТФ-синтазы. Этот препарат является первым препаратом, одобренным для лечения МЛУ-ТБ в 2013 году, после одобрения RIF в 1971 году в США (Khoshnood et al., 2021).

В 2020 году была опубликована работа, посвященная изучению влияния BDQ на макрофаги человека, полученные из моноцитов периферической крови (Giraud-Gatineau et al., 2020). Масштабный анализ экспрессии генов под воздействием антибиотика показал, что в макрофагах активируются гены, связанные с биогенезом лизосом: биогенезом мембран фаголизосом, активностью гидролаз, а также с гомеостазом липидов. Для исключения возможных различий в профиле экспрессии генов между инфицированными и неинфицированными макрофагами, обусловленных разной бациллярной нагрузкой, авторы работы создали вирулентный штамм *M.tb*, устойчивый к BDQ. В инфицированных этим штаммом макрофагах профили экспрессии генов под воздействием BDQ 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 (рис.13).

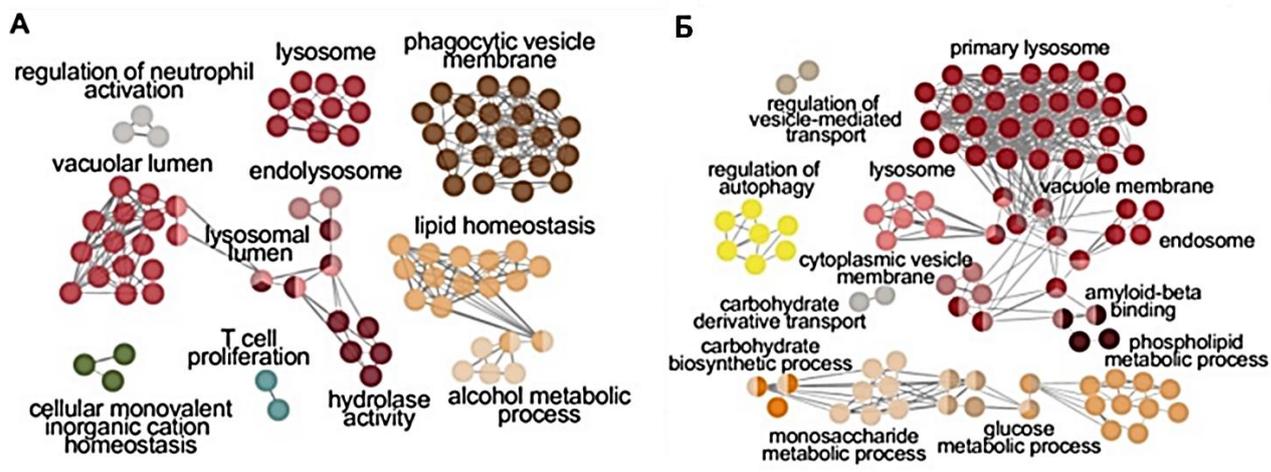


Рис. 13. Бедаквилин (BDQ) модулирует реакцию макрофагов человека. А – анализ обогащения онтологии генов, экспрессия которых повышается под воздействием бедаквилина. Б – анализ обогащения онтологии генов, экспрессия которых повышается при воздействии бедаквилина в клетках, инфицированных резистентным к антибиотику штаммом (рисунок сделан на основе Giraud-Gatineau et al, 2020)

Авторы делают заключение, что BDQ вызывает значительное метаболическое перепрограммирование как инфицированных, так и покоящихся макрофагов. Таким образом, «активация лизосомального компартмента под воздействием BDQ 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 BDQ на антимикробную активность и секрецию цитокинов в THP-1 макрофагах, инфицированных как устойчивым к BDQ, так и чувствительным штаммом *M.tb* (Lyu et al., 2022). Было показано, что BDQ оказывает иммуномодулирующее действие на макрофаги, индуцируя высокий уровень секреции провоспалительных цитокинов IL12 и TNF α , 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 α , напротив, активируют IFN γ , который способствует активации фагоцитоза в макрофагах (Khan et al., 2016), то иммуномодулирующий эффект BDQ может способствовать более эффективной элиминации внутриклеточных микобактерий туберкулеза вне зависимости от непосредственной бактерицидной активности антибиотика. В то же время авторы данной работы сообщили об увеличении уровня секреции IL6 в макрофагах под воздействием BDQ, но только при их инфицировании вирулентным штаммом.

Так как BDQ 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.tb*. Так, например, было показано, что курение сигарет вызывает метаболические нарушения в макрофагах и приводит к более низким внутриклеточным концентрациям АТФ. Это, как предполагается, может нарушать иммунный ответ макрофагов на инфицирование и способствовать персистенции в них возбудителя (Gleeson et al., 2018). Противотуберкулезные препараты могут изменять митохондриальную функцию в макрофагах. Для RIF было показано, что в высоких концентрациях он влияет на митохондрии, вызывая активную продукцию АФК и приводит к высвобождению цитохрома С (Ерохина и др, 2013). Было обнаружено, что BDQ в концентрации 50 мкМ нарушает митохондриальное дыхание в гепатоцитах крыс, ингибируя цепь переноса электронов, а также ингибирует продукцию H₂O₂ в диапазоне концентраций от 10 мкМ до 50 мкМ (Belosludtsev et al., 2019). Однако под воздействием терапевтических концентраций BDQ (5 или 10 мкг/мл) не было обнаружено каких-либо значимых изменений в митохондриальной функции в макрофагах человека, полученных из моноцитов периферической крови (Cahill et al., 2021).

2.4 Роль макрофагов в регуляции ТБ воспаления

Макрофаги являются первыми клетками врождённого иммунитета, которые вступают в борьбу с возбудителем. Макрофаги являются основными регуляторами воспалительного процесса, связывая врожденный и адаптивный иммунитет в борьбе с возбудителем туберкулеза: они фагоцитируют *M.tb* и инициируют формирование гранулем, характерного для туберкулеза типа воспаления (Pahari et al., 2018) (рис. 14).

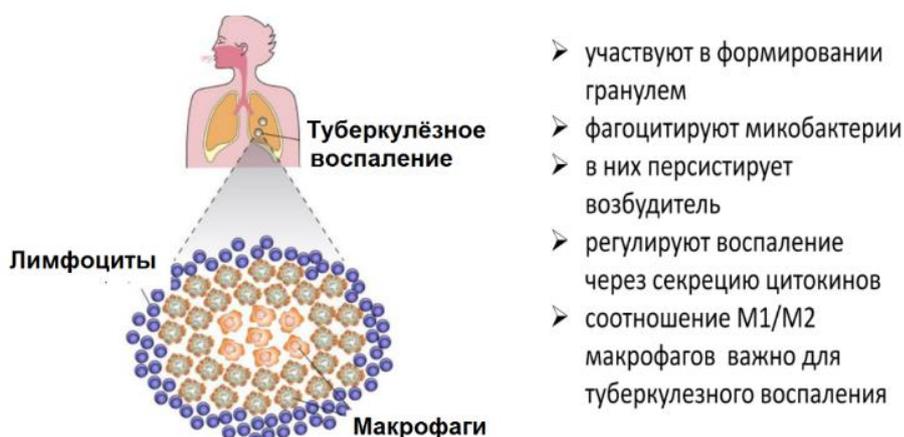


Рис. 14. Макрофаги при туберкулезном воспалении. Рисунок сделан с помощью BioRender.com

Важнейшей характеристикой макрофагов является их способность к активации и поляризации в зависимости от окружающих условий. Пластичность — отличительная черта макрофагов, заключающаяся в способности специфически реагировать на различные сигналы микроокружения и проявлять соответствующие фенотипические и

функциональные программы. Пластичность и поляризация оценивается по цитокиновому профилю и преобладанию тех или иных фагоцитарных рецепторов на поверхности клетки. В настоящее время выделяют два полярных фенотипа активированных макрофагов: классический (M1) и альтернативный (M2) (Mills et al., 2000). Такая классификация макрофагов связана с участием Th1 (Т-хелперы 1) и Th2 (Т-хелперы 2) в воспалительной реакции, что приводит к секреции макрофагами определенного цитокинового профиля, позволяющего отнести их к M1 или M2 фенотипу.

Поляризация макрофагов в M1 фенотип опосредуется провоспалительными цитокинами IFN γ и TNF α . M1 макрофаги характеризуются высоким уровнем секреции IL12, IL1 β , IL6. Поляризация M2 макрофагов опосредуется противовоспалительными цитокинами IL4, IL10, и IL13, для них характерен повышенный уровень секреции IL10 и TGF β . Рецепторы к фагоцитозу также являются молекулярными детерминантами, определяющими поляризацию макрофагов. Для M1 макрофагов характерна высокая экспрессия рецепторов к IgG (в первую очередь CD64), в то время как M2 макрофаги характеризуются повышенной экспрессией маннозного рецептора (CD206) (Martinez and Gordon, 2014).

На начальной стадии воспаления в гранулемах преобладают M1 макрофаги. Активация *M.tb* 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.tb* (Marino et al., 2015).

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 (рис. 15).

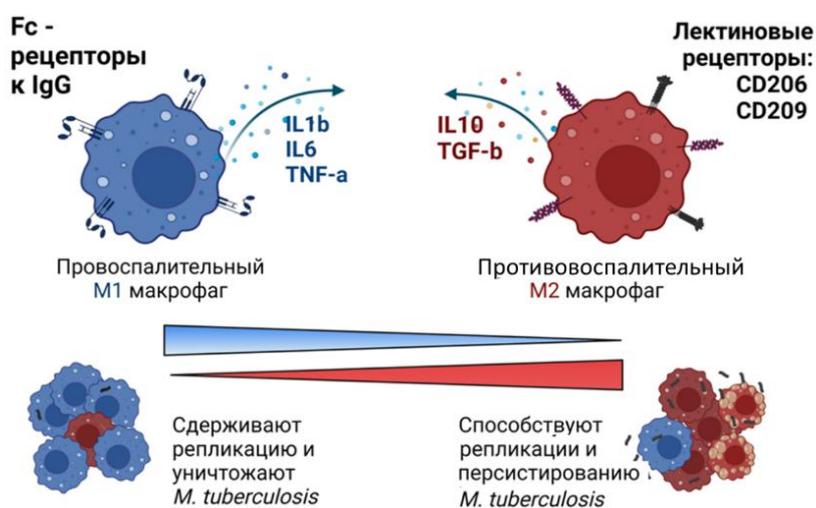


Рис. 15. Роль M1 и M2 макрофагов при туберкулезном воспалении в легких. Рисунок сделан с помощью BioRender.com

P-gr экспрессируется в макрофагах человека. В M2 макрофагах уровень его экспрессии и функциональная активность выше по сравнению с M1 макрофагами (Cory et al., 2016). С полиморфизмом гена *ABCB1* данного белка связывают устойчивость к противотуберкулезным препаратам, таким как рифампицин и этамбутол (Pontual et al., 2017). В связи с особой ролью макрофагов при развитии туберкулезного воспаления важным является получить ответ об активности P-gr в макрофагах, а также о влиянии противотуберкулезных препаратов как на экспрессию *ABCB1/P-gr*, так и на их иммунные функции.

2.5 Заключение по литературному обзору

Так как ТБ по-прежнему остается глобальной угрозой здравоохранения, а разработка новых и безопасных ПТП требуется существенных затрат и времени, то многообещающей стратегией повышения эффективности лечения ТБ, особенно МЛУ-ТБ, может быть «терапия, направленная на хозяина». Целью данной терапии является модуляция определенных, чаще всего иммунных, функций клеток организма-хозяина, которая будет способствовать усилению бактерицидных эффектов антибиотиков.

Макрофаги являются ключевыми регуляторами иммунитета в борьбе с возбудителем ТБ, от их функциональной активности зависит успешность элиминации внутриклеточных форм *M.tb*. Поэтому изучение молекулярных и клеточных механизмов, через которые возможно терапевтически «улучшить» или изменить потенциал макрофагов, является актуальным научным направлением для поиска путей повышения эффективности лечения больных ТБ.

P-gr является наиболее клинически значимым МЛУ белком при туберкулезном воспалении. Уровень экспрессии гена P-gr *ABCB1* регулируется множеством разнообразных факторов, актуальных при ТБ. Согласно литературным данным, такие факторы, как гипоксия, провоспалительные цитокины, патогенные микроорганизмы и длительное воздействие RIF могут оказывать влияние на уровень экспрессии гена *ABCB1* и функциональную активность P-gr.

P-gr обладает уникальной структурой и молекулярной гибкостью, позволяющей ему транспортировать из клеток чрезвычайно широкий спектр как лекарственных препаратов, так и эндогенных соединений за счёт наличия множественных сайтов связывания с субстратами. Транспортируя из клеток лекарственные препараты, P-gr оказывает влияние на их фармакокинетику. Таким образом, в целях повышения эффективности терапии ТБ актуален вопрос о взаимодействии противотуберкулезных препаратов с P-gr. RIF, один из важнейших противотуберкулезных препаратов 1-й линии, является субстратом P-gr.

Исследование влияния BDQ на функциональную активность P-gr ранее не проводилось.

Известно, что многие ПТП кроме непосредственного бактерицидного эффекта могут проявлять иммуномодулирующие свойства. Отсутствие всестороннего понимания иммуномодулирующего действия ПТП на эффекторные функции иммунных клеток может быть препятствием в разработке эффективных терапевтических стратегий для борьбы с ТБ. Если иммуномодулирующие свойства RIF в достаточной степени известны, то эффекты BDQ на макрофаги человека только начинают исследовать.

Первоначально P-gr был открыт в опухолевых клетках, но сейчас показано, что он локализуется и в нормальных тканях человека, прежде всего в эпителиальных, в которых он выполняет защитную функцию. В иммунных клетках человека роль P-gr, вероятно, заключается в транспорте различных цитокинов и хемокинов, что может оказывать влияние на созревание и миграцию иммунных клеток. Предполагается, что кроме транспорта широкого спектра веществ из клеток, в том числе и лекарств, P-gr может выступать и в качестве регулятора иммунного ответа.

Таким образом, исследование роли данного белка при ТБ важно, как с точки зрения его транспортных функций, а именно снижения накопления ПТП в органе-мишени, так и его роли в качестве иммунорегулятора в патогенезе ТБ, как при воспалении, так и под воздействием ПТП.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы и методы клинической части исследования

3.1.1. Операционный материал легких больных

В исследование были включены больные, направленные на оперативное лечение, исключительно с диагнозом «множественные туберкуломы легких» — клинко-анатомическая форма ТБ согласно российской классификации. Диагноз «туберкулез» был подтвержден бактериологическим и ПЦР методами.

Образцы легочной ткани были получены у 30 пациентов (18 женщин и 12 мужчин) в возрасте 28-49 лет (в среднем 35,24) в 2017-2018 гг. и у 35 пациентов (14 женщин и 21 мужчина) в возрасте 18-56 лет (в среднем 32,43) в 2021-2022 гг. в Центральном научно-исследовательском институте туберкулеза (ЦНИИТ, Москва). Все больные в предоперационном периоде получали противотуберкулезное лечение, продолжительность которого варьировала в широких пределах: от 11 месяцев до 4 лет у больных в 2017-2018 гг. (в среднем 28,3 месяцев) и от 4 месяцев до 5,5 лет у больных в 2021-2022 гг. (в среднем 22,2 месяца).

Все исследования были одобрены этическим комитетом ЦНИИТ (Протокол № 1 от 15 января 2017 г. и Протокол № 1 от 18 января 2021 г) и проводились в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации. От каждого пациента, участвовавшего в этом исследовании, было получено письменное информированное согласие.

3.1.2. Гистологические исследование

После хирургической резекции образцы легочной ткани немедленно фиксировали в 10% формалине («Биовитрум», Россия). Дегидратацию проводили по стандартному протоколу в ряду спиртов от 70 до 96 %, 100 % этанол заменяли изопропиловым спиртом. После изопропилового спирта образцы заливали в парафин Hystomix («Биовитрум», Россия), после чего нарезали их толщиной 5 мкм для изготовления серийных срезов. Срезы тканей окрашивали гематоксилином и эозином и заливали канадским бальзамом для гистологического исследования. На основании морфологических признаков клинический материал был классифицирован на туберкуломы с признаками высокой и умеренной активности туберкулезного воспаления. Для световой микроскопии использовали микроскоп ЦКП Института биологии развития РАН Biozero BZ-9000E от Keyence (Keyence, Япония).

3.1.3. Анализ экспрессии генов в операционном материале

Образец легочной ткани (около 25-50 мг) брали сразу после операции в области около 0,5 см от стенки туберкуломы, так называемой перифокальной области (ПФО). Образцы

немедленно замораживали в азоте и хранили при температуре -70°C для последующего ПЦР-анализа.

Для выделения РНК к 1 мл TRIReagent (MRC, США) добавляли 100 мкл 1-бром-3-хлорпропана (Sigma-Aldrich, США), тщательно перемешивая до однородного состояния и инкубировали смесь в течение 15 минут при комнатной температуре. Далее смесь центрифугировали на оборотах 12 000 g в течение 15 минут при температуре. Водную фазу тщательно собирали и добавляли к ней 500 мкл изопропанола (1:1), после чего тщательно перемешивали. После этого смесь инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре, затем центрифугировали в течение 20 минут на 15 000 оборотах (или 12 000 g) при температуре 4°C . Далее спирт удаляли, оставляя осадок РНК. Преципитат выделенной РНК еще дважды промывали 80% этанолом, высушивали и разводили в воде без РНКаз в объеме 20 – 30 мкл. Для оценки качества и количества выделенной РНК использовали спектрофотометр Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США). Для дальнейшего синтеза кДНК использовали образцы с соотношением абсорбции на длинах волн 260/280 в диапазоне с 1.9 до 2.1. Целостность РНК дополнительно оценивали с помощью гель-электрофореза и для анализа брали образцы с видимыми полосами 28S и 18S РНК.

1 мкг тотальной РНК обрабатывали с помощью ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLV RT (Евроген, Россия) в соответствии с предоставленными инструкциями и с использованием случайных гексамерных праймеров. Полученную кДНК использовали для количественного ПЦР-анализа. Для ПЦР в реальном времени использовали коммерческую смесь qPCRmix-HS SYBR и Low-Rox (Евроген, Россия), содержащую полимеразу, буфер и смесь нуклеотидов согласно инструкции производителя. В реакцию брали 250 нг синтезированной кДНК с последующим добавлением прямого и обратного праймеров в конечной концентрации 1 мкМ. ПЦР в реальном времени для образцов, полученных в период с 2017 по 2018 год, проводили в 2018 году с использованием амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad, США) с праймерами, перечисленными ниже (таблица 2).

Таблица 2. Пары праймеров, использованные для ПЦР в реальном времени для операционного материала, полученного в 2017 и 2018 гг.

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина, п.о.
<i>ABCB1</i>	GGGATGGTCAGTGTGATGGA	GCTATCGTGGTGGCAAACAATA	110
<i>ABCC1</i>	GTGAATCGTGGCATCGACATA	GCTTGGGACGGAAGGGAATC	184
<i>ABCG2</i>	TGAGCCTACAACCTGGCTTAGA	CCCTGCTTAGACATCCTTTTCAG	75
<i>RPL27</i>	ACCGCTACCCCGCAAAGTG	CCCGTCGGGCCTGCGTTTA	198

Каждый образец амплифицировали в трех повторностях с использованием следующего профиля циклов ПЦР: 95°C в течение 5 мин, затем 39 циклов при 95°C в течение 13 с, 60°C в течение 20 с и 72°C в течение 15 с. Относительные уровни экспрессии количественно определяли с использованием метода ΔC_t , а условные единицы (у.е.) рассчитывали как $2^{-\Delta C_t} \times 10^3$, где ΔC_t — разница между пороговыми циклами целевого гена и гена домашнего хозяйства RPL27.

ПЦР в реальном времени для образцов, полученных между 2021 и 2022 годами, была проведена в 2022-2023 гг. году с использованием системы QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems, США) с использованием праймеров, приведенных ниже (таблица 3).

Таблица 3. Пары праймеров, использованные для ПЦР в реальном времени для операционного материала, полученного в 2021 и 2022 гг.

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина продукта, п.о.
<i>B2M</i>	GGGTTTCATCCATCCGACATTG	ACACGGCAGGCATACTC	161
<i>ABCBI</i>	TTGCTGCTTACATTCAGGTTTCA	AGCCTATCTCCTGTCGCATTA	105
<i>HIF1a</i>	CTGAACGTCGAAAAGAAAAGTC	AAATCACCAGCATCCAGAAGT	190
<i>IL1b</i>	TTACAGTGCGCAATGAGGATGAC	TGTAGTGGTGGTTCGGAGATTC	131
<i>IL6</i>	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG	149
<i>IL10</i>	CGCTGTCATCGATTTCTTCCC	AGAGTCGCCACCCTGATGTC	185
<i>TNFa</i>	TCAGCAAGGACAGCAGAGGA	GTCAGTATGTGAGAGGAAGAGAACC	128
<i>INFg</i>	TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA	TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC	93
<i>TGFb1</i>	AACAATTCCTGGCGATACCTCA	AAGCCCTCAATTTCCCTCC	125
<i>STAT1</i>	TGGTTCACTATAGTTGCGGAGAG	TGAATGAGCTGCTGGAAAAGA	158
<i>STAT3</i>	CATATGCGGCCAGCAAAGAA	ATACCTGCTCTGAAGAACT	152
<i>STAT6</i>	AGGATGGCAGGGGTTATGT	GGGGGATGGAGTGAGAGTG	198
<i>SOCS3</i>	AAGATCCCCCTGGTGTGTA	TAAAGCGGGGCATCGTA	162
<i>CD3D</i>	GAGGGAACGGTGGGAACA	CAAAGCAAGGAGCAGAGTGG	228
<i>GZMB</i>	CCCTGGGAAAACACTCACAC	CCCCACGCACAACCTCAAT	116
<i>CD86</i>	CAAAACCAAAGCCTGAGTGA	GGTTTTTGTGATGGATGATAC	215
<i>CD163</i>	ATCCCGTCAGTCATCSTTTATT	CTGTCTCTGTCTTCGCTTTTTAGT	103
<i>CD206</i>	CTACAAGGGATCGGGTTTATGGA	TTGGCATTGCCTAGTAGCGTA	105
<i>TGM2</i>	CGTGACCAACTACAACCTCGG	CATCCACGACTCCACCCAG	136

Каждый образец амплифицировали в двух повторностях, используя следующий профиль циклов ПЦР: 95°C в течение 3 мин, затем 40 циклов при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 60 с. Относительные уровни экспрессии количественно с использованием метода ΔC_t , а условные единицы (у.е.) рассчитывали как $2^{-\Delta C_t} \times 10^4$, где ΔC_t — разница между пороговыми циклами целевого гена и гена домашнего хозяйства B2M.

3.1.4. Обработка данных и статический анализ

Статистическую обработку проводили с помощью статистического пакета GraphPad

Prism Version 7.04 (GraphPad Software, США). Данные представлены в виде медианы с межквартильными размахами. Для сравнения двух групп использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, а для множественных сравнений – непараметрический критерий Крускала-Уоллиса с post-hoc критерием Данна. Все значения p были двусторонними и $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Корреляцию между переменными оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (r). Иерархический кластерный анализ и тепловые карты были выполнены с использованием инструмента ClustVis 2.0 (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis>).

3.2. Материалы и методы экспериментальной части *in vitro* исследования

3.2.1. Клеточные линии

В экспериментах использовали клеточную линию ТНР-1 (острый моноцитарный лейкоз, ATCC TIB-202) и субклон IS9 клеточной линии K562 (ATCC CLL-243, хронический промиелоцитарный лейкоз) с гиперэкспрессией P-гp, полученный путем стабильной трансфекции гена *ABCB1* (Mechetner et al., 1997).

Указанные клеточные линии являются суспензионными. Культивирование проводилось в среде RPMI1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка (ФБС, ПанЭко, Россия), 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 40 мкг/мл гентамицина при 37°C и 5% CO₂. Суспензионную культуру пассировали каждые 3–4 дня при достижении концентрации 1–1.5 млн клеток на 1 мл культуральной среды.

Для дифференцировки клеточной линии ТНР-1 в макрофагоподобные клетки использовали 100 нМ форболового эфира (PMA, форбол-12-миристан-13-ацетат, Sigma-Aldrich, США). Стоковая концентрация PMA составила 2×10^{-2} в ДМСО (диметилсульфоксид, ПанЭко, Россия). Клетки в концентрации $\sim 1 \times 10^6$ на 5 мл среды рассеивали в культуральные флаконы (25 см³, SPL LifeScience, Корея) или стерильные чашки Петри 60 мм (Corning, США) и однократно обрабатывали PMA в течение 72 часов, после чего культуральную среду заменяли на свежую. Длительность культивирования клеток зависела от выбранного дизайна эксперимента и представлена ниже. Модель макрофагов ТНР-1 была охарактеризована ранее (Курынина и др., 2018). Макрофаги ТНР-1 характеризуются высокой экспрессией и секрецией провоспалительных цитокинов (IL1b, TNFa) и низким уровнем экспрессии и секреции IL10, а также высоким уровнем экспрессии гена CD64 (Fc-рецептор к IgG с высокой аффинностью) и выраженной способностью к фагоцитозу через Fc-рецепторы на протяжении всего срока эксперимента (до 7 суток).

3.2.2. Экспериментальные концентрации препаратов

В работе использовали «терапевтические» концентрации бедаквилаина (BDQ,

MedChemExpress, США) – 5 мкг/мл и рифампицина (RIF, Sigma-Aldrich, США) – 10 мкг/мл, что соответствуют максимальным концентрациям, которые определяются в плазме крови больных туберкулезом при приеме 400 мкг BDQ или 600 мкг RIF соответственно (Alsultan and Peloquin, 2014; Andries et al., 2005).

Рифампицин, инкапсулированный в полимер молочной кислоты (RIF-PLLA), был разработан в НИИ Молекулярной и персонализированной медицины (патент RU2418585C1) и любезно предоставлен проф. Г.Г. Барсегяном, как и отдельные наночастицы полимера молочной кислоты (PLLA). Согласно данным разработчика, средний размер наночастиц, измеренный с использованием метода автокорреляционной спектроскопии, равен 378 ± 84 нм. Доля RIF в препарате составляет в среднем 8–10% по массе.

Для ингибирования функциональной активности P-гр использовали R-верапамил гидрохлорид (VER, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10 мкМ. R-верапамил (или Dexverapamil) – это R-энантиомер блокатора кальциевых каналов верапамила. R-энантиомер в сравнении с рацематом проявляет меньшую активность в качестве блокатора кальциевых каналов (Busse et al., 2006). Экспериментальная концентрация VER была выбрана из диапазона от 2.5–5–10–25–50 мкМ. Анализ данных выброса родамина 123 в ТНР-1 макрофагах на 7 сутки дифференцировки выявил, что увеличение концентрации VER свыше 10 мкМ не приводит к дальнейшему увеличению интенсивности флуоресценции в клетках, тем самым концентрация VER равная 10 мкМ полностью ингибировала функциональную активность P-гр в макрофагах. Детально методика тестирования функциональной активности P-гр прописана в разделе 3.2.6. Материалов и методов.

Стоковые концентрации препаратов RIF, BDQ и VER ($\times 1000$) были разведены в ДМСО и хранились на -20°C . Наночастицы RIF-PLLA и PLLA хранили при $+8^{\circ}\text{C}$ и разводили в культуральной среде до требуемой концентрации непосредственно перед экспериментом.

3.2.3. Дизайн экспериментов по исследованию влияния фармакологического ингибирования P-гр на макрофаги ТНР-1, в том числе и под воздействием противотуберкулезных препаратов

Для исследования влияния RIF и BDQ на макрофаги как самостоятельно, так и при фармакологическом ингибировании P-гр, препараты добавляли при индукции макрофагальной дифференцировки совместно с PMA, а также на 3 и 5 сутки дифференцировки. Влияние препаратов изучали на ранние (3 сутки) и поздние (7 сутки) сроки макрофагальной дифференцировки. VER добавляли как совместно с RIF и BDQ, так и самостоятельно. Анализировали уровень экспрессии генов, секрецию цитокинов и

фагоцитарную активность на 3 и 7 сутки макрофагальной дифференцировки. Дизайн экспериментов представлен на Рисунке 16.

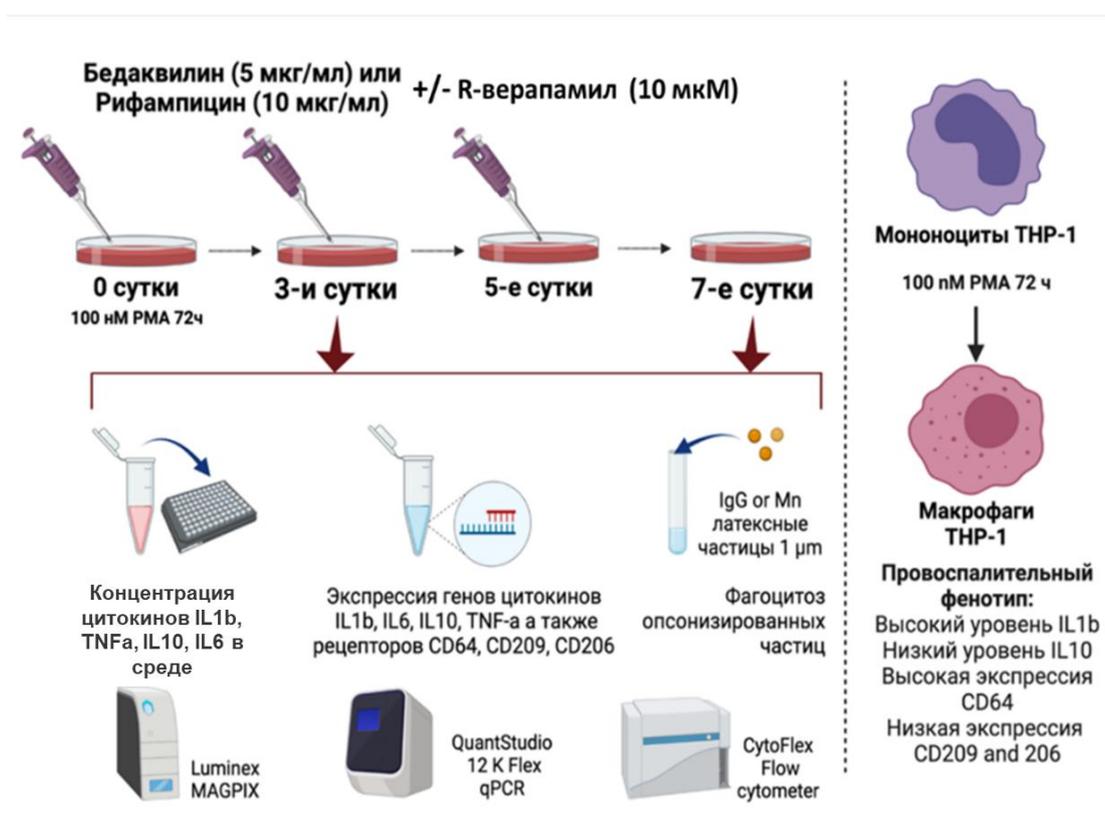


Рис. 16. Дизайн экспериментов по исследованию влияния фармакологическом ингибировании P-гр на свойства макрофагов как самостоятельно, так и под воздействием рифампицина и бедаквилаина. BioRender.com

3.2.4. Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени

Для анализа экспрессии генов в макрофагах использовали метод количественной ПЦР в реальном времени.

Суспензию клеток (~1 млн) дважды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ, 1 таблетка на 100 мл дистиллированной воды, Sigma-Aldrich, США), клеточный осадок заливали 1 мл TRIReagent (MRC, США), ресуспендировали и замораживали на -70°C для дальнейшего выделения РНК.

Выделение РНК, обработку ДНКазой и синтез кДНК проводили как описано в разделе 3.1.3. Материалов и методов.

500 нг кДНК в финальном объеме 25 мкл было использовано для количественной ПЦР в реальном времени с помощью ген-специфических праймеров (Евроген, Россия), приведенных в Таблице 3 и набора qPCRmix-HS SYBR+LowRox (Евроген). Все реакции (40 циклов) были запущены на приборе QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Относительные уровни экспрессии исследуемых генов (RQ) выражены как значения $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, нормализованные к уровням генов домашнего хозяйства *B2M* и *RPL37A*.

Для обработки и анализа данных ПЦР в реальном времени использовали программное обеспечение ExpressionSuite Software v.1.3 (Applied Biosystems). Все эксперименты были проведены не менее чем в 3-х биологических повторах. Для биологического повтора использовали усредненное значение 2-х технических повторов. Данные представлены как средние значения относительного уровня экспрессии гена всех биологических повторов (RQ) \pm стандартное отклонение (SD). Дополнительные праймеры, которые использовались только в *in vitro* исследованиях, представлены в таблице ниже (таблица 4).

Таблица 4. Ген-специфические праймеры, используемые для ОТ-ПЦР в *in vitro* исследованиях

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина продукта, п.н.
<i>CD209</i>	CCAGGTGAAGCGGTTACTTC	GCTCGTCGTAATCAAAAAGTGC	76
<i>RPL37A</i>	ССАААСГТАССААГАААГТССГ	GCGTGCTGGCTGATTTCAA	100

3.2.5. Определение концентрации цитокинов в культуральной среде

Для количественного определения уровня секретируемых цитокинов IL1b, TNF α , 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. Для каждого образца было выполнено 3 технических повтора, для биологического повтора использовали усредненное значение 3-х технических повторов.

3.2.6. Исследование влияния препаратов на функциональную активность P-gr

Для исследования влияния RIF-PLLA и BDQ на функциональную активность P-gr проводили краткосрочную инкубацию клеток (30 минут) линии K569/IS9 с гиперэкспрессией P-gr с различными концентрациями исследуемых препаратов. Клеточные линии в гиперэкспрессией P-gr являются традиционным модельными объектами для тестирования функциональной активности P-gr с целью скрининга возможных субстратов и ингибиторов данного транспортёра (Zahra et al., 2020). Препарат инкубировали в течение 30 минут с клетками K569/IS9 совместно с родамином 123. Для BDQ тестировали концентрации: 5-10-25-50 мкг/мл, а в качестве контроля использовали RIF в концентрации 10 мкг/мл. Для исследования влияния RIF-PLLA на функциональную активность P-gr использовали концентрацию препарата, равную 100 мкг/мл, что соответствует приблизительно 8–10 мкг/мл чистого RIF, в качестве контроля также

использовали наночастицы полимера молочной кислоты (PLLA) без RIF в концентрации 100 мкг/мл и RIF в концентрации 10 мкг/мл.

Оценку функциональной активности P-gr проводили в соответствии с протоколом MDR1 Efflux Assay (Sigma-Aldrich, США).

Клетки инкубировали с родамином 123 в концентрации 5 мкМ в темноте при 4°C 20 мин, затем культуральную среду меняли, и клетки инкубировали 30 мин при 37°C в присутствии исследуемых агентов. Для оценки функциональной активности P-gr, а также влияния исследуемых препаратов на выброс родамина 123 использовали параметр фактора ингибирования активности P-gr (ФИА_{P-gr}), который рассчитывали по формуле:

$$\text{ФИА}_{\text{P-gr}} = 1 - [(\text{МИФ}_{\text{винбластин}} - \text{МИФ}_{\text{препарат или среда}}) / \text{МИФ}_{\text{винбластин}}] \times 100,$$

где МИФ – показатель медианы интенсивности флуоресценции родамина 123 в клетках в присутствии винбластин 22 мкМ, который полностью ингибирует функциональную активность P-gr (ФИА_{P-gr}=100) или исследуемых препаратов.

Также с помощью проточной цитометрии была проведена оценка влияния различных концентраций BDQ на митохондрии клеток. Для этого оценивали трансмембранный потенциал с помощью TMRE и выработку реактивных форм кислорода с помощью DCFH-DA, как описано в статье (Yamansarov et al, 2021).

Клетки анализировали на проточном цитометре FACSAria SORP (BD BioSciences, США) с помощью программного обеспечения FACSDiva (версия 6.2.1, BD BioSciences, США). Для каждого эксперимента записывали 30 000 событий. Значения ФИА_{P-gr} представлены как средние ± стандартное отклонение по результатам 3 независимых экспериментов.

3.2.7. Оценка активности рецепторного фагоцитоза

Для анализа фагоцитарной активности макрофагов под воздействием RIF и BDQ 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 7 сутки дифференцировки инкубировали с частицами в течение 3 часов в культуральной среде без сыворотки, клетки открепляли от подложки с помощью культурального скребка, предварительно проинкубировав их в течение 10 минут с 25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, pH 6.5), добавленной непосредственно в культуральную среду согласно протоколу (Kaag and Esau, 2015) и анализировали на проточном цитометре CytoFlex (Beckman Coulter, США), записывая 30 000 событий. Фагоцитарную активность клеток оценивали по медиане интенсивности флуоресценции латексных частиц, возбуждаемых

синим лазером (488 нм) в канале FITC.

3.2.8. Анализ данных проточной цитофлуориметрии

Для дальнейшего анализа и визуализации полученных данных преимущественно использовалось свободное программное обеспечение Flowing Software 2.5.1 (<http://flowingsoftware.btk.fi/>).

На основании данных по прямому (FSC-A) и боковому светорассеиванию (SSA-A) выделяли гейт живых клеток. В выделенном гейте живых клеток на основании данных высоты и ширины параметров прямого светорассеивания исключали дуплеты (FSC-H vs FSC-W) и в дальнейшем анализировали интенсивность флуоресценции красителей только данной выделенной популяции клеток.

3.2.9. Сканирующая электронная микроскопия

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) одну каплю суспензии наночастиц рифампицина, инкапсулированного в полимер молочной кислоты помещали на покровное стекло и высушивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Клетки K562/IS9 фиксировали 2,5% глутаровым альдегидом (Ted Pella, США) с добавлением 2% параформальдегида на ФСБ в течение 1 ч, обезвоживали в восходящих концентрациях этилового спирта по следующей схеме: 30°–40°–50°–60°–70°–80° и 96°, затем помещали в смесь ацетона и этилового спирта в необходимых пропорциях (3:1, 1:1, 1:3), а затем – в чистый ацетон. После обезвоживания образцы подвергали сушке в критической точке в атмосфере CO₂ (31°C, 73,8 бар), покрывали платиной и золотом, а затем анализировали в сканирующем электронном микроскопе «JSM-6380 LA» (Jeol, Япония), 20 кВ.

3.2.10. Лентивирусная трансформация клеточной линии ТНР-1

Так как клеточная линия ТНР-1 сложно поддается традиционным методам трансфекции (Маев et al., 2014), мы использовали лентивирусную трансформацию с использованием вектора, содержащего шпилечную РНК (shRNA). Для этих целей была выбрана плазида pLV (Addgene, #11619), которая содержит генетические элементы, предотвращающие эпигенетическое замалчивание генетической конструкции, а также позволяет провести селекцию трансдуцированных клеток по экспрессии eGFP (Kissler et al., 2006).

3.2.10.1. Разработки плазмиды со шпилечной РНК против гена *ABCB1*

Плазида была получена из базы данных Addgene в виде ДНК на фильтровальной бумаге. Плазида была смыта с бумаги 30 мкл ТЕ (Трис-ЭДТА) буфером и 2 мкл элюата было использовано для химической термошоковой трансформации компетентных клеток *E. coli* (штамм XL1-Blue, Евроген). Трансформированные бактерии были высеяны на LB агар с селективным антибиотиком ампициллином. Из выросших колоний были получены

ночные культуры бактерий в жидкой среде и выделены плазмидные ДНК с помощью набора для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep в соответствии с инструкциями производителя (Евроген).

Целевую последовательность шпилечной РНК (shRNA) подбирали к кодирующей последовательности мРНК гена *ABCB1* в соответствии с критериями, сформулированными в протоколе лаборатории Tyler Jacks (<https://media.addgene.org/data/94/67/16242780-af64-11e0-90fe-003048dd6500.pdf>). Последовательность соответствовала схеме AAGN(18)TT. 5'-гуанин необходим для активности U6 промотора, под который клонируется shRNA. Кандидатные целевые последовательности были проанализированы с помощью ресурса siRNA-Check (<http://projects.insilico.us/SpliceCenter/siRNACheck>). Была выбрана последовательность с наибольшей предсказанной эффективностью и специфичностью.

В соответствии с этой последовательностью были разработаны последовательности олигонуклеотидов для последующего клонирования в плазмиду:

Olig1 (5' – 3'): TG-(AAACCAACTGTCAGTGTA)-TTCAAGAGA-(TACACTGACAGTTGGTTT)-CTTTTTTC

Olig2 (5' – 3'): TCGAGAAAAAAG-(AAACCAACTGTCAGTGTA)-TTCAAGAGA-(TACACTGACAGTTGGTTT)-CA

При отжиге данных нуклеотидов формируется двухцепочечная ДНК с одним тупым концом и одним липким концом, соответствующим сайту рестрикции XhoI. Олигонуклеотиды были синтезированы и 5'-кинированы в компании Евроген. Отжиг олигонуклеотидов (по 60 пМ каждого) проводился в объеме 50 мкл в соответствующем буфере (10 мМ Tris, 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА) по следующей программе: 95 С – 4 мин, 70 С – 10 мин, с интервалом 0,1 снижения температуры по 1 минуте до 4 С (около 12 часов).

Для клонирования олигонуклеотидов плазмидная ДНК была подвержена рестрикции ферментами HpaI и XhoI (Сибэнзим, Россия). После рестрикции плазмидная ДНК была выделена и очищена с помощью колоночного набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия). После этого линейаризованный вектор был дефосфорилирован с помощью щелочной фосфатазы Anza (ThermoFisherБ США) в соответствии с протоколом производителя и вновь очищен на колонках Plasmid Miniprep.

Лигирование производилось с помощью набора для лигирования, содержащего T4-лигазу (Евроген, Россия), при молярном соотношении вектора и вставки 1:1 (по 9 пМ). Компетентные клетки *E. coli* (штамм XL1-Blue, Евроген, Россия) были трансформированы полученной лигазной смесью и высеяны на LB агар с селективным антибиотиком ампициллином. Из полученных колоний была выделена плазмидная ДНК. Полученные клоны плазмидной ДНК были подвержены рестрикции ферментами HpaI и NotI и те

плазмиды, которые имели целевую вставку олигонуклеотидов (по наличию фрагмента ~500 п.н.). Из 8-ми выделенных плазмид 4 имели ожидаемый рестриционный фрагмент и были отправлены на секвенирование (Евроген, Россия) (рис.17.а). По результатам секвенирования была идентифицирована плазида, содержащая необходимую вставку (рис.17.б)

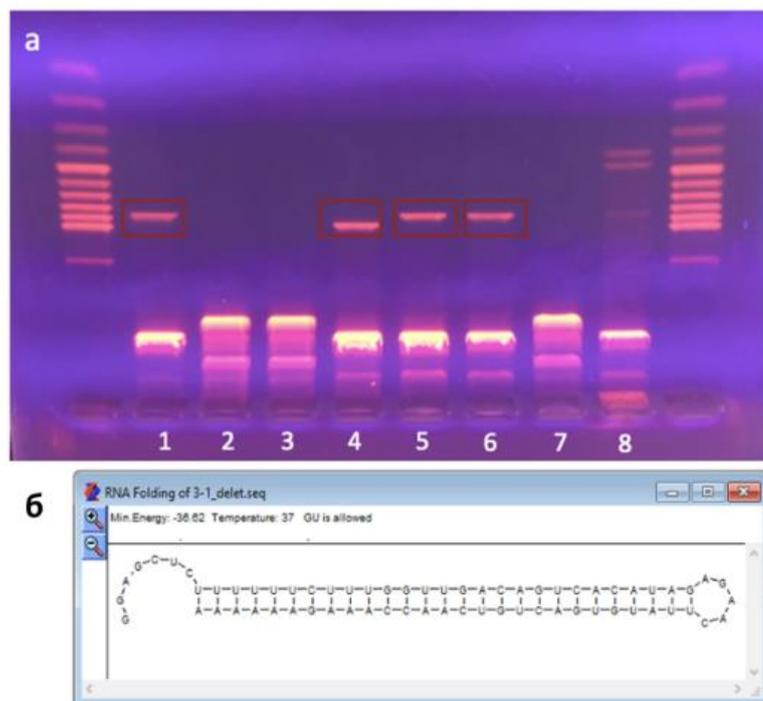


Рис. 17. а. Изображение геля после рестрикции плазмидной ДНК. Рамкой обозначены ожидаемые рестриционные фрагменты. б. Структура шпилечной RNA, которую кодирует последовательность целевой вставки.

Таким образом, была сконструирована плазида, содержащая shRNA против гена *ABCB1* под U6 промотером, а также eGFP под цитомегаловирусным промотером для последующей селекции трансдуцированных клеток методом FACS (активированная флуоресценцией сортировка клеток).

3.2.10.2.Лентивирусная трансдукция клеток разработанной плазмидой со шпилечной РНК

Лентивирусные частицы, содержащие shRNA к мРНК гена *ABCB1*, встроенную в плазмиду (pLB_sh21), а также плазмиду без шпильки (pLB), были получены в Центре высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им Н.И. Пирогова (при сотрудничестве с к.б.н. Э.Б. Дашинимаевым).

Для лентивирусной трансдукции клеток линии ТНР-1 и K562/IS9 среду культивирования (RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2

мМ глутамин, 40 мкг/мл гентамицин) заменяли на аналогичную среду без сыворотки, содержащую лентивирусные частицы в количестве 2×10^6 вирусных частиц/мл из расчета 10 копий вируса на 1 клетку.

Для повышения проницаемости плазматической мембраны клеток в культуральную среду с вирусными частицами добавляли гексадиметрина бромид (полибрен, Sigma Aldrich, США) в концентрации 5 мкг/мл. Через 24 часа среду с вирусными частицами заменяли на свежую культуральную среду и клетки культивировали еще 72 часа (3 суток). После этого проводили селекцию клеток, содержащих плазмиду, по наличию сигнала eGFP с помощью FACS. После проведения сортировки клетки линии K562/IS9 были сразу же использованы для анализа эффективности выбранной shRNA методом ПЦР в реальном времени. Клетки линии ТНР-1 после сортировки культивировали еще в течение 7 суток, для увеличения их числа. Через 7 суток культивирования часть клеток была отправлена на анализ эффективности нокдауна гена *ABCB1*, часть клеток была подвергнута криоконсервации и через 7 суток разморожена и культивировалась еще в течение 4 недель для проверки стабильности генетической конструкции и нокдауна целевого гена.

С помощью проточной цитометрии оценивали процент клеток, содержащих плазмиду, по экспрессии eGFP белка (канал FITC). Использовали проточный цитометр FACSAria SORP (BD BioSciences, США) со встроенным аргонным лазером 488 нм и фильтром BP 530/30 нм с помощью программного обеспечения FACSDiva (версия 8.0.1, BD BioSciences, США). Для каждого эксперимента записывали 30 000 событий.

С помощью ПЦР в реальном времени оценивали уровень экспрессии гена *ABCB1* в соответствии с методикой, описанной в разделе 3.2.4. Материалов и методов.

Клетки исходной линии ТНР-1, трансдуцированные клетки, содержащие shRNA (ТНР-1_sh21) или только плазмиду были в дальнейшем подвергнуты макрофагальной дифференцировке, индуцированной 100 нМ форболового эфира для сравнения их морфологии с помощью светлой и флуоресцентной микроскопии. А также макрофагальные клетки были инфицированы вирулентным штаммом *M.tb* для анализа эффективности фагоцитоза (24 часа после инфицирования).

3.2.11. Инфицирование макрофагов ТНР-1 *M. tuberculosis*

Инфицирование макрофагов ТНР-1 *M.tb* (вирулентный штамм H37Rv) проводили на 5 сутки макрофагальной дифференцировки. В процессе макрофагальной дифференцировки клетки культивировали в среде без антибиотиков. Перед экспериментами культуральную среду заменяли на среду без сыворотки и антибиотиков и добавляли к клеткам аликвоту *M.tb* из расчета 10 микобактерий на 1 макрофагальную клетку. Инфицирование макрофагов проводили в сертифицированном для данного вида работ виварии ФГБНУ «Центральный

научно-исследовательский институт туберкулеза». Через 24 часа после инфицирования клетки тщательно промывали ФСБ для удаления нефагоцитированных микобактерий туберкулеза. Для микробиологического анализа клетки, предварительно промыв дважды ФСБ, собирали с помощью клеточного скрепера в 2 мл ФСБ, из 200 мкл полученной суспензии клеток готовили серию 10-кратных разведений и 100 мкл каждого разведения наносили на агар Дюбо. Чашки Петри с агаром инкубировали в термостате при температуре 37 С, колониеобразующие единицы (КОЕ) *M.tb* считали на 21-й день после посева. Для подсчета КОЕ *M.tb* использовали 3-ю и 4-ю серии 10-кратного разведения. Оставшуюся часть суспензии клеток центрифугировали, сливали надосадочную жидкость, а осадок клеток помещали в TriReagent (MRC, США) и использовали для выделения РНК и дальнейшего исследования экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени в соответствии с ранее описанной методикой (разделе 3.2.4. Материалов и методов)

3.2.12. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку проводили с помощью статистического пакета GraphPad Prism Version 7.04 (GraphPad Software, США). Соответствие данных нормальному распределению проверяли критерием Шапиро-Уилка, для проверки равенства дисперсий – критерий Фишера. Результаты представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD), если не указано иное. Для сравнения результатов, соответствующих нормальному распределению и с равными дисперсиями, использовали t-критерии Стьюдента или One-Way ANOVA для множественных сравнений с последующим апостериорным тестом Тьюки – Крамера. Различия считали значимыми для $p < 0,05$.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

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

4.1.1 Морфологическая характеристика туберкулом с умеренной и высокой активностью воспаления

В зависимости от активности специфического воспаления туберкуломы различаются по морфологическим признакам. При умеренной активности воспалительного процесса туберкуломы характеризуется следующими морфологическими признаками: в центре имеется участок уплотненного казеозного некроза, который окружен двухслойной капсулой, состоящей из грануляционного (внутренней) и фиброзного (внешний) слоев (рис. 18). Фиброзный слой капсулы туберкуломы преобладает над грануляционным, хорошо выражен и образован компактно расположенными соединительнотканными волокнами (рис. 18.б).

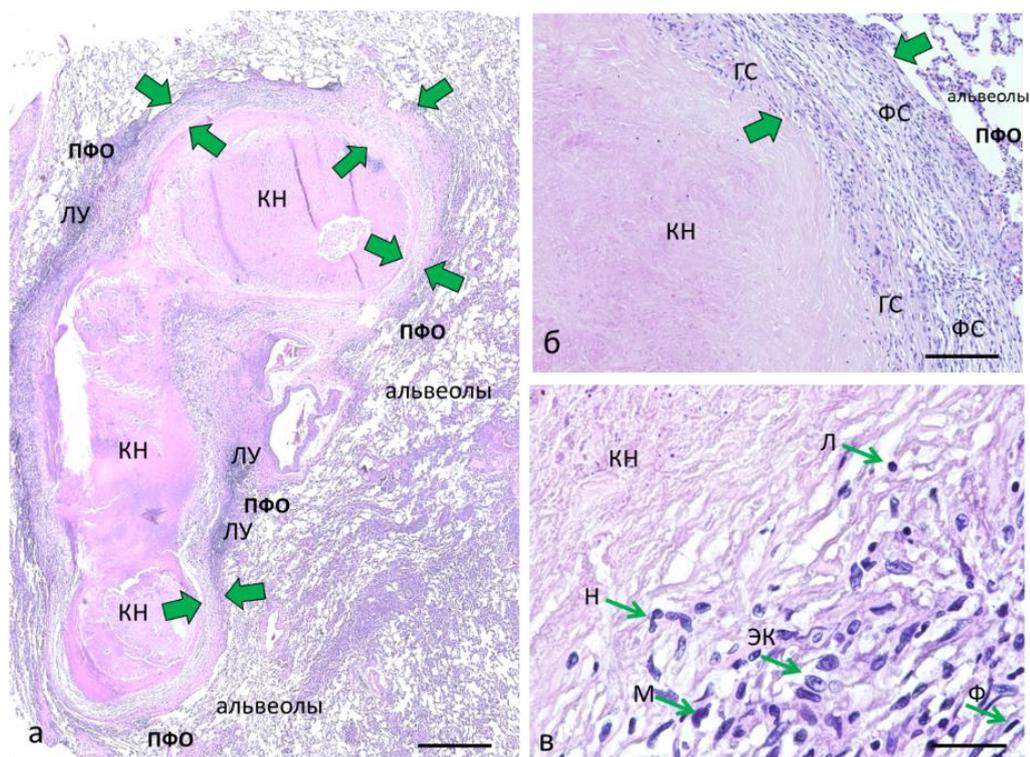


Рис. 18. Туберкулома легкого с признаками умеренной активности воспаления. а – туберкулома (конгломерат клеток) с уплотненным некрозом, ограниченная двухслойной капсулой; зеленые стрелки показывают границы капсулы туберкуломы; б – увеличенный фрагмент туберкуломы с фиброзным слоем капсулы; в – крупный фрагмент стенки капсулы, клетки отмечены зелеными стрелками. КН – казеозный некроз, ГС – грануляционный слой, ФС – фиброзный слой, ЛУ – лимфоидные узелки, Н – нейтрофилы, М – макрофаги, Л – лимфоциты, Ф – фибробласты, ЭК – эпителиоидные клетки. ПФО – перифокальная область туберкуломы. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок: а = 500 мкм, б = 100 мкм, в = 20 мкм.

В отличие от фиброзного слоя грануляционный слой выражен слабо и представлен немногочисленными клетками, среди которых выявляются макрофаги, лимфоциты, а также единичные нейтрофилы и эпителиоидные клетки (рис.18.в). Также могут встречаться единичные клетки Пирогова-Лангханса. В области паренхимы легких, непосредственно прилегающей к капсуле туберкулемы, так называемой перифокальной области (ПФО), альвеолы сохраняют свою нормальную структуру, лимфоидные узелки немногочисленны (рис. 18.а).

При высокой активности воспалительного процесса в центре туберкулемы наблюдается казеозный некроз с признаками распада. В отличие от туберкулом с признаками умеренной активности воспаления, в капсуле преобладает грануляционный слой, в то время как фиброзный слой выражен слабо (рис.19.а,б).

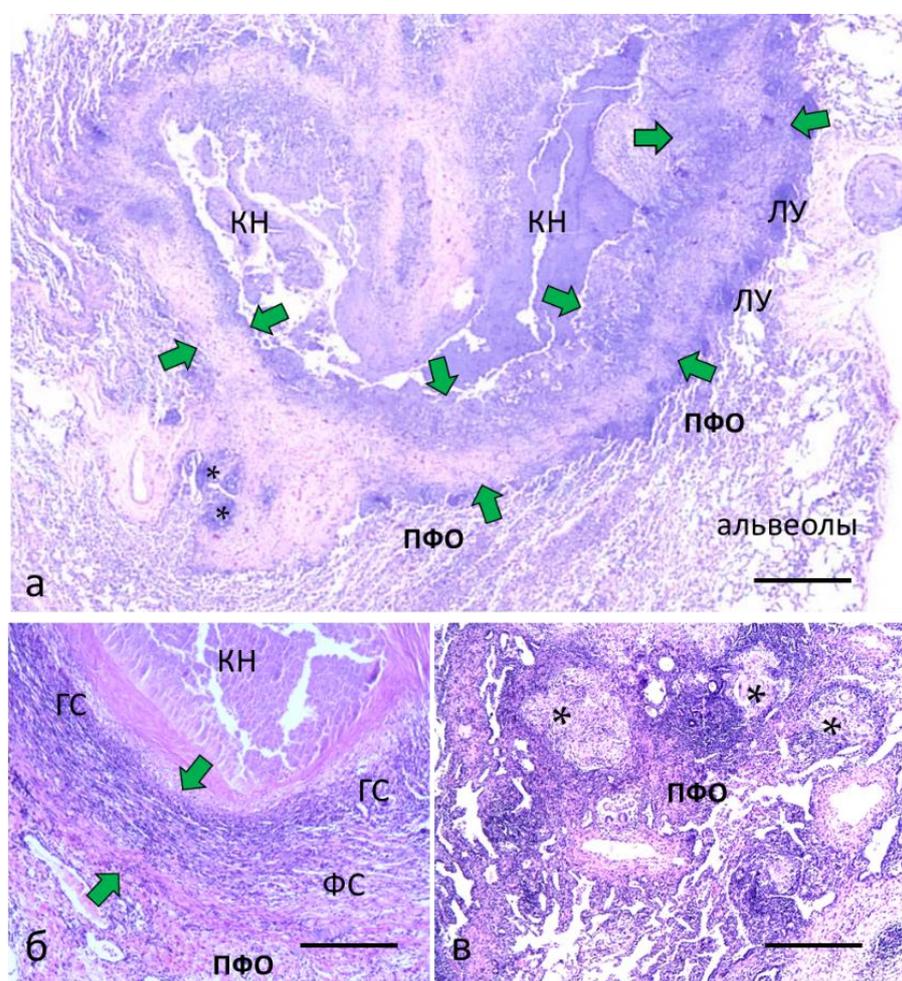


Рис. 19. Туберкулома легкого с признаками высокой активности воспаления. а - общий вид туберкулемы с признаками распада; зеленые стрелки показывают границы капсулы туберкулемы; б – увеличенный фрагмент туберкулемы с грануляционным слоем капсулы и развивающимся фиброзным слоем; в – очаги отсева в перифокальной области туберкулемы (обозначены *). КН – казеозный некроз, ГС – грануляционный слой, ФС – фиброзный слой, Л – лимфоциты. ПФО – перифокальная область туберкулемы. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок: а = 500 мкм; б, в = 100 мкм.

В грануляционном слое определяются многочисленные клетки воспаления, в том числе нейтрофилы. В ПФО наблюдаются многочисленные лимфоидные узелки, также в данной области определяются «очаги отсева» – лимфогематогенные зоны распространения туберкулезной инфекции (рис.19.в).

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.

4.1.2 Экспрессия генов ABC-транспортеров (*P-gp*, *MRP1*, *BCRP*) в перифокальной области туберкулом с умеренной и высокой активностью воспаления

В исследовании, проведенном на образцах выборки 2017-2018 гг с помощью ПЦР в реальном времени проанализировали экспрессию генов основных МЛЮ белков, таких как *P-gp* (ген *ABCB1* или *MDR1*), *MRP1* (ген *ABCC1*) и *BCRP* (ген *ABCG2*).

Наблюдается значительная вариабельность в уровнях экспрессии анализируемых генов: для *ABCB1* 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 *ABCC1* – 0,14 (0,08-0,58) у.е. (рис.20.).

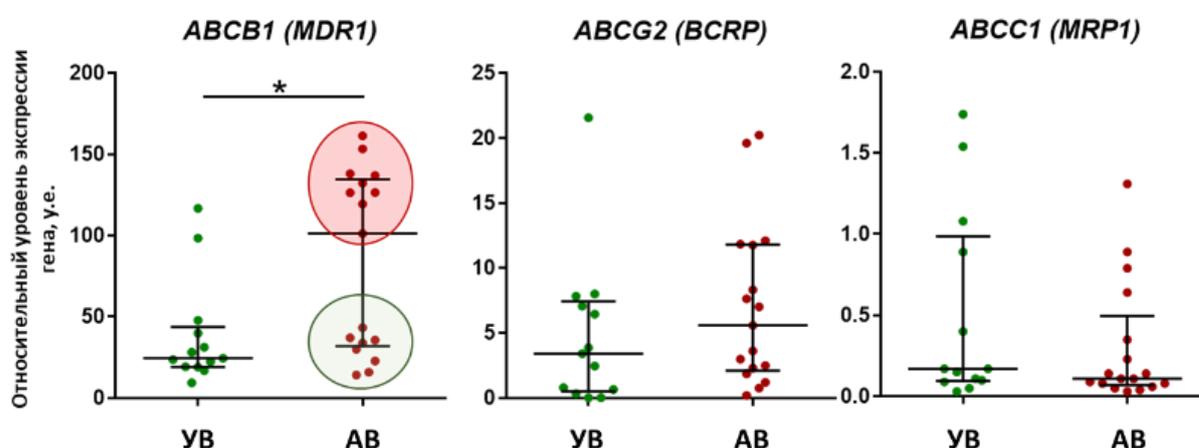


Рис. 20. Относительный уровень экспрессии генов основных белков множественной лекарственной устойчивости в зависимости от активности воспаления в операционном материале легких пациентов с множественными туберкуломами легких.

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

Среди исследованных генов МЛУ белков, только для гена *ABCB1* экспрессия достоверно выше в образцах с высокой активностью (группа «АВ») воспаления ($p = 0,02$) по сравнению с умеренной активностью (группа «УВ»). В группе «АВ» идентифицированы 2 подгруппы с разным уровнем экспрессии *ABCB1*: подгруппа с высокой экспрессией гена (рис. 20, фигура с красной заливкой), значения относительного уровня экспрессии в которой значительно превышают значения в группе «УВ», и подгруппа с низкой экспрессией (рис. 20, фигура с зеленой заливкой), в которой значения относительного уровня экспрессии гена совпадают с таковыми в группе «УВ».

Полученные данные позволяют предположить, что экспрессия *ABCB1* при высокой активности воспаления может зависеть от различных факторов, опосредующих высокую активность воспалительного процесса при ТБ легких. Это предположение было проверено на операционном материале легких больных ТБ, полученном в период 2021-2022 гг. Был проведен корреляционный анализ между экспрессией гена *ABCB1* и следующими тремя группами генов: (i) транскрипционными факторами, регулирующими туберкулезное воспаление, включая *STAT1-3-6*, *SOCS3* и *HIF1a*; (ii) ключевыми цитокинами, регулирующими воспаление при ТБ, такими как *IL6*, *IL10*, *INFg*, *TGFb1*, *TNFa*, *IL1b*; (iii) маркерами провоспалительных (M1) и противовоспалительных (M2) макрофагов, *CD86*, *CD206*, *CD163*, *TGM2*, а также маркерами Т-лимфоцитов *CD3D*, *GZMB* (гранзим В, маркер цитотоксических лимфоцитов).

4.1.3 Анализ экспрессии генов в легких больных ТБ в зависимости от активности воспаления

Относительный уровень экспрессии генов цитокинов, таких как *IL1b*, *TGFb1* и *TNFa*, и маркеров макрофагов *CD86*, *CD163* и *CD206*, выше в перифокальной области туберкулом пациентов группы «АВ», чем в группе с «УВ» (рис.21). Статистически значимых различий в уровнях экспрессии всех остальных исследованных генов не обнаружено.

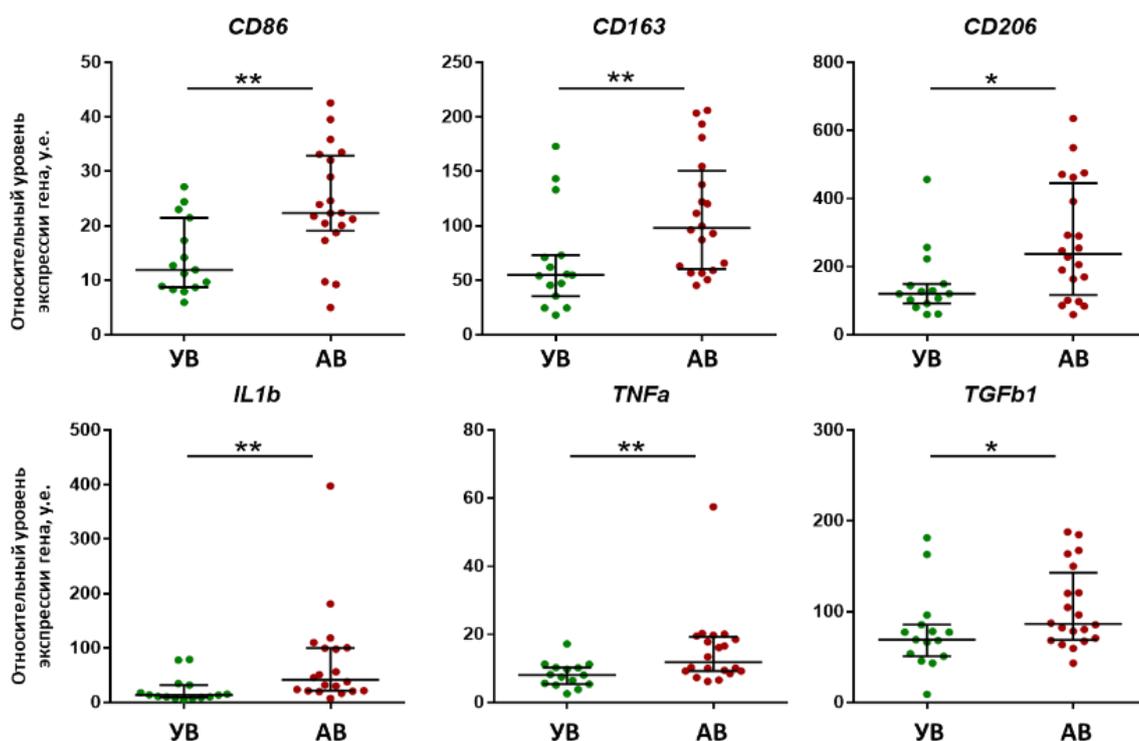


Рис. 21. Статистически значимые различия в уровнях экспрессии генов в перифокальной области туберкулом пациентов с диагнозом «множественные туберкуломы» между образцами с умеренной (УВ) и высокой (АВ) активностью воспаления. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25% и 75%). Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали как $2^{-\Delta Ct} \times 10^4$ и выражали в условных единицах (у.е.). Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

4.1.4 Корреляционный анализ экспрессии генов в легочной ткани больных

Наибольшие значения коэффициентов корреляции экспрессии гена *ABCB1* найдены для генов *STAT3* и *SOCS3* (0,76 и 0,71 соответственно). Сильная корреляция экспрессии *ABCB1* также обнаружена для генов *TGM2* ($r = 0,69$), *HIF1a* ($r = 0,65$) и *IL6* ($r = 0,65$). Экспрессия *ABCB1* имеет положительную умеренную корреляцию со *STAT6* ($r = 0,52$) и умеренно отрицательную с геном интерферона гамма (*INFg*, $r = -0,54$) (рис. 22).

<i>r</i>	ABCB1	HIF1a	IL1b	IL6	IL10	INFg	TNFa	TGFb1	CD86	CD163	CD206	TGM2	STAT1	STAT3	STAT6
ABCB1															
HIF1a	0.65														
IL1b		0.46													
IL6	0.65	0.90	0.46												
IL10		0.69	0.63	0.59											
INFg	-0.54														
TNFa						0.49									
TGFb1							0.56								
CD86			0.65		0.41		0.49								
CD163			0.62			0.55	0.67	0.34	0.76						
CD206							0.47		0.68	0.62					
TGM2	0.68	0.70		0.67		-0.48		0.34		-0.41					
STAT1		0.46		0.49	0.40										
STAT3	0.76	0.78		0.83		-0.55						0.82			
STAT6	0.52							0.60				0.65		0.47	
SOCS3	0.71	0.84		0.82	0.57			0.34				0.72		0.79	0.49
CD3D					0.46	0.55							0.40		
GZMB													0.37		

Рис. 22. Матрица значимых коэффициентов корреляции Спирмена (*r*) между относительными уровнями экспрессии генов в перифокальной области туберкулом легких пациентов. Цвет клеток указывает на достоверные различия: $p < 0,05$ – желтый, $p < 0,01$ – зеленый, $p < 0,001$ – темно-зеленый. Значение коэффициента $r = 0,2-0,39$ – слабая (черный курсив), $0,40-0,59$ – умеренная (черный жирный), $0,6-0,79$ (белый жирный) – сильная и $0,8-1$ (желтый жирный) – очень сильная корреляция.

С помощью иерархического кластерного анализа, основанного на коэффициентах корреляции, идентифицированы 3 больших кластера совместно экспрессируемых генов (рис. 23).

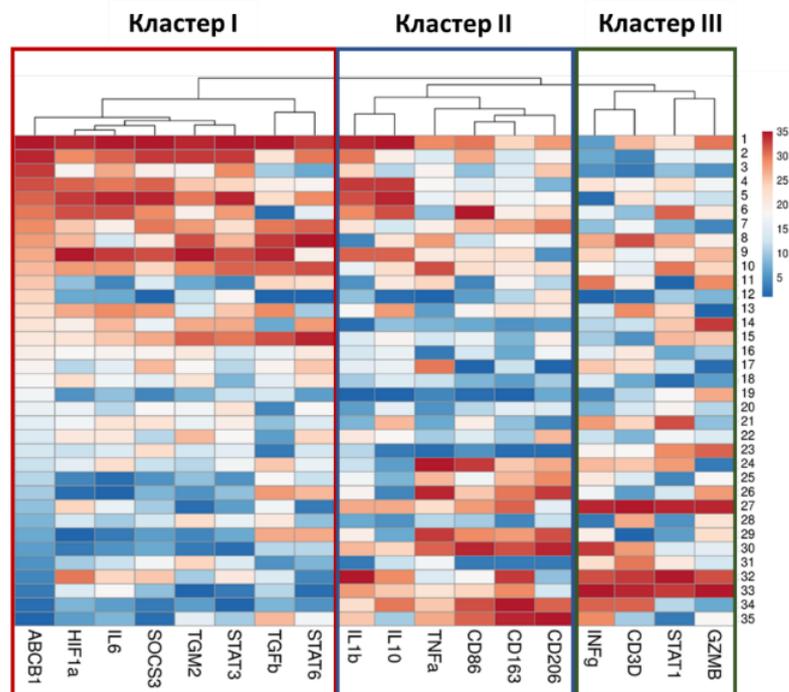


Рис. 23. Тепловая карта коэкспрессии генов в перифокальной области туберкулом легких пациентов. Столбцы сгруппированы с использованием корреляционного расстояния и средней связи. Экспрессия гена *ABCB1* ранжирована в порядке убывания. Трехцветная шкала: синий цвет обозначает низкий, белый – средний, а красный – высокий относительный уровень экспрессии генов. Тепловая карта создана с использованием веб-инструмента ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>).

Кластер I, включающий ген *ABCB1*, содержит преимущественно гены факторов транскрипции, такие как *STAT3*, *SOCS3*, *HIF1a*, ген цитокина *IL6*, а также *TGM2*. Экспрессия гена *IL6* имеет очень сильную корреляцию с *HIF1a* ($r = 0,91$), *STAT3* ($r = 0,83$) и *SOCS3* ($r = 0,82$) и умеренную корреляцию 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 со *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* имеет сильную корреляцию с *TGM2* ($r = 0,65$) и умеренную корреляцию с *ABCB1* ($r = 0,52$) и *STAT3* ($r = 0,47$).

Кластер II включает преимущественно гены макрофагальных маркеров *CD86*, *CD206* и *CD163*, которые наиболее тесно коррелируют с экспрессией гена цитокина *TNFa*. Стоит отметить, что экспрессия гена белка *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 сильно коррелирует с *TNFa* ($r = 0,67$) и *IL1b* ($r = 0,62$). Однако не обнаружено значимой корреляции между экспрессией *IL1b* и *TNFa*. В кластере II гены *IL1b* и *IL10* образуют отдельный подкластер и их экспрессия сильно коррелирует друг с другом ($r = 0,63$). Стоит отметить, что 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 T-лимфоцитов. Экспрессия гена маркера цитотоксических лимфоцитов *GZMB* объединена в один подкластер со *STAT1*, несмотря на то, что между ними выявлена слабая корреляция ($r = 0,37$). *CD3D* и *INFg* умеренно коррелируют друг с другом ($r = 0,55$). Следует отметить, что экспрессия гена *INFg*, 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.

4.1.5 Выявление сигнатур генов, связанных с высокой и низкой экспрессией гена *ABCB1* при высокой активности воспаления

Согласно данным, представленным на тепловой карте, группа «AB» неоднородна по уровням экспрессии генов. В этой группе часть образцов характеризуются преимущественно высокой экспрессией генов из кластера I, а часть – преимущественно

высокой экспрессией генов из кластера II (рис. 24).

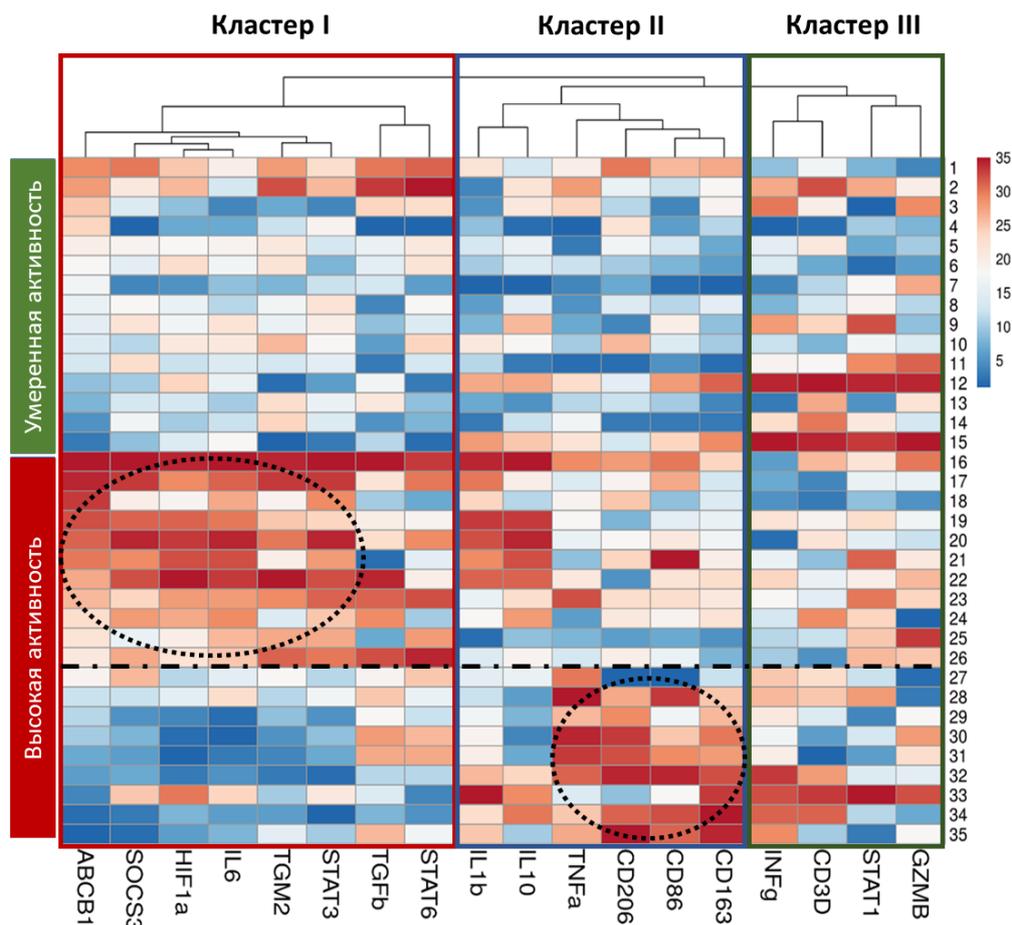


Рис. 24. Тепловая карта, демонстрирующая неоднородность молекулярно-генетических профилей в группе с высокой активностью воспаления. Относительный уровень экспрессии гена *ABCB1* ранжирован в порядке убывания в каждой группе с умеренной и высокой активностью воспаления. Трехцветная шкала: синий цвет обозначает низкий, белый – средний, а красный – высокий относительный уровень экспрессии генов. Эта тепловая карта создана с использованием веб-инструмента ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>).

На основании профиля 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 «АВ-2» – образцы с номерами строк 27–35 ($n = 9$) (рис. 24).

Сравнительный анализ экспрессии генов в Кластере I в этих двух подгруппах в сравнении с группой «УВ» выявил, что медиана относительного уровня экспрессии генов *ABCB1*, *IL6*, *SOCS3*, *STAT3*, *HIF1a* и *TGM2* в подгруппе «АВ-1» выше по сравнению с подгруппой «АВ-2» и группой «УВ». При этом экспрессия этих генов в подгруппе «АВ-2» статистически значимо не отличается от группы «УВ» (рис.25).

Кластер I

Гены	<i>ABCB1</i>	<i>HIF1a</i>	<i>STAT3</i>	<i>SOCS3</i>	<i>TGM2</i>	<i>IL6</i>	<i>STAT6</i>	<i>TGFb</i>
Группы								
УВ	5.58 (4.07 - 12.02)	138.02 (114.90 - 178.59)	123.36 (95.88 - 154.70)	149.89 (91.37 - 247.49)	353.05 (252.54 - 434.80)	2.89 (1.79 - 6.19)	133.13 (91.80 - 156.48)	69.20 (52.3 - 81.95)
АВ_1	29.84*# (16.06 - 44.27)	298.53*# (208.4 - 405.69)	238.02*# (203.98 - 264.79)	680.62*# (379.10 - 1521.7)	599.96*# (452.07 - 749.02)	237.49*# (76.28 - 415.19)	182.24 (140.51 - 227.19)	87.29 (74.85 - 165.51)
АВ_2	3.24# (2.78 - 3.85)	71.05# (59.87 - 114.38)	92.01# (80.71 - 95.54)	50.45# (45.09 - 122.42)	234.71# (186.83 - 274.32)	1.49# (1.02 - 4.28)	142.49 (110.26 - 173.01)	80.43 (70.95 - 104.74)

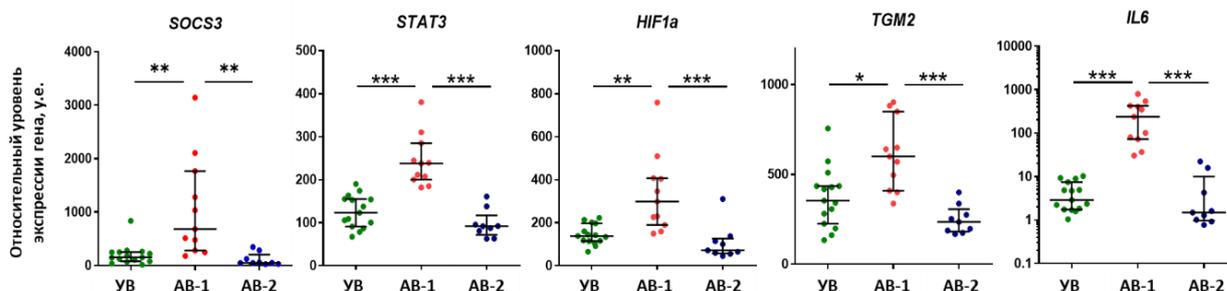
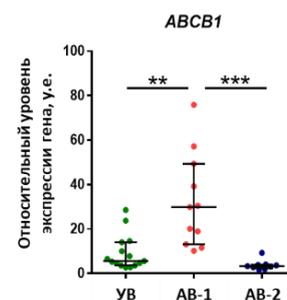


Рис. 25. Анализ экспрессии генов в Кластере I в легких больных туберкулезом с разной активностью воспаления. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25% и 75%). Статистический анализ проводили с использованием критерия Крускала-Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна. На графиках значимые различия: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$. В таблице значимые различия: * – в группе с высокой активностью воспаления (АВ) по сравнению с группой умеренной активности воспаления (УВ), # – между двумя подгруппами АВ-1 и АВ-2 с высокой активностью воспаления, $p < 0,05$.

В Кластере II экспрессия генов *TNFa* и *CD163* в подгруппе «АВ-2» выше, чем в подгруппе «АВ-1» и группе «УВ». При этом экспрессия этих генов в подгруппе «АВ-1» статистически значимо не отличается от группы «УВ» (рис. 26).

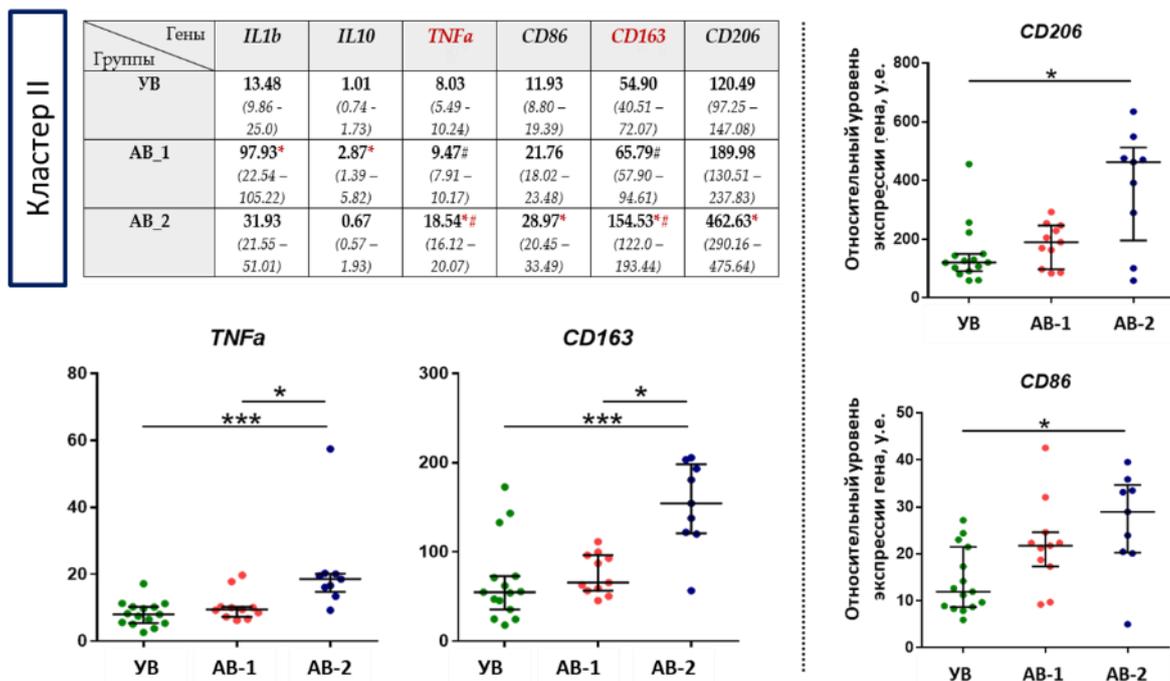


Рис. 26. Анализ экспрессии генов в Кластере II в легких больных туберкулезом с разной активностью воспаления. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25% и 75%). Статистический анализ проводили с использованием критерия Крускала-Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна. На графиках значимые различия: * – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$. В таблице значимые различия: * – в группе с высокой активностью воспаления (АВ) по сравнению с группой умеренной активности воспаления (УВ), # – между двумя подгруппами АВ-1 и АВ-2 с высокой активностью воспаления, $p < 0,05$.

Экспрессия генов *CD86* и *CD206* в подгруппе «АВ-2» достоверно превышает значения в группе с умеренной активностью воспаления (группа «УВ»). Однако статистически значимых различий в экспрессии этих генов между подгруппами «АВ-1» и «АВ-2» не обнаружено.

В Кластере III различия обнаружены только по уровню экспрессии гена *INFg* между подгруппами «АВ-1» и «АВ-2». В то же время различия между этими двумя подгруппами с группой «УВ» не выявлено (рис. 27).

Кластер III

Гены	<i>STAT1</i>	<i>CD3D</i>	<i>GZMB</i>	<i>INFg</i>
УВ	69.39 (44.34 – 94.81)	5.26 (3.95 – 7.61)	23.81 (20.27 – 38.53)	3.16 (2.30 – 5.94)
АВ_1	82.58 (66.80 – 88.66)	4.47 (3.17 – 5.32)	29.64 (22.82 – 33.20)	2.92# (1.80 – 3.64)
АВ_2	52.52 (42.75 – 58.15)	5.79 (3.46 – 6.51)	25.68 (14.98 – 31.77)	5.54# (4.50 – 7.41)

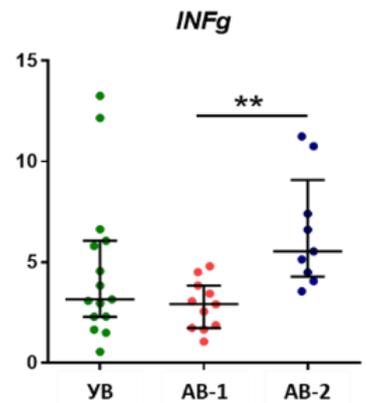


Рис. 27. Анализ экспрессии генов в Кластере III в легких больных туберкулезом с разной активностью воспаления. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25% и 75%). Статистический анализ проводили с использованием критерия Крускала-Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна. На графиках значимые различия: ** – значимые различия в группе с высокой активностью воспаления (АВ) по сравнению с группой умеренной активности воспаления (УВ), $p < 0,01$. В таблице: # – значимые различия между двумя подгруппами АВ-1 и АВ-2 с высокой активностью воспаления, $p < 0,05$.

Таким образом, различия в уровнях экспрессии генов между двумя подгруппами с высокой активностью воспаления в сравнении с группой с умеренной активностью воспаления позволили выявить две разные молекулярно-генетические сигнатуры, связанные с высокой активностью воспаления (рис.28).

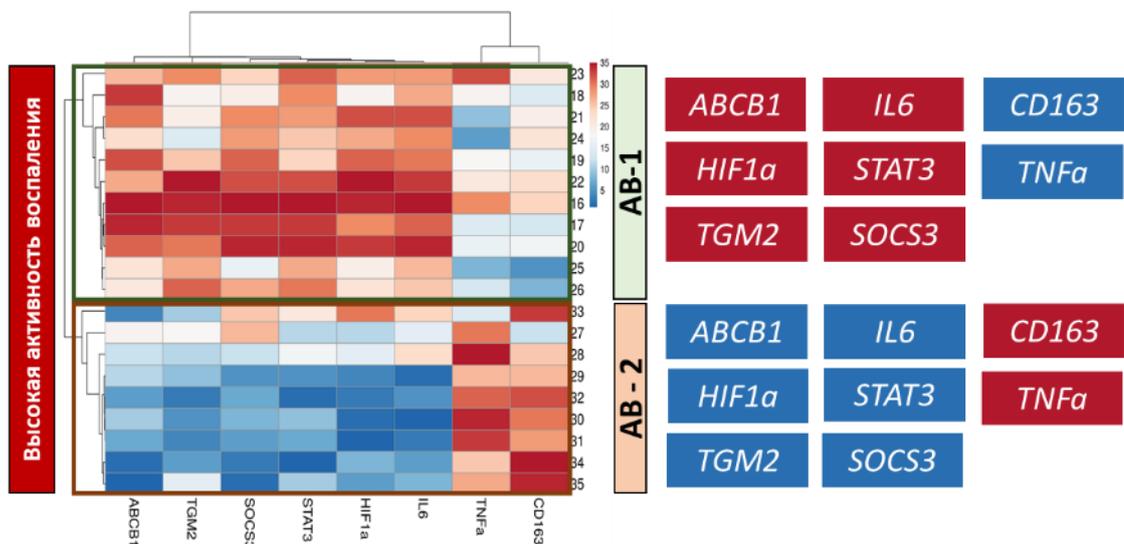


Рис. 28. Молекулярно-генетические сигнатуры экспрессии генов, характерных для каждой из подгрупп с высокой активностью воспаления в легочной ткани больных туберкулезом. Использовалась трехцветная шкала, где синий цвет обозначал низкий, белый – средний, а красный – высокий относительный уровень экспрессии генов. Эта тепловая карта была создана для относительной экспрессии генов с ранговым преобразованием с использованием веб-инструмента ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>).

Первая сигнатура генов включает *ABCB1*, *HIF1a*, *SOCS3*, *STAT3*, *IL6* и *TGM2*, а вторая – включает *CD163* и *TNFa*. При высокой активности воспаления в перифокальной области туберкулом пациентов преобладает либо одна, либо другая сигнатура.

4.2 Влияние бедаквилина и рифампицина, инкапсулированного в полимер молочной кислоты, на функциональную активность P-gr

Для определения субстратной специфичности рифампицина, инкапсулированного в полимер молочной кислоты (RIF-PLLA), и бедаквилина (BDQ) мы использовали тест на выброс родамина 123. Тест был проведен на клеточной линии K562/IS9 с гиперэкспрессией P-gr. Такие клеточные линии являются традиционным модельными объектами для тестирования функциональной активности P-gr с целью скрининга возможных субстратов и ингибиторов данного транспортёра (Zahra et al., 2020).

4.2.1 Влияние рифампицина, инкапсулированного в полимер молочной кислоты, на функциональную активность P-gr

RIF-PLLA был разработан в НИИ Молекулярной и персонализированной медицины. Согласно данным разработчика, средний размер наночастиц, измеренный с использованием метода автокорреляционной спектроскопии, равен 378 ± 84 нм. Доля RIF составляет 8–10% по массе. Согласно нашим данным, полученным методом СЭМ, размер наночастиц более вариабелен и находится преимущественно в диапазоне 50 – 400 нм (рис.27.А).

В отличие от RIF, проникающего в клетки путем диффузии, лекарственные препараты в составе PLLA интернализуются в клетки посредством эндоцитоза/фагоцитоза в зависимости от размера наночастиц, где они быстро покидают эндолизосомы и попадают в цитоплазму в течение 10 минут после инкубации, высвобождая лекарственное средство (Lee et al., 2016). Инкапсулирование RIF в PLLA как раз и предполагало, что с одной стороны RIF не будет взаимодействовать с P-gr, а с другой – наночастицы могут активировать фагоцитоз, что может приводить к изменению функциональной активности P-gr.

Согласно данным электронной микроскопии (рис.29.Г) при краткосрочной инкубации с RIF-PLLA происходит изменение морфологии мембраны клеток, появление многочисленных складок, что свидетельствует об активации клеточной поверхности, вызванной фагоцитозом наночастиц, в отличие от RIF (рис.29.В).

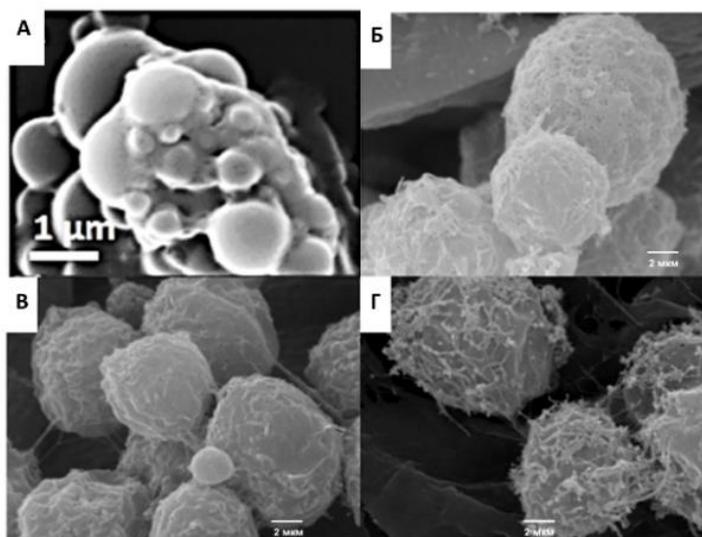


Рис. 29. А – Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) рифампицина, инкапсулированного в полимер молочной кислоты. Б – Г – СЭМ клеток K562/IS9 после 30 минутной инкубации с препаратами: Б – контроль без препаратов, В – 10 мкг/мл рифампицина, Г – 100 мкг/мл рифампицина, инкапсулированного в полимер молочной кислоты. Масштабный отрезок: А – 1 мкм, Б – Г – 2 мкм.

Через 30 минут после окрашивания родамином 123 интенсивность флуоресценции в клетках снижается в среднем до $12,5 \pm 8,13$ (%) от уровня накопления красителя в присутствии 22 мкМ винбластина (принят за 100%), что свидетельствует о высокой активности выброса родамина 123 во внеклеточную среду.

Значения факторов ингибирования функциональной активности P-гр под воздействием RIF в концентрации 10 мкг/мл, RIF-PLLA в концентрации 100 мкг/мл (содержит приблизительно 10 мкг/мл рифампицина) и PLLA (100 мкг/мл) приведены ниже (таблица 5).

Таблица 5. Значения фактора ингибирования активности P-гр в клетках K562/IS9 под воздействием различных препаратов

ФИА _{P-гр} в клеточной линии K562/IS9			
Среда (выброс)	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-гр} = средние значения фактора ингибирования активности P-гр ± 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 (One-Way ANOVA) в сравнении с выбросом родамина 123 в отсутствие препаратов, $p < 0,05$.

Все исследованные препараты оказывают статистически значимое ингибирование

функциональной активности P-gp. При этом ФИА_{P-gp} под воздействием RIF-PLLA почти в 2 раза выше, чем ФИА_{P-gp} при действии только PLLA. Таким образом, RIF-PLLA оказывает выраженное ингибирование функциональной активности P-gp по сравнению со свободным RIF или PLLA.

4.2.2 Влияние бедаквилина на функциональную активность P-gp

Для ответа на вопрос – влияет ли BDQ на функциональную активность P-gp и может ли он быть субстратом P-gp – проанализирован выброс родамина 123 клетками K562/IS9 в присутствии различных концентраций данного антибиотика. Репрезентативная гистограмма выброса родамина 123 дана в присутствии как «терапевтической» концентрации препарата 5 мкг/мл, так и более высоких концентраций – 10, 25 и 50 мкг/мл, в сравнении с терапевтической концентрацией RIF и приведена на рисунке ниже (рис. 30).

BDQ в концентрациях 5 и 10 мкг/мл слабо влияет на интенсивность флуоресценции выброса родамина 123 (рис. 30, желтая и оранжевая гистограммы). Концентрации препарата 25 и 50 мкг/мл снижает выброс родамина 123 более выражено (рис. 30, красная и фиолетовая гистограммы), но в меньшей степени, чем RIF при действии терапевтической концентрации в 10 мкг/мл (рис. 30, голубая гистограмма).

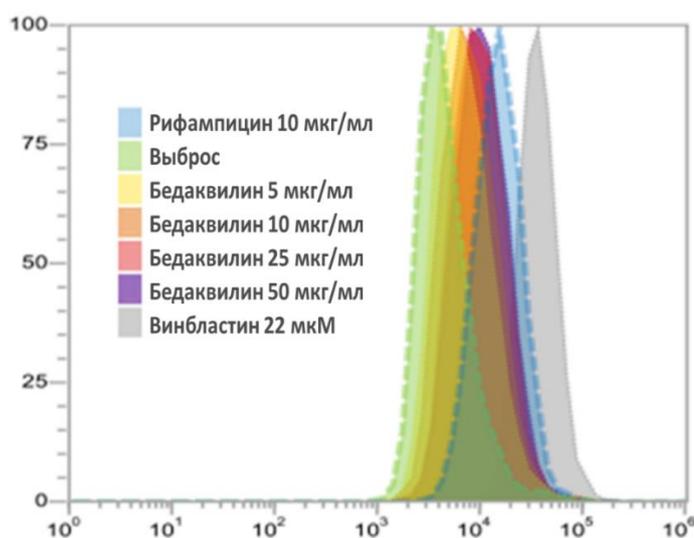


Рис. 30. Репрезентативная гистограмма влияния различных концентраций бедаквилина на активность P-gp (выброс родамина 123) по сравнению с рифампицином в клеточной линии K562/IS9. По вертикальной оси – число событий, по горизонтальной оси – интенсивность флуоресценции родамина 123 в канале FITC.

Значения ФИА_{P-gp} под воздействием различных концентраций BDQ в сравнении с RIF 10 мкг/мл приведены в Таблице 6.

Таблица 6. 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 (One-Way ANOVA) в сравнении с выбросом родамина 123 в отсутствии препаратов, $p < 0,05$.

Ингибирующий эффект BDQ на функциональную активность P-гр проявляется только в высокой концентрации, в 10 раз превышающих терапевтическую, по сравнению с RIF, когда ингибирующий эффект проявляется уже при «терапевтической» концентрации препарата равной 10 мкг/мл. Также, согласно данным проточной цитометрии, BDQ в исследованных концентрациях не оказывает влияния на выработку реактивных форм кислорода.

Это может свидетельствовать о том, что BDQ обладает более слабой субстратной специфичностью к P-гр в сравнении с RIF.

4.3 Влияние противотуберкулезных препаратов на экспрессию гена *ABCBI* в макрофагах человека

Ранее нами было показано, что RIF в терапевтических концентрациях в дифференцированных макрофагах вызывает индукцию гена *ABCBI*, но не оказывает влияния на уровень белка на мембране клеток или функциональную активность P-гр (Павлова и др., 2022). В данной серии экспериментов мы добавляли терапевтические концентрации антибиотиков при макрофагальной дифференцировке моноцитов THP-1 совместно с форболовым эфиром. Анализ экспрессии гена *ABCBI* проводился на 3 и 7 сутки дифференцировки. Относительный уровень экспрессии (RQ) гена *ABCBI* в контрольных клетках принят за 1. После культивирования с RIF относительный уровень экспрессии гена на 3 сутки равен $1,228 \pm 0,057$ и $1,234 \pm 0,06$ на 7 сутки (рис. 31).

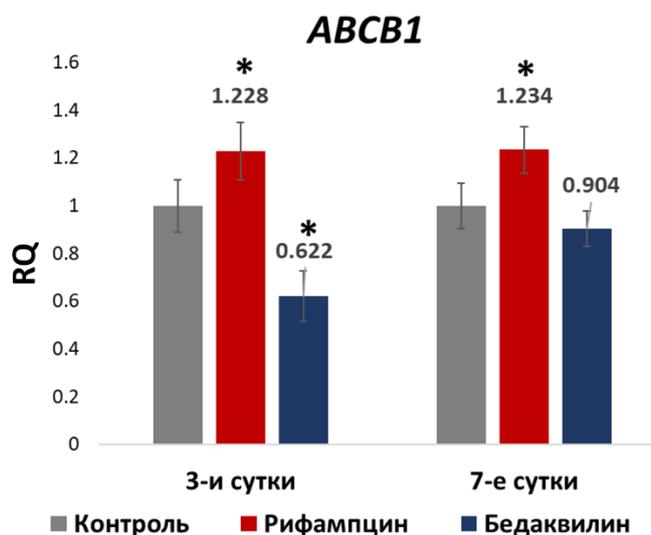


Рис. 31. Влияние бедаквилина и рифампицина на экспрессию гена *ABCB1*. * – различия в сравнении с контролем статистически значимы (One Way ANOVA) при $p < 0,05$. Данные представлены как среднее значения относительного уровня экспрессии гена (RQ) и SD, RQ в контроле принят за 1, $n = 5$.

Увеличение экспрессии гена *ABCB1* при действии RIF является статистически значимым. Таким образом, присутствие терапевтических концентраций RIF в процессе макрофагальной дифференцировки увеличивает экспрессию гена белка P-гр. Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными, показавшими увеличение экспрессии гена *ABCB1* под воздействием RIF в 1,7 раза в уже дифференцированных макрофагах (Павлова и др., 2022).

BDQ оказывает иной эффект: относительный уровень экспрессии гена *ABCB1* статистически значимо снижается при действии терапевтической концентрации BDQ на 3 сутки макрофагальной дифференцировки ($0,62 \pm 0,11$), но не отличается от контроля на 7 сутки ($0,90 \pm 0,07$).

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

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

Рядом исследователей было показано, что ингибирование P-гр снижает секрецию некоторых цитокинов из клеток. Это позволило предположить, что P-гр либо сам является транспортёром цитокинов, либо влияет на механизмы их транспорта из иммунных клеток (Drach et al., 1996; Pawlik et al., 2005). В данной работе мы сравнили профили экспрессии генов провоспалительных цитокинов TNF α , IL1 β , IL6 и противовоспалительного цитокина IL10 и уровни их секреции под воздействием VER на разных сроках макрофагальной

дифференцировки (ранние сроки или 3 сутки и поздние сроки или 7 сутки).

4.4.1 Влияние фармакологического ингибирования P-гp на экспрессию и секрецию цитокинов в макрофагах THP-1 в процессе их дифференцировки

Анализ экспрессии генов показал, что в процессе макрофагальной дифференцировки на 7 сутки, по сравнению с 3 сутками, 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 *TNFa*, а *IL6* – остаётся на прежнем уровне (рис. 32.А).

Анализ секреции цитокинов показал, что на 7 сутки дифференцировки, по сравнению с 3-ми, увеличивается уровень секреции *IL1b* 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 *TNFa* возрастает незначительно: с $902,15 \pm 123,94$ до $1137,98 \pm 93,24$ пг/мл (рис. 32.Б).

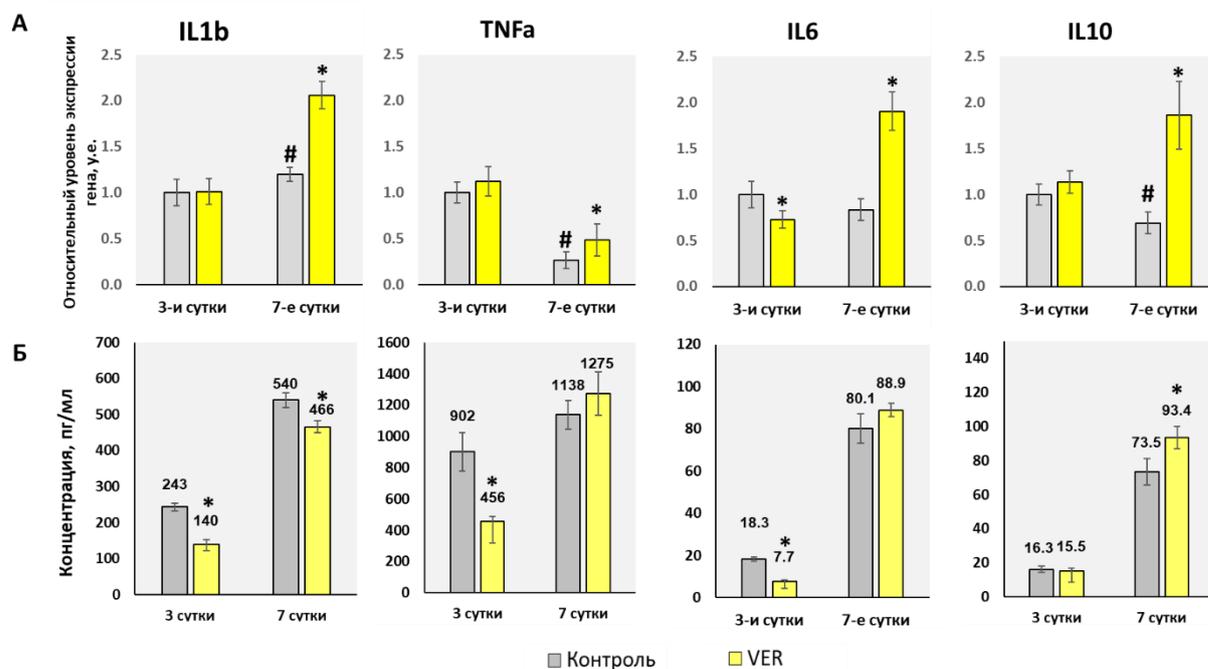


Рис. 32. Влияние фармакологического ингибирования на (А) экспрессию генов и (Б) секрецию цитокинов в макрофагах THP-1 в процессе дифференцировки (3 и 7 сутки). Относительный уровень экспрессии генов цитокинов в контроле на 3 сутки макрофагальной дифференцировки принят за 1. VER – верапамил. Статистически значимые (t-критерий Стьюдента) различия при $p < 0,05$ * – по сравнению с контролем на соответствующие сутки дифференцировки, # – между 3 и 7 сутками. Данные представлены как среднее и SD, $n = 4$.

При фармакологическом ингибировании P-гp на ранних сроках макрофагальной дифференцировки статистически значимо снижается уровень экспрессии только гена *IL6* ($0,73 \pm 0,09$) по сравнению с контролем, который принят за 1 (рис. 32.А).

На 7 сутки, напротив, увеличивается экспрессия всех исследованных генов цитокинов по сравнению с контролем: *IL1b* в 1,72 раза, *TNFa* в 1,83, *IL6* в 2,28 и *IL10* в 2,70. (рис. 32.А.). При этом экспрессия гена противовоспалительного цитокина *IL10* повышается в большей степени, по сравнению с экспрессией генов провоспалительных цитокинов.

Анализ секреции цитокинов показал, что под воздействием VER количество секретируемого *IL1b*, *TNFa* и *IL6* на ранних сроках макрофагальной дифференцировки снижается по сравнению с контролем: *IL1b* (с $243,23 \pm 11,30$ до $139,89 \pm 12,86$ пг/мл), *TNFa* (с $902,15 \pm 123,94$ до $465,76 \pm 30,75$ пг/мл), *IL6* (с $18,3 \pm 1,99$ до $7,7 \pm 0,76$ пг/мл). Секреция *IL10* под воздействием VER не отличается от контроля ($15,5 \pm 1,43$ и $16,3 \pm 1,95$ пг/мл соответственно).

Несмотря на то, что под воздействием VER на 7 сутки макрофагальной дифференцировки повышается экспрессия генов провоспалительных цитокинов, уровень секретируемого *IL1b* (466 ± 17 пг/мл) снижен по сравнению с контролем (540 ± 26 пг/мл), в то время как уровни *TNFa* ($1148 \pm 113,5$ пг/мл) и *IL6* ($88,9 \pm 3,25$ пг/мл) не отличаются от контроля (1138 ± 93 и 80 ± 7 пг/мл соответственно). При этом секреция цитокина *IL10* (93 ± 7 пг/мл) превышает значения в контроле ($73,5 \pm 7,9$ пг/мл). Данные об увеличении уровня секреции *IL10* на 7 сутки дифференцировки ТНР-1 макрофагов под воздействием VER соотносятся с данными об увеличении уровня экспрессии гена.

Таким образом, фармакологическое ингибирование Р-гр VER на ранних сроках дифференцировки снижает уровень секретируемых провоспалительных цитокинов по сравнению с контролем, не оказывая влияния на уровень экспрессии их генов (за исключением *IL6*). На поздних сроках, напротив, возрастает экспрессия генов всех провоспалительных цитокинов, но при этом не увеличивается их секреция. В то же время на поздней стадии макрофагальной дифференцировки увеличивается как экспрессия гена, так и секреция провоспалительного цитокина *IL10* по сравнению с контролем.

Таким образом, эффект фармакологического ингибирования Р-гр на экспрессию генов и секрецию цитокинов зависит от срока макрофагальной дифференцировки. Сопоставление уровней экспрессии генов соответствующих цитокинов с их секрецией позволяет предположить, что фармакологическое ингибирование Р-гр препятствует секреции всех анализируемых провоспалительных цитокинов в процессе дифференцировки макрофагов ТНР-1. На ранних сроках этот эффект выражен для всех трёх провоспалительных цитокинов, а на поздних сроках – в первую очередь для *IL1b*. Отсутствие возрастания уровня секреции *TNFa* и *IL6* на этом сроке на фоне возросшей экспрессии их генов, также может свидетельствовать об ингибировании их секреции.

4.4.2 Влияние фармакологического ингибирования P-gr на экспрессию генов и секрецию цитокинов в макрофагах человека под воздействием рифампицина

В данном разделе мы поставили два вопроса:

1. Как RIF в терапевтической концентрации влияет на иммунные свойства макрофагов при их дифференцировке?
2. Будет ли фармакологическое ингибирование P-gr влиять на иммуномодулирующие эффекты RIF?

На ранних сроках макрофагальной дифференцировки RIF снижает экспрессию всех анализируемых генов, по сравнению с контролем (RQ, принят за 1): $IL1b = 0,78 \pm 0,1$; $IL6 = 0,38 \pm 0,1$; $TNFa = 0,59 \pm 0,18$; $IL10 = 0,66 \pm 0,09$ (рис. 33.A). На поздних сроках дифференцировки этот эффект сохраняется только для провоспалительных цитокинов: $IL1b = 0,73 \pm 0,11$; $IL6 = 0,37 \pm 0,06$; $TNFa = 0,76 \pm 0,11$ (рис. 33.A).

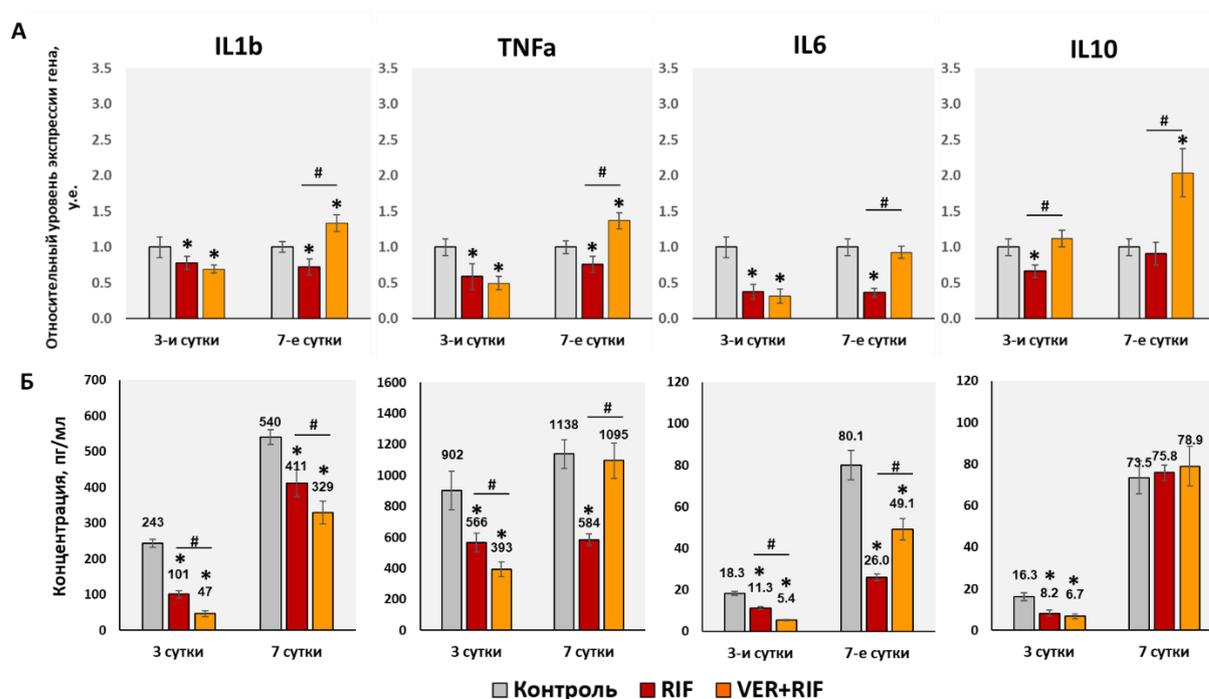


Рис. 33. Влияние фармакологического ингибирования P-gr на (А) экспрессию генов и (Б) секрецию цитокинов в макрофагах ТНР-1 под воздействием рифампицина. Относительный уровень экспрессии генов в контроле на 3 и 7 сутки макрофагальной дифференцировки принят за 1. Статистически значимые (One Way ANOVA) различия при $p < 0,05$ * – по сравнению с контролем, # – между RIF (рифампицин) и VER+RIF (R-верапамил и рифампицин). Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n = 4$.

Анализ секреции цитокинов показал, что RIF снижает не только экспрессию генов, но и секрецию провоспалительных цитокинов на всех сроках макрофагальной дифференцировки клеток ТНР-1, а IL10 – только на 3 сутки (рис. 33.Б), т.е. динамика изменения экспрессии генов и секреции цитокинов при действии RIF совпадают.

Если анализировать эффекты RIF при фармакологическом ингибировании P-гр VER, то на 3 сутки дифференцировки VER не оказывает дополнительного влияния на снижение экспрессии генов провоспалительных цитокинов, которые наблюдаются при действии RIF: уровни экспрессии генов сопоставимы для *IL1b* ($0,78 \pm 0,09$ под воздействием RIF и $0,69 \pm 0,06$ при совместной инкубации RIF и VER), *TNFa* ($0,59 \pm 0,18$ и $0,50 \pm 0,09$), *IL6* ($0,38 \pm 0,10$ и $0,31 \pm 0,10$) (рис.33.А.). Для противовоспалительного цитокина IL10 фармакологическое ингибирование P-гр отменяет эффект снижения экспрессии гена, которое было выявлено при действии только RIF и уровень экспрессии гена возвращается к контрольным значениям ($0,66 \pm 0,09$ и $1,12 \pm 0,12$ соответственно).

При этом на 3 сутки VER усиливает эффекты RIF на секрецию провоспалительных цитокинов: секреция IL1b, IL6 и TNFa статистически значимо ниже по сравнению с только действием RIF (рис. 33.Б).

На поздних сроках макрофагальной дифференцировки при совместной инкубации VER и RIF происходит увеличение экспрессии генов всех исследованных цитокинов по сравнению с только RIF, т.е. происходит отмена эффекта действия RIF. При этом уровни экспрессии генов *IL1b*, *TNFa* и *IL10* превышают контрольные значения: *IL1b* = $1,33 \pm 0,12$, *TNFa* = $1,37 \pm 0,11$ и *IL10* = $2,04 \pm 0,33$. На этом же сроке при совместной инкубации VER с RIF увеличивается уровень секреции TNFa и IL6, по сравнению с только RIF: уровень TNFa достигает контрольных значений (1095 ± 113 пг/мл), а уровень IL6 остается сниженным, по сравнению с контролем (49 ± 5 пг/мл и 80 ± 7 пг/мл соответственно). Секреция IL1b ещё больше снижается (с 411 ± 37 до 329 ± 32 пг/мл), а IL10 – остаётся без изменений (рис. 33).

Таким образом, под воздействием терапевтической концентрации RIF наблюдается снижение экспрессии генов и секреции всех анализируемых провоспалительных цитокинов на всех исследованных сроках макрофагальной дифференцировки, т.е. терапевтическая концентрация RIF влияет на функциональные свойства макрофагов и оказывает противовоспалительное действие. Фармакологическое ингибирование P-гр усиливает противовоспалительные эффекты RIF на ранних сроках макрофагальной дифференцировки, но на поздних сроках дифференцировки – частично их отменяет.

4.4.3 Влияние фармакологического ингибирования на экспрессию генов и секрецию цитокинов в макрофагах человека под воздействием бедаквилина

Если о противовоспалительных эффектах RIF известно, то свойства BDQ на макрофаги только начинают изучать. В данной работе мы поставили задачу проанализировать эффекты BDQ на провоспалительные свойства макрофагов человека и выяснить, каким образом фармакологическое ингибирование P-гр будет влиять на обнаруженные эффекты

BDQ.

На ранних сроках дифференцировки под воздействием BDQ 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 (RQ, принят за 1). На 7 сутки уровни экспрессии генов *TNF-a* и *IL6* значительно повышаются – в 2,4 и 5,24 раз соответственно по сравнению с контролем, а *IL10* – в 3,10 раза (рис.34.A). Это свидетельствует о том, что BDQ является ингибитором экспрессии провоспалительных генов *IL1b* и *IL6* на ранних сроках макрофагальной дифференцировки и индуктором экспрессии генов *TNF-a*, *IL6* – на поздних сроках дифференцировки. По отношению к гену противовоспалительного цитокина *IL10* BDQ выступает в качестве индуктора его экспрессии на всех сроках макрофагальной дифференцировки.

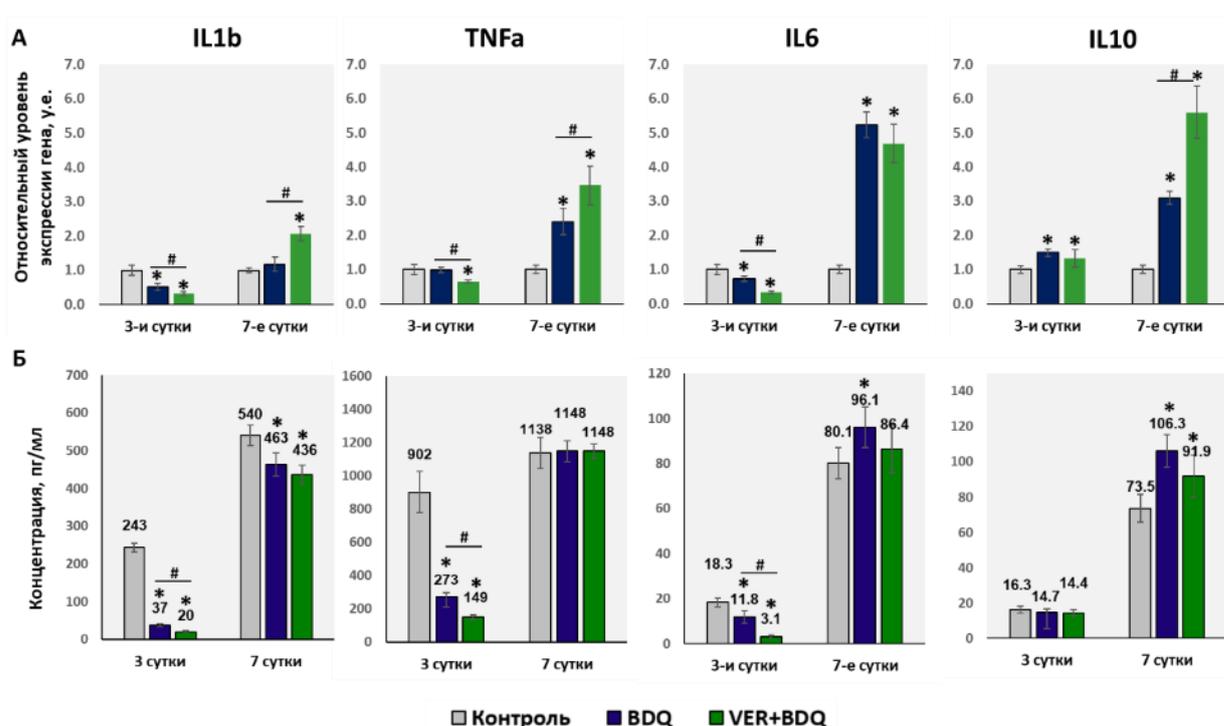


Рис. 34. Влияние фармакологического ингибирования Р-гр на (А) экспрессию генов и (Б) секрецию цитокинов в макрофагах ТНР-1 под воздействием бедаквилина. Относительный уровень экспрессии генов в контроле на 3 и 7 сутки макрофагальной дифференцировки принят за 1. * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$). # – статистически значимые различия между бедаквилином (BDQ) и R-верапамилом и бедаквилином (VER+BDQ). Данные представлены как среднее и SD по результатам 4-ех повторов.

Уровни секреции провоспалительных цитокинов на ранних сроках макрофагальной дифференцировки снижается под воздействием BDQ: *IL1b* с 243 ± 11 до $37 \pm 3,8$ пг/мл; *IL6* – с $18,3 \pm 2$ до $11,8 \pm 2,7$ пг/мл; *TNFa* с 902 ± 124 до 273 ± 24 пг/мл. Секреция *IL10* не изменяется, несмотря на индукцию экспрессии его гена. На поздних сроках дифференцировки по сравнению с контролем под воздействием BDQ в макрофагах уровень

секреции IL1b ниже, чем в контроле ($463 \pm 30,4$ и $540 \pm 26,3$ пг/мл соответственно), секреция TNFa не отличается от контроля ($1148 \pm 61,5$ и $1138 \pm 93,2$ пг/мл), а секреция IL6 незначительно, но статистически значимо, превышает контрольные значения (96 ± 9 и 80 ± 7 пг/мл) (рис.34.Б.).

Таким образом, BDQ оказывает различные эффекты на макрофаги THP-1 в зависимости от стадии их дифференцировки. На ранних сроках BDQ проявляет выраженный противовоспалительный эффект, проявляющийся как в снижении экспрессии генов, так и секреции провоспалительных цитокинов.

При совместной инкубации VER с BDQ на 3 сутки макрофагальной дифференцировки уровни экспрессии генов цитокинов *IL1b*, *TNFa* и *IL6* статистически значимо ниже, чем при инкубации макрофагов только с BDQ, т.е. VER усиливает эффект BDQ. Но на 7 сутки при совместной инкубации BDQ с VER, наоборот, наблюдается увеличение относительных уровней экспрессии генов цитокинов *IL1b* (с $1,18 \pm 0,02$ до $2,07 \pm 0,21$) и *TNFa* (с $2,40 \pm 0,24$ до $3,47 \pm 0,38$) по сравнению с BDQ, а уровень экспрессии *IL10* увеличивается почти в 2 раза (с $3 \pm 0,18$ до $5,60 \pm 0,76$) (рис. 34.А).

При этом уровни секреции провоспалительных цитокинов на 3 сутки повторяют динамику изменения экспрессии их генов и статистически значимо снижаются, по сравнению с действием только BDQ: IL1b с $36,70 \pm 3,7$ до $19,65 \pm 2,6$ пг/мл; TNFa с 272 ± 24 до $149,4 \pm 15$ пг/мл; IL6 с $11,8 \pm 2,7$ до $3,1 \pm 0,79$ пг/мл (рис. 34.А). Т.е. фармакологическое ингибирование P-гр усиливает противовоспалительный эффект BDQ на ранних сроках макрофагальной дифференцировки. На 7 сутки дифференцировки фармакологическое ингибирование P-гр статистически значимо не влияет на эффекты BDQ.

Таким образом, фармакологическое ингибирование P-гр усиливает противовоспалительное действие BDQ на раннем сроке дифференцировки макрофагов THP-1 и не влияет на позднем сроке.

4.4.4 Влияние фармакологического ингибирования на экспрессию фагоцитарных рецепторов в макрофагах THP-1 при действии рифампицина и бедаквилина

В процессе макрофагальной дифференцировки THP-1, индуцированной 100 нМ форболового эфира, возрастает фагоцитарная активность клеток (рис. 35). Если на 1 сутки дифференцировки процент клеток, фагоцитирующих карбоксилатные латексные частицы, равен $25 \pm 4,5\%$, то к 3 суткам он составляет $75 \pm 5\%$, а к 7 суткам – $85 \pm 1,5\%$. Но при этом к 7 суткам макрофагальной дифференцировки существенно увеличивается фагоцитарное число – количество фагоцитированных частиц на клетку. Если на 3 сутки дифференцировки среднее количество поглощенных частиц на клетку равно 6,62, то на 7 сутки – 30,59.

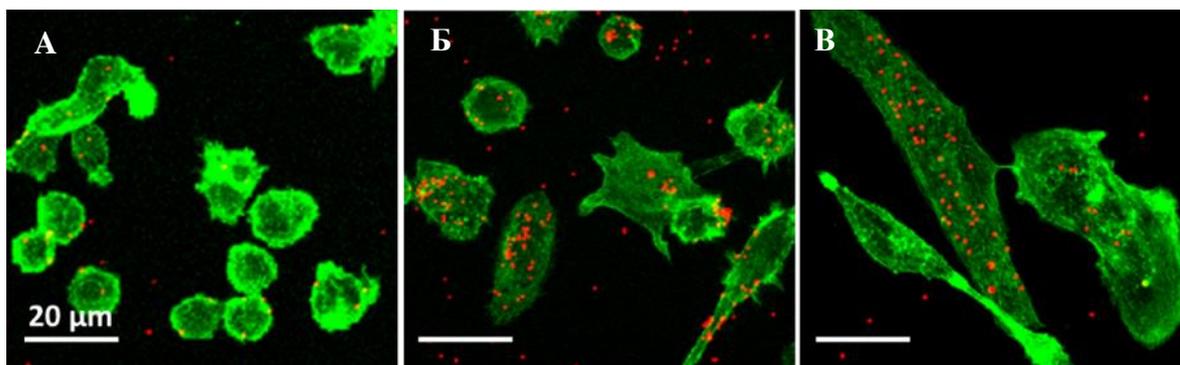


Рис. 35. Фагоцитарная характеристика макрофагов ТНР-1. А – 1 сутки; Б – 3 сутки, В – 7 сутки. Красный цвет – карбоксилатные латексные частицы, конъюгированные с TRITC; зеленый цвет – актиновые микрофиламенты, окрашенные FITC-фаллоидином. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок – 20 мкм.

В зависимости от поляризации макрофагов будут преобладать разные рецепторы фагоцитоза: в М1-макрофагах это CD64 (Fc-рецептор к IgG с высокой аффинностью), в М2-макрофагах – CD206 (рецептор к маннозе) и от этого будет зависеть активность рецепторного фагоцитоза.

В выбранной нами модели макрофагальной дифференцировки макрофаги характеризуются высоким уровнем экспрессии гена *CD64* и высокой активностью фагоцитоза опсонизированных IgG латексных частиц, а также крайне низким уровнем экспрессии гена маннозного рецептора *CD206*, по сравнению с геном другого лектинового рецептора *CD209*, присутствующего на поверхности как макрофагальных, так и дендритных клеток. Несмотря на то, что нам не удалось обнаружить *CD206* и *CD209* на поверхности ТНР-1 макрофагов с помощью метода проточной цитометрии, клетки фагоцитировали опсонизированные маннаном частицы. При этом активность фагоцитоза данных частиц возрастала к 7 сутками дифференцировки по сравнению с 3 сутками, а также была выше, чем неопсонизированных частиц (конститутивный фагоцитоз) (Ерохина и др., 2020; Курынина и др, 2018). Также нами был разработан метод количественного анализа активности рецепторного фагоцитоза с помощью проточной цитометрии с визуализацией, с помощью которого была подтверждена высокая активность рецепторного фагоцитоза IgG-опсонизированных частиц в макрофагах ТНР-1 (Pavlova et al., 2023).

В выбранной экспериментальной модели нам не удалось обнаружить изменений в уровнях экспрессии гена *CD206*, в отличие от *CD209*, под воздействием всех исследуемых препаратов. Фармакологический ингибитор P-gr VER на ранних сроках макрофагальной дифференцировки незначительно увеличивает экспрессию *CD209* по сравнению с контролем ($RQ=1,86\pm 0,49$), в то время как RIF не оказывает влияния на экспрессию генов фагоцитарных рецепторов на всех сроках макрофагальной дифференцировки (рис. 36).

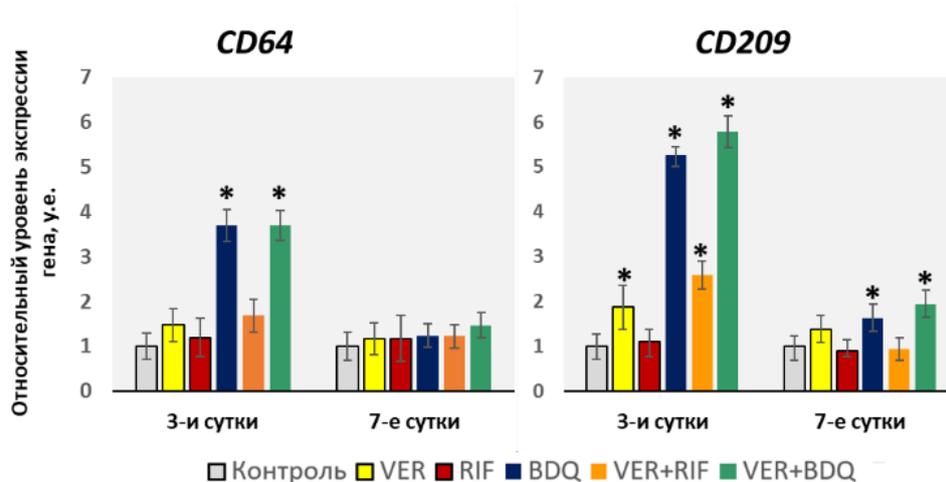


Рис. 36. Влияние фармакологического ингибирования P-гp на уровень экспрессии генов фагоцитарных рецепторов в THP-1 макрофагах под воздействием бедаквилина и рифампицина.

RIF – рифампицин, BDQ – бедаквилин, VER – R-верапамил. Относительный уровень экспрессии генов в контроле на 3 и 7 сутки макрофагальной дифференцировки принят за 1. * – статистически значимые отличия (One Way ANOVA) от контроля ($p < 0.05$). Данные представлены как среднее и SD по результатам 4-ех повторов.

На ранних сроках макрофагальной дифференцировки BDQ значительно увеличивает относительные уровни экспрессии генов *CD64* и *CD209* ($3,70 \pm 0,48$ и $5,26 \pm 0,40$ соответственно). На поздних сроках макрофагальной дифференцировки сохраняется повышенный уровень экспрессии *CD209* относительно контроля, но в гораздо меньшей степени ($1,63 \pm 0,31$). Это позволило предположить, что под воздействием BDQ может возрасти активность рецепторного фагоцитоза.

Действительно, анализ фагоцитарной активности THP-1 макрофагов показал, что BDQ усиливает фагоцитоз IgG-опсонизированных латексных частиц на ранних сроках макрофагальной дифференцировки, а на поздних сроках сохраняется повышенная активность фагоцитоза IgG-опсонизированных частиц, но при этом также достоверно увеличивается активность фагоцитоза опсонизированных D-маннаном частиц (рис. 37).

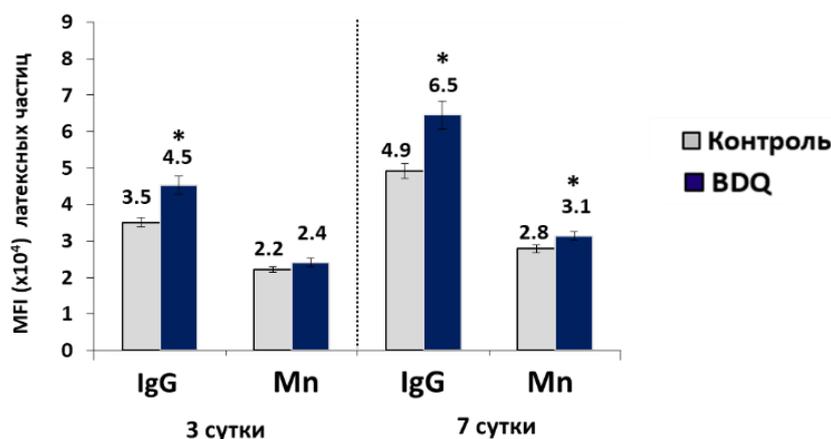


Рис. 37. Эффект бедаквилина на активность рецепторного фагоцитоза на разных сроках макрофагальной дифференцировки.

BDQ – бедаквалин, IgG – карбоксилатные латексные частицы 1 мкм, опсонизированные IgG, Mn – опсонизированные D-маннаном. * – статистически значимые отличия (t-критерий Стьюдента) от контроля ($p < 0.05$). Данные представлены как среднее и SD, $n = 3$.

Таким образом, BDQ увеличивает экспрессию генов фагоцитарных рецепторов и активирует рецепторный фагоцитоз.

4.5 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 вирулентным штаммом *M.tb* H37Rv. Данные об относительном уровне экспрессии (RQ) генов представлены ниже (рис. 38).

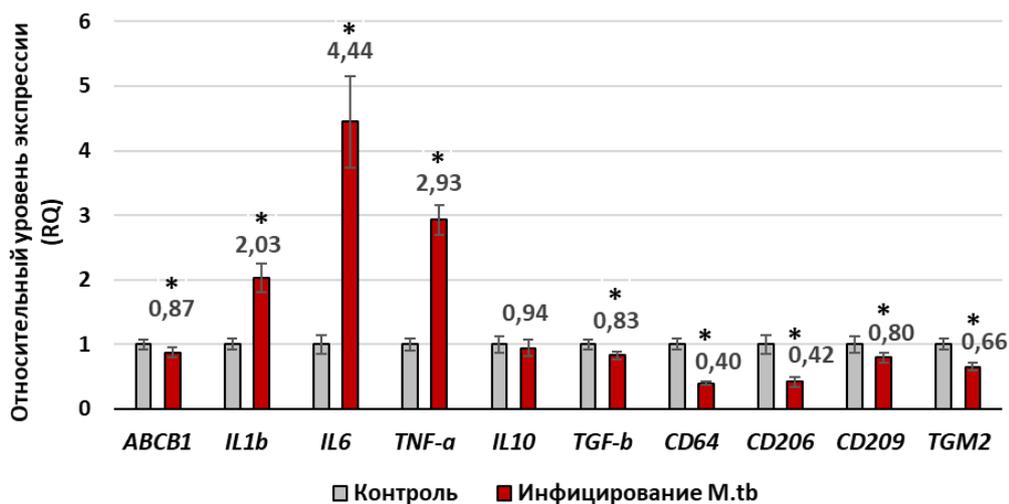


Рис. 38. Экспрессия генов в ТНР-1 макрофагах через 24 часа после инфицирования вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv. На графике представлены средние значения относительного уровня экспрессии гена (RQ) \pm SD, RQ в контроле принят за 1. * – статистически значимые различия (t-критерий Стьюдента) при $p < 0,05$. $n = 3$.

Анализ экспрессии генов показал, что в ответ на инфицирование макрофаги усиливают провоспалительный ответ, который выражается в увеличении экспрессии генов таких провоспалительных цитокинов, как *IL1b* ($2,03 \pm 0,22$), *IL6* ($4,44 \pm 0,78$), а также *TNFa* ($2,93 \pm 0,28$). При этом снижается уровень экспрессии гена противовоспалительного цитокина *TGFb1* ($0,83 \pm 0,02$), в то время как экспрессия гена другого противовоспалительного цитокина *IL10* ($0,94 \pm 0,13$) достоверно не изменяется.

Также было выявлено снижение экспрессии гена тканевой трансглутаминазы 2 (*TGM2*, $0,66 \pm 0,04$) – белка, который является маркером противовоспалительных M2 макрофагов (Martinez and Gordon, 2014). 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 Fc-рецептора к IgG *CD64*.

Экспрессия гена *ABCB1* белка Р-гр, незначительно, но достоверно снижалась через 24 часа после инфицирования ($0,87 \pm 0,08$) по сравнению с неинфицированными макрофагами.

Таким образом, при инфицировании вирулентным штаммом *M.tb* в ТНР-1 макрофагах повышается экспрессия генов провоспалительных цитокинов, в то время как экспрессия гена белка Р-гр *ABCB1* снижается. Т.е., при усилении провоспалительного фенотипа макрофагов снижается экспрессия *ABCB1*.

4.6 Характеристика полученной клеточной линии моноцитов с нокдауном гена *ABCB1*

Так как фармакологические ингибиторы Р-гр могут иметь и другие мишени в клетках, то мы поставили задачу получить стабильную клеточную линию моноцитарных клеток со сниженной экспрессией гена *ABCB1*. Нами была сконструирована shRNA, направленная против мРНК гена *ABCB1*, которая была клонирована в плазмиду рLB, содержащую ген флуоресцентного белка eGFP под цитомегаловирусным промотером для последующей селекции трансдуцированных клеток методом FACS. Детальное описание разработки плазмиды, содержащей shRNA, приведено в материалах и методах (Раздел 3.2.10).

4.6.1 Оценка эффективности нокдауна гена *ABCB1*

Методом ПЦР в реальном времени была проверена эффективность shRNA, направленной на мРНК гена *ABCB1*. 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: с $1,0 \pm 0,04$ до $0,29 \pm 0,03$. 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: с $1,0 \pm 0,02$ до $0,14 \pm 0,01$ (рис. 39).

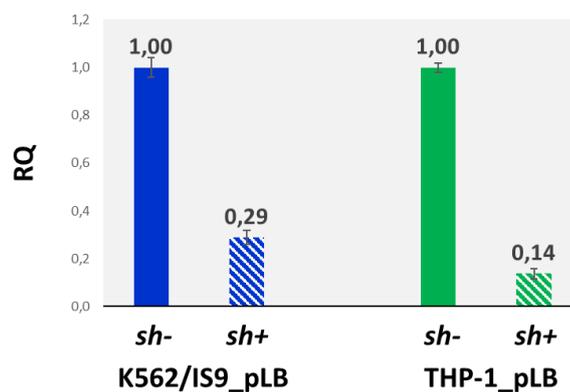


Рис. 39. Сравнение уровней экспрессии гена *ABCB1* в моноцитарных клеточных линиях K562/IS9 и THP-1, трансдуцированных плазмидой pLBб sh – шпилечная РНК к мРНК гена *ABCB1*. На рисунке представлены средние значения относительного уровня экспрессии гена (RQ) \pm стандартное отклонение. RQ в клеточных линиях, трансдуцированных плазмидой без шпилечной РНК (sh-), приняты за 1.

Таким образом, разработанная shRNA для нокдауна гена *ABCB1* демонстрирует свою эффективность на обеих суспензионных экспериментальных линиях вне зависимости от исходного уровня экспрессии гена.

Дальнейшие эксперименты по макрофагальной дифференцировке (в течение 3 суток) проводились на исходных моноцитарных клетках линии THP-1, после их дифференцировки в макрофаги, а также на клетках, трансдуцированных плазмидой без shRNA или с ней.

При индукции макрофагальной дифференцировки в клетках THP-1 под воздействием форболового эфира происходит значительное увеличение экспрессии гена *ABCB1* – в среднем в 33,6 раза. При сравнении с клеточной линией, трансдуцированной плазмидой без shRNA, не было обнаружено различий в экспрессии гена *ABCB1*, т.е. трансдукция клеток вирусными частицами, содержащих только плазмиду не приводит к изменениям экспрессии гена *ABCB1*. В то же время в клеточной линии, трансдуцированной плазмидой, содержащей shRNA, уровень экспрессии гена *ABCB1* был снижен в 4 раза по сравнению с клеточной линией, содержащей только плазмиду (рис. 40). Таким образом, нами была продемонстрирована эффективность лентивирусной конструкции, содержащей shRNA против мРНК гена *ABCB1* в клетках моноцитарной линии THP-1 при их макрофагальной дифференцировке.

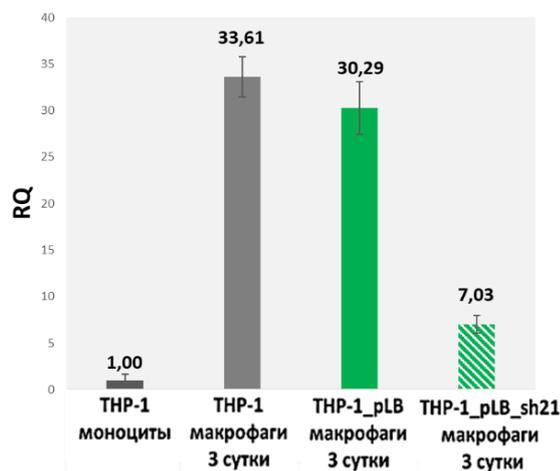


Рис. 40. Сравнение уровней экспрессии гена *ABCB1* в клеточных линиях THP-1 на 3 сутки макрофагальной дифференцировки. THP-1_pLB – трансдуцированная клеточная линия с плазмидой pLB, THP-1_pLB_sh21 – трансдуцированная клеточная линия с плазмидой pLB, содержащей шпилечную РНК против мРНК гена *ABCB1*. На рисунке представлены средние значения 3-х биологических повторов относительного уровня экспрессии гена (RQ) \pm стандартное отклонение. Уровень экспрессии в исходных суспензионных клетках THP-1 принят за 1.

Также важным является тот факт, что лентивирусная трансформация клеток THP-1, содержащих shRNA, не оказала влияния на морфологию клеток при индукции макрофагальной дифференцировки. Под воздействием форболового эфира клетки адгезировали к пластику и приобретали разнообразную макрофагоподобную форму (рис. 41).

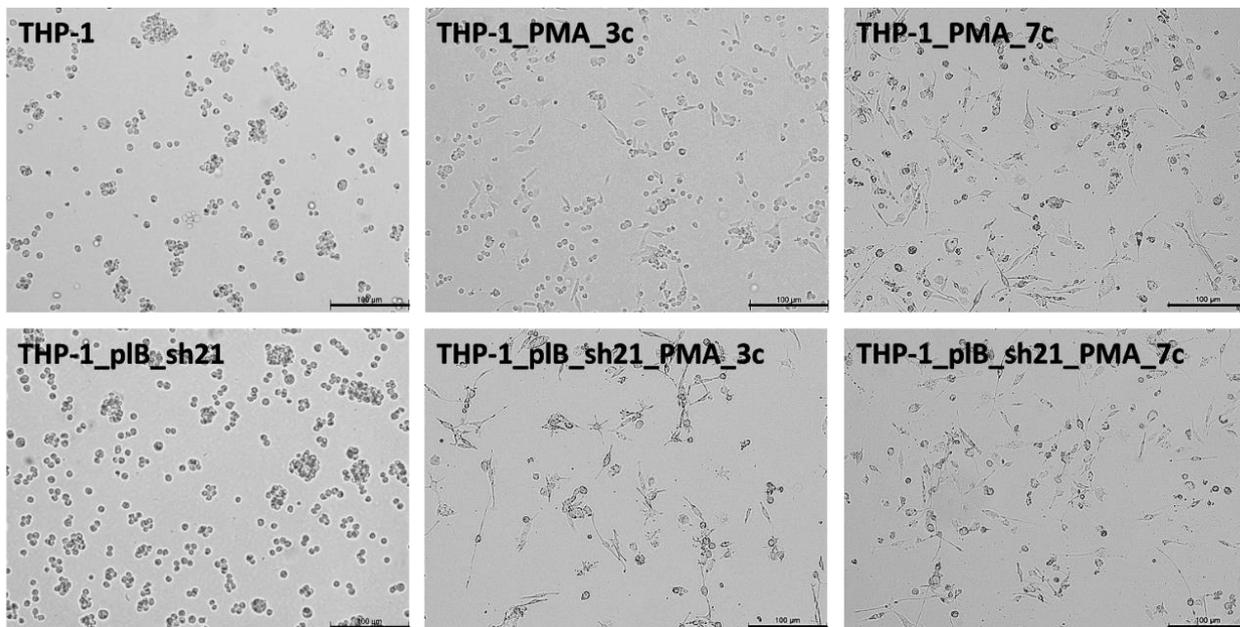


Рис. 41. Светлопольное изображение моноцитарных и макрофагальных клеток на 3 и 7 сутки дифференцировки. THP-1 – исходная суспензионная линия клеток; THP-1_pLB_sh21 – трансдуцированные клетки THP-1, содержащие плазмиду со шпилечной РНК против гена *ABCB1*. PMA_3c и 7c – 3 и 7 сутки макрофагальной дифференцировки. Масштабный отрезок 100 мкм.

Так как плазмида, с помощью которой трансформировали клетки, содержала eGFP, были получены дополнительные флуоресцентные изображения клеток в процессе макрофагальной дифференцировки. Морфологически клетки, содержащие shRNA, не отличалась от клеток, содержащих только плазмиду без shRNA (рис. 42).

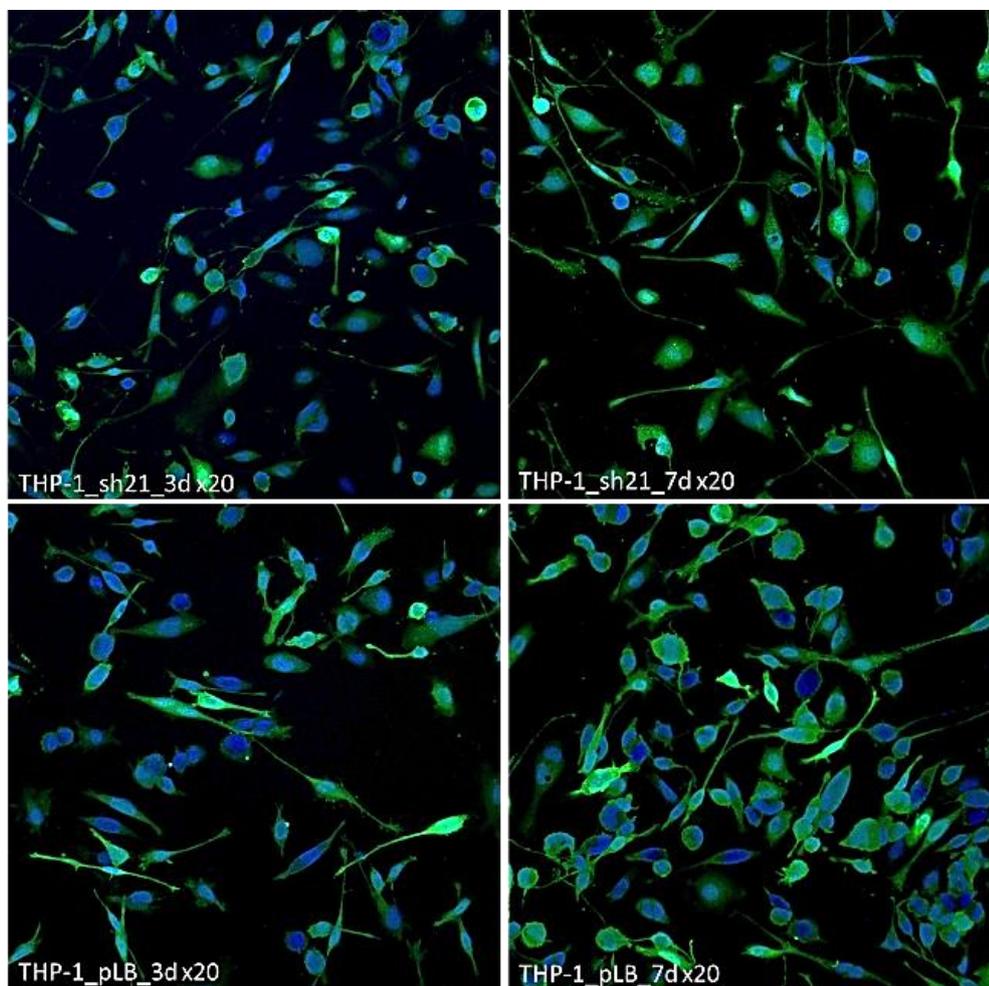


Рис. 42. Изображение трансдуцированных макрофагов THP-1 на 3 и 7 сутки дифференцировки. THP-1_sh21 – клетки, содержащие шпилечную РНК против мРНК гена *ABCB1*, THP-1_pLB – клетки с плазмидой pLB без shRNA. Зеленый – eGFP, синий – DAPI. Конфокальная микроскопия. Увеличение x20.

4.6.2 Оценка стабильности генетической конструкции при длительном культивировании и после криоконсервации клеток

Для оценки стабильности генетической конструкции клетки были подвергнуты криоконсервации, а после разморозки культивировались в течение 28 дней. Исходная клеточная линия THP-1 (рис. 41.А) была использована в качестве контроля – в ней отсутствует белок eGFP (флуоресценция в канале FITC), тогда как после лентивирусной трансдукции более чем в 98% клеток сохраняется плазмида, кодирующая eGFP (рис. 43.Б, В).

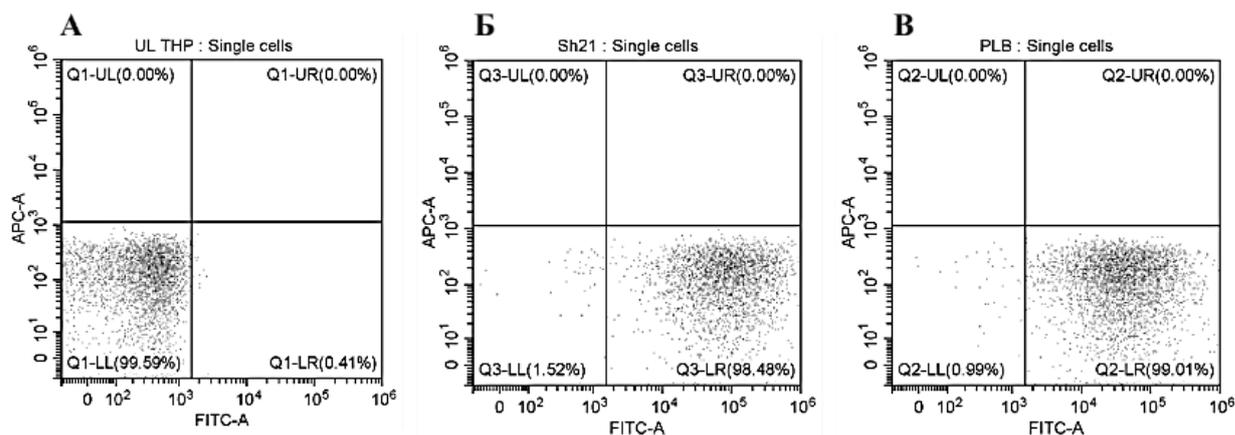


Рис. 43. Флуоресценция eGFP-белка в трансдуцированной клеточной линии THP-1 после криоконсервации и культивирования в течение 28 дней. А – исходная клеточная линия THP-1; Б – линия THP-1, содержащая плазмиду с геном eGFP; В – линия THP-1, содержащая плазмиду с геном eGFP и шпилечную РНК к мРНК гена *ABCBI*. На рисунках представлены точечные графики интенсивности флуоресценции eGFP в канале FITC напротив интенсивности флуоресценции в канале APC. Данные проточной цитометрии.

Таким образом, полученная генетическая конструкция не только эффективно снижает экспрессию гена *ABCBI*, но и сохраняет свою стабильность после криоконсервации и длительного культивирования клеток.

4.6.3 Оценка эффективности фагоцитоза в трансдуцированных THP-1 макрофагах

В первую очередь необходимо было проверить, что лентивирусная трансформация клеточной линии THP-1 вирусными частицами, содержащими плазмиду с shRNA к гену *ABCBI*, не оказывает влияния на фагоцитоз *M.tb* H37Rv макрофагами. На рисунке ниже приведены в качестве примера изображения колоний *M.tb* 3-го серийного разведения, полученные из макрофагов исходной клеточной линии THP-1 и клеток с плазмидой, содержащей shRNA, через 24 часа после их инфицирования (рис. 44).

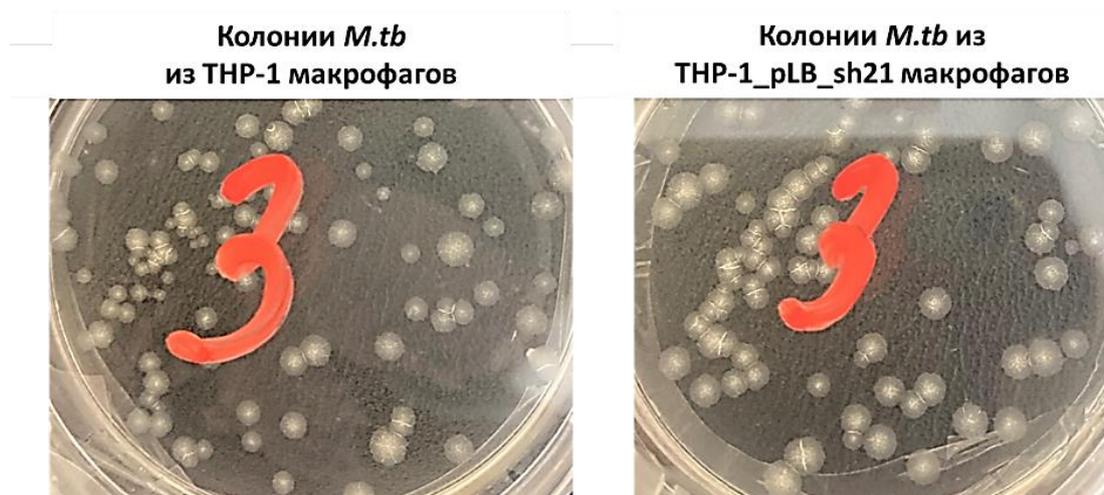


Рис. 44. Фотографии колоний *M. tuberculosis*, полученных из макрофагов исходной клеточной линии ТНР-1 и клеток, трансфицированных плазмидой ТНР-1_pLB_sh21.

Инфицирование проводилось на 5 сутки макрофагальной дифференцировки. Не было обнаружено статистически значимых различий между количеством колониеобразующих единиц (среднее количество КОЕ \pm стандартное отклонение, $n = 3$) *M.tb*, полученных из макрофагов ТНР-1 (106 ± 28), в сравнении с трансдуцированными макрофагами, содержащими плазмиду с shRNA (93 ± 20) или только плазмиду (88 ± 31).

Т.е. трансдуцирование клеток вирусными частицами, содержащими плазмиду с shRNA для нокдауна гена *ABCB1*, не влияет на эффективность инфицирования этих клеток вирулентным штаммом *M.tb* H37Rv. Это позволяет сделать вывод, что снижение экспрессии *ABCB1* не оказывает влияние на активность фагоцитоза *M.tb*.

Таким образом, нами была получена стабильная клеточная линия моноцитов ТНР-1 со сниженной экспрессией гена *ABCB1*, которая под воздействием флорболитина дифференцируется в макрофаги, фагоцитирующие *M.tb*. Создание данной линии позволяет продолжить исследования, направленные на определение роли Р-гр в макрофагах человека как в процессе их дифференцировки, так и при инфицировании микобактериями туберкулеза.

5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

5.1 Экспрессия гена *ABCB1* в перифокальной области туберкулом в зависимости от активности ТБ воспаления

В нашем исследовании мы использовали резекционные образцы легочной ткани исключительно от пациентов с диагнозом множественные туберкуломы легких. Ориентация только на эту клиническую форму позволила стандартизировать образцы для анализа и исключить влияние факторов, связанных с другими формами ТБ. Было показано, что уровень экспрессии гена *ABCB1* увеличивается при высокой активности воспаления, при этом была обнаружена неоднородность экспрессии данного гена. Это поставило перед нами вопрос о выявлении различий в молекулярно-генетическом профиле между подгруппами с разными уровнями экспрессии *ABCB1*.

Предполагается, что функциональная активность Р-gr может приводить к снижению накопления противотуберкулезных препаратов в очагах ТБ воспаления (Pontual et al., 2017; Rodríguez-Castillo et al., 2015). Следовательно, это может привести к селекции лекарственно-устойчивых штаммов *M.tb* (Te Brake et al., 2018b) и, в итоге, способствовать прогрессированию воспаления. Таким образом, нашей целью было изучить взаимосвязь между различными генами, регулирующими воспаление, и экспрессией гена *ABCB1* в легочной ткани больных ТБ.

Индукторами экспрессии гена *ABCB1* могут выступать различные факторы, актуальные при ТБ. Такие цитокины, как IL1b, IL6, TNFa, INFg и TGFb1, увеличивают экспрессию *ABCB1* (Ho and Piquette-Miller, 2006; Liptrott et al., 2009). Факторы транскрипции NF-kB и STAT3, играющие ключевую роль в регуляции воспаления при ТБ, напрямую связываются с промоторной областью гена *ABCB1* и индуцируют его экспрессию (Zhang et al., 2011; Chen et al., 2014; Liu et al., 2015). ТБ поражения легких человека являются сильно гипоксичными, а инфекция *M.tb* приводит к накоплению транскрипционного фактора HIF1a даже при нормоксии (Belton et al., 2016). Примечательно, что транскрипционный фактор HIF1a, участвующий в реакциях на гипоксию, также имеет сайт связывания в гене *ABCB1* (Comerford et al., 2002).

ТБ характеризуется образованием гранулем (туберкулом) — организованных агрегатов иммунных клеток. Изучению клеточного состава и экспрессии генов в туберкуломах во время прогрессирования ТБ уделяется значительное внимание (Subbian et al., 2015; Abengozar-Muela et al., 2020; McCaffrey et al., 2022; Sawyer et al., 2023;). Важно отметить, что отдельные туберкуломы у одного и того же пациента проявляют гетерогенность в активности воспаления, клеточном составе и способности элиминировать *M.tb* (Lenaerts et al., 2015). В нашем исследовании мы анализировали экспрессию генов не

в самой туберкуломе, а в области легочной ткани, прилегающей к капсуле туберкуломы, так называемой перифокальной области (ПФО). Ткани легких, окружающие туберкуломы, сенсibilизированы и высокочувствительны к туберкулину (Hunter, 2020). Мы предположили, что экспрессия генов в ПФО будет в большей степени отражать системный характер воспаления и параметры иммунной системы, чем непосредственно в туберкуломах.

Для высокой активности воспаления характерна инфильтрация ПФО клетками воспаления и образование туберкулом без некроза, а также очагов отсева. Мы предположили, что эти инфильтраты могут включать иммунные клетки с высокой экспрессией *ABCB1*.

Экспрессия *ABCB1* характерна для многих типов иммунных клеток (Bossennec et al., 2018). CD4⁺ Т-клетки являются одними из ключевых в контроле инфекции *M.tb*, поскольку они опосредуют защиту от патогена, регулируя иммунный ответ. В CD4⁺ Т-клетках P-gr играет роль в их выживании и может, вероятно, участвовать в экспорте нескольких цитокинов (Drach et al., 1996; Gollapud and Gupta, 2001). Клетки Th1 и Th17 являются эффекторами CD4⁺ 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). Клетки Th17 участвуют в патогенезе различных хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваний (Murdaca et al., 2011). Субпопуляция клеток Th17, избирательно экспрессирующих P-gr, была обнаружена в кишечнике пациентов с болезнью Крона. Эти клетки продуцировали как Th17 цитокины, так и Th1 (INFg) и не секретировали IL10 или другие противовоспалительные молекулы (Ramesh et al., 2014). В отличие от CD4⁺ Т-клеток, большинство CD8⁺ Т-клеток имеют высокий уровень экспрессии *ABCB1* и функциональный P-gr. Повышенная экспрессия P-gr была обнаружена в CD8⁺ эффекторных клетках и клетках памяти. В этих клетках экспрессия P-gr подавляла окислительный стресс, стимулируя митохондриальную функцию и, тем самым, обеспечивала их выживание (Chen et al., 2020). Предполагается, что высокая экспрессия P-gr в CD8⁺ Т-клетках также может способствовать их цитотоксической функции, хотя на сегодняшний день нет убедительных доказательств данному утверждению. Также высокая экспрессия P-gr является поразительной особенностью инвариантных Т-клеток, ассоциированных со слизистой оболочкой (MAIT). Экспрессия P-gr в них может быть необходима для их защиты от токсинов и ксенобиотиков (Fergusson et al., 2018). MAIT также играют одну из важных функций в защите от *M.tb* (Gold et al., 2010).

Хотя мы и не обнаружили корреляции между экспрессией *ABCB1* и генами-маркерами

лимфоцитов или макрофагов, мы полагаем, что необходим дальнейший анализ с использованием мультиплексной транскриптомики (например, секвенирование РНК отдельных клеток) или протеомики, чтобы идентифицировать специфические типы иммунных клеток, связанных с высокой экспрессией гена *ABCB1* в легких больных при ТБ.

Мы обнаружили, что уровни экспрессии генов макрофагальных маркеров *CD86*, *CD163* и *CD206* были выше в группе с высокой активностью воспаления по сравнению с группой с умеренной активностью. В работах Suzuki и соавторов (2017, 2018) было показано, что уровни белков *CD206* и *CD163* в легких коррелируют с их растворимыми формами (s) в сыворотке крови больных ТБ. Кроме того, уровни s*CD206* и s*CD163* в плазме были выше у пациентов с активным ТБ по сравнению с контрольной группой, а повышенные уровни s*CD163* и s*CD206* были связаны с более высокой смертностью у пациентов с легочным ТБ (Suzuki et al., 2018, 2017). Концентрация s*CD163* в плазме крови также коррелировала с тяжестью ТБ (Liu et al., 2019).

Наибольшую экспрессию гена *CD163* мы наблюдали в группе пациентов, характеризующихся низкой экспрессией гена *ABCB1* и высокой экспрессией гена *TNFa*. По нашим данным, экспрессия гена *CD163* продемонстрировала сильную корреляцию с экспрессией гена *TNFa*. Кроме того, уровни экспрессии генов цитокинов *TNFa*, *IL1b* и *TGFb1* в группе с высокой активностью воспаления были выше по сравнению с группой с умеренной активностью воспаления. Многочисленные исследования демонстрируют, что повышенные уровни этих цитокинов коррелируют с тяжестью ТБ. Сывороточные уровни *TNFa*, *IL1b* и *TGFb1* коррелировали со степенью поражения легких по данным компьютерной томографии (Chowdhury et al., 2014). Уровни *TNFa* и *TGFb1* в сыворотке крови были значительно выше в случаях клинически тяжелого ТБ по сравнению с пациентами с легким и среднетяжелым ТБ (Fiorenza et al., 2005). У больных ТБ с двусторонним или кавернозным поражением легких наблюдались достоверно более высокие уровни *TNFa* и *IL1b* по сравнению с больными с односторонними или некавернозными поражениями (Kumar et al., 2019). Уровни *TNFa* в сыворотке коррелировали со степенью клинической тяжести ТБ у больных (Andrade Júnior et al., 2008; Veig et al., 2023).

TNFa играет решающую роль в иммунном ответе против *M.tb* (Dorhoi and Kaufmann, 2014). Он вырабатывается различными иммунными клетками, преимущественно макрофагами, в ответ на микобактериальную туберкулезную инфекцию и необходим для контроля патогена и формирования туберкулома. Передача сигналов *TNFa* активирует канонический путь NF-κB. Однако чрезмерное и неконтролируемое производство *TNFa* может привести к повреждению тканей и гипервоспалению (van Loo and Bertrand, 2023).

Интересно, что Veig с соавторами (2023) обнаружили, что некоторые пациенты имели нормальные значения TNF α в сыворотке крови, несмотря на тяжелую лимфаденопатию и выраженные некротические поражения в легких, что позволяет предположить наличие других факторов, помимо TNF α , обуславливающих высокую активность воспаления (Veig et al., 2023).

Мы выявили корреляцию между экспрессией *TGF β 1* и *STAT6* ($r = 0,60$), при этом *STAT6* умеренно коррелировал со *STAT3* ($r = 0,47$). Считается, что защитный иммунитет против *M.tb* требует активации INF γ -зависимого сигнального пути I типа (Ghanavi et al., 2021). Но было показано, что для формирования микобактериальной туберкулезной гранулемы могут требоваться сигнальные пути как I типа, так и II типа (Cronan et al., 2021). Таким образом, повышенный уровень экспрессии *TGF β 1* в легких больных ТБ 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 *INF γ* , что может подтверждать данную гипотезу.

Нами было обнаружено, что при высокой воспалительной активности в туберкуломах выделяются две подгруппы образцов. Одна подгруппа характеризуется высоким уровнем экспрессии генов, обозначенных на тепловой карте как Кластер I, а вторая подгруппа – высоким уровнем экспрессии генов из Кластера II. Анализ экспрессии генов в этих кластерах позволил нам идентифицировать две молекулярно-генетические сигнатуры, характеризующие эти подгруппы. При высокой активности воспаления преобладала либо одна, либо другая сигнатура. Важно отметить, что на стандартных гистологических срезах между этими подгруппами не наблюдалось существенных морфологических различий. Мы полагаем, что дальнейший анализ клеточного состава с использованием дополнительных клеточных маркеров и методов мультиплексной иммуногистохимии сможет выявить эти различия.

Выше мы упоминали *TNF α* и *CD163*, поскольку экспрессия их генов в целом была выше в группе с высокой активностью воспаления. В другой подгруппе с высокой активностью воспаления медиана экспрессии *ABCB1*, а также *IL6*, *STAT3*, *SOCS3*, *HIF1 α* и *TGM2* была достоверно выше по сравнению с группой с умеренной активностью воспаления.

Повышенные уровни IL6 в плазме наблюдались у больных ТБ с более тяжелыми клиническими формами заболевания и были связаны с повреждением легких при ТБ (Guzmán-Beltrán et al., 2021; Tang et al., 2013). Передача сигналов IL6 в основном происходит через путь JAK/STAT, преимущественно через STAT3 (Heinrich et al., 2003). Высокие уровни IL6, так же как и TNF α , могут приводить к повреждению тканей и

гипервоспалению (Boni et al., 2022).

Используя ресурс GeneMANIA.org, мы построили сеть взаимодействий между генами, которые не только коррелировали с экспрессией *ABCB1*, но и экспрессировались на высоком уровне при высокой активности воспаления. Было обнаружено, что *STAT3* представляет собой основной ген, который объединяет все эти гены (рис. 45).

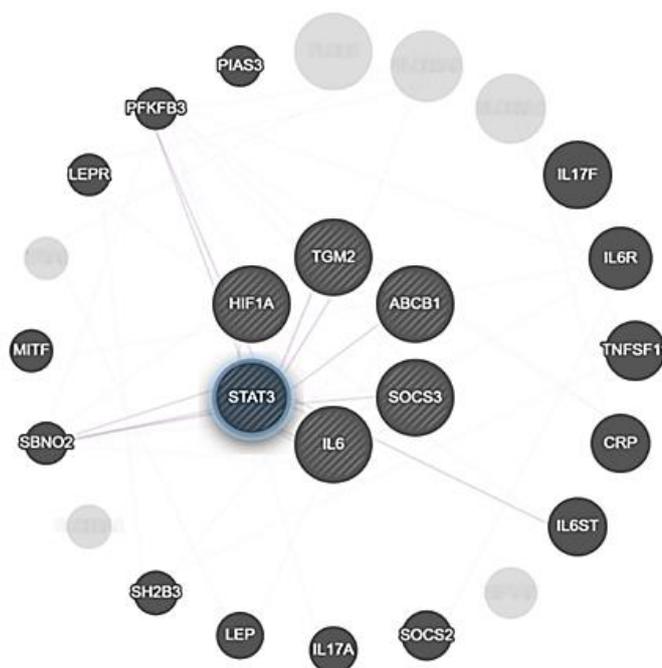


Рис. 45. Сеть взаимодействия между генами, основанная на их совместной экспрессии, полученная GeneMANIA. Два гена связаны, если уровни их экспрессии одинаковы в разных условиях исследования экспрессии генов.

Известно, что *STAT3* играет важную роль в патогенезе ТБ (Rottenberg and Carow, 2014). Однонуклеотидные полиморфизмы гена *STAT3* связаны с уязвимостью к активному ТБ или коррелируют с тяжестью заболевания (Wang et al., 2021).

STAT3 являются компонентом *IL6*-активируемого комплекса фактора фазы острого ответа (APRF), который стимулирует выработку врожденных иммунных медиаторов (Zhong et al., 1994). В клетке он может находиться в нефосфорилированной (*uSTAT3*) и фосфорилированной (*pSTAT3*) формах. *IL6* стимулирует фосфорилирование *STAT3*, в результате активируется транскрипция многих генов, включая сам *STAT3*, что приводит к увеличению уровня *STAT3* 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 может положительно регулировать воспалительные реакции, ингибируя *STAT3*.

Сообщалось об одновременно повышенных уровнях экспрессии SOCS3/STAT3 в различных типах иммунных клетках, что позволяет предположить их участие в патогенезе различных воспалительных заболеваний (Gao et al., 2018).

Повышенная экспрессия генов *IL6*, *IL10*, *STAT3* и *SOCS3* в иммунных клетках позволяет отличить больных ТБ от здоровых людей (Adankwah et al., 2021). Хотя *IL10* не был включен в тот же кластер, что и экспрессия гена *IL6*, в нашем исследовании, мы обнаружили умеренную корреляцию между экспрессией *IL10* и *IL6* ($r = 0,59$) и *SOCS3* ($r = 0,57$). Предыдущие исследования продемонстрировали корреляцию между высокими уровнями *IL6* и *IL10* в сыворотке крови пациентов с активным ТБ, что было связано с aberrантной активацией STAT3 в иммунных клетках (Harling et al., 2019).

Первоначально мы включили TGM2 в наше исследование в качестве маркера макрофагов M2. Мы наблюдали умеренную отрицательную корреляцию между экспрессией TGM2 и *CD163* ($r = -0,41$). TGM2 представляет собой фермент, участвующий в различных биологических функциях, включая посттрансляционные модификации белков, гибель клеток и передачу сигналов (Piacentini et al., 2014). Показано, что TGM2 активирует сигнальный путь *IL6/JAK/STAT3*, а подавление TGM2 снижает фосфорилирование STAT3 (Wang et al., 2022). При туберкулезном воспалении TGM2 играет значительную роль, способствуя выживанию *M.tb* в инфицированных макрофагах: его инактивация усиливает бактерицидные свойства макрофагов, что делает его потенциальной мишенью НДТ при ТБ (Palucci et al., 2019). Кроме того, TGM2 активирует промотор гена *HIF1a* (Kumar and Mehta, 2012).

Гипоксия является характерной особенностью воспаления в легких больных ТБ (Belton et al., 2016). Фактор, индуцируемый гипоксией 1 (HIF1), представляет собой фактор транскрипции, состоящий из субъединиц HIF1a и HIF1b. HIF1b экспрессируется конститутивно, в то время как уровни HIF1a могут варьироваться. HIF1a может стабилизироваться с помощью STAT3 и *IL6* (O'Donnell et al., 2006). В свою очередь, ингибирование STAT3 блокирует экспрессию HIF1a (Xu et al., 2005). Роль HIF1a при ТБ неоднозначна: он способствует бактерицидной активности макрофагов против *M.tb*, но также нарушает активацию и дифференцировку CD4+ Т-клеток, что приводит к повышению восприимчивости к инфекции *M.tb* (Liu et al., 2022). Также HIF1a ограничивает NF-κB-зависимую экспрессию генов, чтобы контролировать сигналы врожденного иммунитета, тем самым предотвращая чрезмерные и повреждающие провоспалительные реакции (Bandarra et al., 2015). Следовательно, HIF1a может способствовать уничтожению патогена, но его чрезмерная активация может привести к прогрессированию воспаления и повреждению тканей (Suresh et al., 2023).

Таким образом, сравнивая результаты нашего анализа с имеющимися данными литературы, мы обосновываем связь между высокой экспрессией *ABCB1* и экспрессией генов *IL6*, *STAT3*, *SOCS3*, *HIF1a* и *TGM2*. Более того, выявленные нами корреляции позволяют предположить, что индукция экспрессии *ABCB1* в легких больных ТБ может быть опосредована активацией сигнального пути *STAT3*.

Стоит отметить, что повышенные уровни секретируемого Р-гр связаны с клинической тяжестью или отсутствием терапевтического ответа при таких заболеваниях, как хронический риносинусит, ревматоидный артрит и системная красная волчанка (Nosera et al., 2017; Perez-Guerrero et al., 2018; Perez-Guerrero et al., 2018). *ABCB1* включен в список 20 дифференциально экспрессируемых генов цельной крови, которые отличают больных активным ТБ от здоровых людей (Ponnusamy and Agumugam, 2022). Повышенная экспрессия и функциональная активность Р-гр были обнаружены в CD4⁺ Т-клетках памяти пациентов с латентным ТБ по сравнению с неинфицированным контролем (Burel et al., 2018). Эти данные подчеркивают важность изучения регуляции экспрессии гена *ABCB1* и функциональной активности Р-гр у больных ТБ легких.

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 различался. Это исследование предоставляет новые свидетельства того, что высокая активность воспаления может быть обусловлена различными факторами. Это может быть как развитие патологического процесса, обусловленного высоким уровнем *IL6* и *STAT3*, так и высоким уровнем *TNFa* и, возможно, инфильтрацией легких CD163-позитивными макрофагами. Мы идентифицировали сигнатуру, характеризующуюся повышенной экспрессией генов *HIF1a*, *TGM2*, *IL6*, *SOCS3* и *STAT3*, которая не только была ассоциирована с высокой активностью воспаления, но также коррелировала с экспрессией *ABCB1*. Другая генная сигнатура, связанная с высокой активностью воспаления, характеризовалась повышенными уровнями экспрессии генов *TNFa* и *CD163*. Обнаруженные нами молекулярно-генетические сигнатуры в дальнейшем могут улучшить понимание иммунопатологии ТБ и потенциально быть полезными при разработке подхода НДТ для повышения эффективности противотуберкулезного лечения и предотвращения повреждения легочной ткани, опосредованного высокой активностью воспаления.

5.2 Влияние рифампицина, инкапсулированного в полимер молочной кислоты, и бедаквилина на функциональную активность Р-гр

Развитие нанотехнологии позволяет создавать лекарственные препараты, обладающие не только новыми физико-химическими свойствами, но и новыми

биологическими свойствами, по сравнению с их традиционными формами. Так как P-*gr* локализован на плазматической мембране макрофагов, то его функциональная активность может приводить к снижению внутриклеточных концентраций его субстрата – RIF.

RIF-PLLA – это новая форма рифампицина, инкапсулированного в наночастицы полимера молочной кислоты, разрешенного для медицинского применения. В отличие от RIF, проникающего в клетки путем диффузии, RIF-PLLA попадает в макрофаги путем фагоцитоза (Kalluru et al., 2013). В фагосомах и фаголизосомах полимер деградирует, в результате чего высвобождается RIF в свободной форме (Lee et al., 2016). Так как *M.tb* персистирует в фагосомах, то идеология создания RIF-PLLA предполагает его более эффективное воздействие на внутриклеточные формы микобактерий туберкулеза за счёт адресной доставки и создания более высокой внутриклеточной концентрации препарата, по сравнению с традиционной формой RIF, в том числе и за счет избегания взаимодействия RIF с P-*gr*. Таким образом, одной из задач данной работы было определить является ли RIF, инкапсулированный в наночастицы PLLA, субстратом для P-*gr*.

Было обнаружено, что как RIF, так и PLLA ингибируют функциональную активность P-*gr*. Если для RIF ингибирование обусловлено тем, что он является субстратом, то PLLA, возможно, активирует эндоцитоз/фагоцитоз в клетках, что также подтверждалась данными сканирующей электронной микроскопии поверхности клеток K562/IS9. Так как ФИА_{P-*gr*} под воздействием RIF-PLLA был в 2 раза выше, то это может указывать на синергетический эффект действия PLLA, как активатора фагоцитоза и RIF, который освобождается из полимера при деградации и взаимодействует с P-*gr* как субстрат, ингибируя выброс родамина 123, который также является субстратом P-*gr*. Таким образом, мы предполагаем, что RIF в составе наночастиц полимера также может взаимодействовать с P-*gr*.

Но за счет того, что при использовании наночастиц полимера происходит активация процесса фагоцитоза и снижение функциональной активности P-*gr*, нам представляется перспективным и актуальным разработка инкапсулированных противотуберкулезных препаратов – активаторов фагоцитоза.

Анализ выброса родамина 123 в присутствии различных концентраций BDQ показал, что при увеличении концентрации BDQ увеличивается интенсивность флуоресценции красителя. Это может свидетельствовать о том, что BDQ является субстратом P-*gr*. Но при этом в сравнении с RIF, его ингибирующие свойства на выброс родамина 123 выражены в значительно меньшей степени. Таким образом, BDQ проявляет низкую субстратную специфичность к P-*gr* в сравнении с RIF. При этом статистически значимый эффект на выброс родамина 123 проявлялся только при использовании высокой, в 10 раз

превышающую «терапевтическую», концентрации BDQ (50 мкг/мл). Возможным объяснением обнаруженного эффекта BDQ на выброс красителя может быть ингибирование выработки АТФ в макрофагах. Так как Р-gr является АТФ-зависимым транспортером, на его функциональную активность могут оказывать влияние внутриклеточные уровни АТФ. Так как BDQ ингибирует микобактериальную АТФ-синтазу, есть возможность того, что он может также оказывать эффект и на митохондриальную АТФ-синтазу в клетках млекопитающих. Было обнаружено, что бедаквилин в концентрации 25 мкг/мл нарушает митохондриальное дыхание в гепатоцитах крыс, 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 BDQ проявляет гораздо более слабую субстратную специфичность к Р-gr по сравнению с RIF, это может быть одним из факторов его эффективности при терапии лекарственно-устойчивых форм ТБ.

5.3 Влияние рифампицина и бедаквилина на экспрессию гена *ABCBI* в процессе дифференцировки ТНР-1 макрофагов

В данной работе были получены результаты, свидетельствующие об увеличении экспрессии гена *ABCBI* под воздействием «терапевтической» концентрации RIF на всех исследованных сроках макрофагальной дифференцировки (3 и 7 сутки). Ранее нами, но при другом дизайне эксперимента, когда RIF добавляли в терапевтических концентрациях к макрофагам на 96 часов с 3 по 7 сутки макрофагальной дифференцировки, также была показана индукция экспрессии гена, но отсутствие изменений в уровне белка на плазматической мембране или функциональной активности Р-gr (Павлова и др., 2022). Мы предполагаем, что отсутствие таких изменений может быть обусловлено низкими концентрациями антибиотика. В работе Hasanuzzaman с соавторами (2019) было показано увеличение уровня белка Р-gr в макрофагах ТНР-1 и его функциональной активности под воздействием только 10-кратной от терапевтической дозы RIF (100 мкг/мл) (Hasanuzzaman et al., 2019).

Согласно литературным данным, область промотора гена *ABCBI* содержит множественные сайты связывания для различных факторов транскрипции, включая NF-κB (Bentires-Alj et al., 2003). Известно, что при индукции макрофагальной дифференцировки форболовым эфиром, в ТНР-1 клетках значительно увеличивается экспрессия гена *ABCBI* и на мембране клеток появляется функционально активный белок, что было показано как

нами (Павлова и др., 2022), так и другими исследователями (Berg et al., 2018). Несмотря на значительный прогресс в понимании макрофагальной дифференцировки клеток ТНР-1, факторы транскрипции, регулирующие эти процессы, до сих пор остаются плохо изученными (Liu et al., 2023). Форболовый эфир может активировать протеинкиназу С, а также активировать множество транскрипционных факторов, в том числе NF-κB (Pinto et al., 2021). Фосфорилирование Р-гр киназами, в частности протеин-киназой С, влияет на его транспортную функцию и связанную с ней активность АТФ-азы, а также на траффик белка в клетке (Idriss et al., 2000).

Какими факторами и активацией каких сигнальных путей обусловлено повышение экспрессии гена *ABCB1* и появление функционально активного Р-гр при макрофагальной дифференцировке клеток под воздействием форболового эфира, не известно и требует дальнейшего изучения. На клеточной линии LS174Т (аденокарцинома толстой кишки человека) было показано, что обработка клеток форболовым эфиром приводила к значительному и дозозависимому увеличению транслокации белка комплекса NF-κB RelA/p65 в ядро и снижала экспрессию и функциональную активность Р-гр (Li et al., 2017). В то время как в другой работе на клеточной линии аденокарциномы толстой кишки (HCT15) было показано, что ингибирование NF-κB снижало экспрессию гена и уровень белка Р-гр (Bentires-Alj et al., 2003). Аналогичные результаты были получены на клеточной линии рака молочной железы MCF-7, устойчивой к доксорубину (полученной в результате селекции на возрастающих дозах): подавление активности NF-κB с помощью ингибитора пентоксифиллина снижало экспрессию и функциональную активность Р-гр в данной клеточной линии (Abdin et al., 2021).

Для запуска сигнального пути NF-κB требуется его транслокация в ядро, хотя ранее было показано, что в моноцитах ТНР-1 NF-κB не обнаруживается в цитоплазме, в то время как обработка форболовым эфиром приводит к его появлению и накоплению комплекса в цитоплазме клеток. Но цитоплазматический NF-κB не способен индуцировать клеточные события. Только дополнительная стимуляция клеток ЛПС приводила к значительной транслокации NF-κB в ядро. На основании полученных данных авторы работы делают предположение, что процесс созревания макрофагов после обработки форболовым эфиром подготавливает клетку путем индукции уровней NF-κB в цитоплазме к быстрому и усиленному ответу на дополнительный стимул, например такой как ЛПС (Takashiba et al., 1999) (рис. 46).

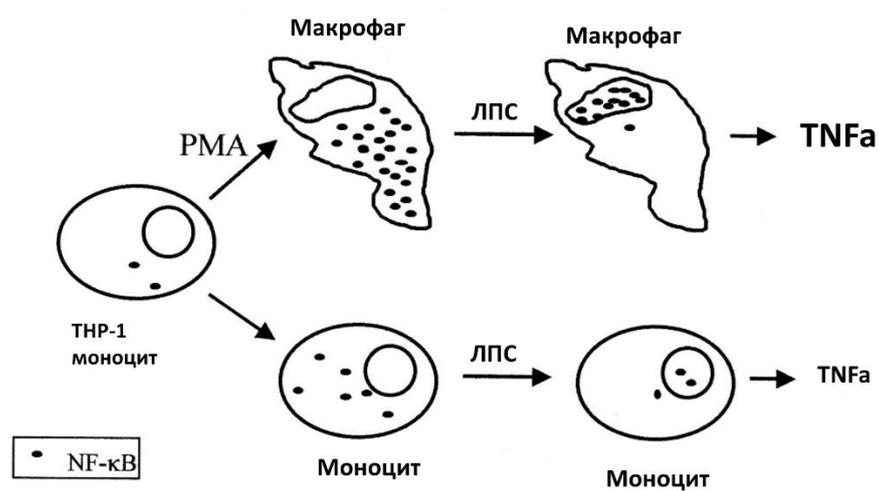


Рис. 46. Схематическое изображение взаимосвязи между дифференцировкой моноцитов, индуцированной флорболовым эфиром (PMA), накоплением и транслокацией NF-κB и секрецией TNFα под воздействием липополисахарида (ЛПС) (рисунок сделан на основе Takashiba et al, 1999)

Различные цитокины, продуцируемые в результате воздействия флорболового эфира, могут действовать на клетки аутокринным образом, усиливая и закрепляя программу дифференцировки, в том числе влияя на транслокацию NF-κB из цитоплазмы в ядро (Pennington et al., 2001). Таким образом, любые «перекрестные помехи» (cross-talk), влияющие как непосредственно на NF-κB, его стабилизацию, деградацию или транслокацию, так и на секрецию цитокинов, могут оказывать влияние на дифференцировку макрофагов, индуцированную воздействием флорболового эфира, и тем самым на их провоспалительный фенотип.

PXR – ядерный рецептор, основной функцией которого является регуляция экспрессии белков, участвующих в детоксикации и выведении ксенобиотиков из организма. Для клеток эпителиального происхождения уже была продемонстрирована ведущая роль PXR в стимулировании экспрессии гена *ABCB1* при действии RIF (Magnarin et al., 2004). Было идентифицировано, что PXR связывается не с промотором гена *ABCB1*, а со сложным регуляторным кластером примерно из 8 пар нуклеотидов, в котором ключевую роль при действии RIF играет мотив DR4 в области энхансера (Geick et al., 2001). Вероятно, что ядерная транслокация PXR, обусловленная RIF, также опосредует повышенный уровень экспрессии гена *P-gp* и в макрофагах. Ингибирование кетоконазолом PXR или его нокдаун подавляли RIF-индуцированную экспрессию *ABCB1* в макрофагах (Bhagyaraj et al., 2018). Это свидетельствует в пользу гипотезы о ключевой роли PXR в повышении экспрессии гена *ABCB1* под действием RIF в макрофагах.

Также нами было показано, что RIF не индуцирует экспрессию гена *ABCB1* в моноцитах THP-1 даже при длительном (28 дней) культивировании клеток с данным

антибиотиком (Павлова и др., 2022). Это может означать, что PXR при действии RIF способен только увеличивать экспрессию гена *ABCB1* в клетках с уже высоким уровнем его экспрессии, но не индуцировать её. Так как PXR опосредует увеличение экспрессии гена *ABCB1* под воздействием RIF, то от базовых уровней PXR в клетке зависит возможность такой модуляции экспрессии гена. Но согласно литературным данным, при индукции макрофагальной дифференцировки в клетках THP-1 уровень PXR не изменяется (Hasanuzzaman et al., 2019). Таким образом, различия в индукции экспрессии гена *ABCB1* между моноцитарными и макрофагальными клетками, которые нами были выявлены, можно объяснить тем, что PXR модулирует экспрессию гена *ABCB1* только при её индукции другими транскрипционными факторами, такими как, например, NF-κB.

В отличие от RIF, BDQ не оказывал влияние на экспрессию *ABCB1* на поздних сроках макрофагальной дифференцировки, в то время как на 3 сутки экспрессия *ABCB1* под воздействием BDQ была ниже, чем в контроле. Было показано, что BDQ в терапевтической концентрации (5 мкг/мл) приводит к ядерной транслокации транскрипционного фактора EB (TFEB), одного из ключевых мастер-регуляторов биогенеза лизосом (Giraud-Gatineau et al., 2020).

Полученные нами результаты об изменении экспрессии гена *ABCB1* на ранних сроках макрофагальной дифференцировки под воздействием BDQ могут указывать на перекрестные помехи между TFEB и транскрипционными факторами и сигнальными путями, которые активируются при макрофагальной дифференцировке под воздействием форболового эфира и приводят к увеличению экспрессии гена белка P-гp в макрофагах. Действительно, было показано, что TFEB ингибирует передачу сигналов NF-κB путем подавления активности ИКК (киназы IκB), что защищает ингибирующую субъединицу комплекса IκB от деградации и приводит к снижению ядерной транслокации RelA/p65 (Song et al., 2019). Таким образом, мы предполагаем, что низкий уровень экспрессии *ABCB1* на ранних сроках макрофагальной дифференцировки под воздействием BDQ может быть обусловлен влиянием антибиотика на формирование фенотипа макрофагов за счет перекрестных помех между сигнальными путями в клетке, которые активируются под воздействием антибиотика и путями, связанными с дифференцировкой макрофагов.

5.4 Влияние фармакологического ингибирования P-гp на провоспалительные свойства макрофагов человека как самостоятельно, так и под воздействием противотуберкулезных препаратов, в процессе их дифференцировки

VER – это лекарственный препарат, который используется в клинической практике для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Основной фармакологический эффект VER заключается в блокировании кальциевых каналов. В данной работе в качестве

фармакологического ингибитора функциональной активности P-гр мы использовали R-верапамил, который в отличие от S-энантиомера, обладает более низким сродством к связыванию с кальциевыми каналами L-типа, но при этом также эффективно ингибирует функцию P-гр (Busse et al., 2006).

Сравнение уровней экспрессии генов соответствующих цитокинов с их секрецией позволяет предположить, что фармакологическое ингибирование P-гр VER препятствует секреции провоспалительных цитокинов при макрофагальной дифференцировке. На ранних сроках этот эффект выражен для всех трёх исследованных провоспалительных цитокинов, таких как IL6, TNF α и IL1b, а на поздних сроках – в первую очередь для IL1b. Отсутствие возрастания уровня секреции TNF α и IL6 на этом сроке на фоне возросшей экспрессии их генов также может свидетельствовать об ингибировании их секреции.

Ранее уже было показано, что фармакологическое ингибирование P-гр снижает секрецию провоспалительных цитокинов (Drach et al., 1996; Pawlik et al., 2005). Кроме того, было показано, что VER снижал продукцию медиаторов воспаления (TNF α и NO) в клетках микроглии, стимулированных ЛПС, тем самым защищая нейроны от гибели (Liu et al., 2011). При этом авторы работы отмечают, что нейропротекторные свойства VER не зависели от ингибирующего влияния на кальциевые каналы, так как не было обнаружено различий в уровне секреции TNF α под воздействием как R-VER, так и рацемата. Таким образом, авторы не связывают ингибирование секреции медиаторов воспаления с блокировкой кальциевых каналов.

Провоспалительные цитокины, прежде всего IL1b и TNF α , являются одними из ключевых в борьбе макрофагов с микобактериями (Domingo-Gonzalez et al., 2016). Снижение секреции данных цитокинов, опосредованное ингибированием активности P-гр, может негативно влиять на борьбу с возбудителем.

Согласно полученным данным под воздействием терапевтической концентрации RIF наблюдалось снижение как экспрессии генов провоспалительных цитокинов, так и их секреции на всех исследуемых сроках макрофагальной дифференцировки. Полученные данные о противовоспалительных эффектах RIF совпадают с данными других авторов (Vi et al., 2011; Smani et al., 2011; Ziglam et al., 2004). Интересно отметить, что в *in-silico* исследовании обнаружили, что RIF обладает высокой аффинностью химического связывания с провоспалительными цитокинами TNF α , IL6 и IL1b. Это указывает на то, что он может быть потенциальным лекарством в иммуномодуляции во время цитокинового шторма при лечении COVID-19 (Pathak et al., 2021). То есть антибиотик 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 было обнаружено, что фармакологическое ингибирование P-gr усиливает противовоспалительные эффекты RIF на ранних сроках макрофагальной дифференцировки. Дополнительное снижение секреции провоспалительных цитокинов под воздействием VER на ранних сроках можно объяснить аддитивными эффектами препаратов, так как VER, так же как и RIF, снижает секрецию провоспалительных цитокинов. Аналогичные эффекты мы обнаружили и при совместной инкубации BDQ с VER.

Но на поздних сроках макрофагальной дифференцировки фармакологическое ингибирование P-gr частично отменяет провоспалительные эффекты RIF, что приводит к повышению уровней экспрессии и секреции провоспалительных цитокинов TNF α и IL6 при совместной инкубации VER с RIF по сравнению только в RIF.

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

Нами было обнаружено, что BDQ снижал уровни секреции провоспалительных цитокинов на ранних сроках макрофагальной дифференцировки. Мы полагаем, что это может быть обусловлено возможным влиянием BDQ на формирование фенотипа зрелых макрофагов, как это было обнаружено и при анализе уровня экспрессии гена *ABCBI*.

На поздних сроках дифференцировки под воздействием BDQ 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 TNP-1, инфицированных *M.tb* под воздействием BDQ 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 P-gr на поздних сроках не оказывает влияния на иммуномодулирующие свойства BDQ.

IL6 считается провоспалительным цитокином, так как его экспрессия индуцируется такими провоспалительными цитокинами, как IL1 β и TNF α , но в макрофагах IL6 подавляет

экспрессию TNF α . IL-6, также как и IL-10, ингибирует лизосомально-фагосомальное слияние и аутофагию в инфицированных *M.tb* макрофагах, способствуя внутриклеточному персистированию возбудителя (Dutta et al., 2012). Таким образом, обнаруженные эффекты BDQ на макрофаги на позднем сроке дифференцировки требуют дальнейшего изучения, так как данные факторы могут оказывать негативное влияние на патогенез ТБ. Особенно, учитывая, что нами были выявлены выраженные эффекты BDQ на уровень экспрессии фагоцитарных рецепторов и усиление рецепторного фагоцитоза как через Fc-рецепторы к IgG, так и через лектиновые рецепторы.

Также стоит отметить, что разнонаправленные изменения в макрофагах на 7 сутки дифференцировки по сравнению с 3 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 ПТП могут быть различными в зависимости от статуса макрофагов, что может иметь важное значение в клинической практике. При ТБ 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 туберкулом больных ТБ с высокой активностью воспаления по сравнению с умеренной активностью, также выявило повышенный уровень экспрессии генов-маркеров макрофагов, характерных как для M1, так и для M2 макрофагов.

Это подчеркивает важность исследования действия ПТП не только на зрелые макрофаги, но и на клетки, находящиеся в процессе дифференцировки.

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

Анализ экспрессии генов показал, что в ответ на инфицирование *M.tb* макрофаги усиливают провоспалительный ответ, который выражается в увеличении экспрессии генов провоспалительных цитокинов. Полученные нами результаты по изменению экспрессии генов при инфицировании *M.tb* соотносятся с данными других исследователей, которыми было показано не только увеличение уровня экспрессии генов, но и секреции провоспалительных цитокинов после инфицирования макрофагов микобактериями туберкулеза (Pu et al., 2021; Sharma et al., 2003).

Через 24 часа после инфицирования мы не обнаружили изменения уровня экспрессии гена IL10. В работе Sharma (2003) было показано, что секреция IL-10 увеличивается только через 48 часов после инфицирования макрофагов (Sharma et al., 2003). Также, согласно литературным данным, инфицирование вирулентными микобактериальными штаммами

приводит к увеличению экспрессии гена *ABCBI*, а также повышению уровня Р-гр в макрофагах, но только через 72 часа после инфицирования, в то время как через 24 часа, не обнаруживаются изменения в экспрессии *ABCBI* (Wu et al., 2019). Таким образом, в ответ на инфицирование в макрофагах происходит усиление провоспалительного ответа и снижается экспрессия *ABCBI*. Усиление экспрессии провоспалительных генов в ответ на инфицирование может быть обусловлено активацией NF-κB.

Проведенный нами анализ уровня экспрессии генов в легочной ткани больных ТБ выявил, что при высокой активности воспаления при ТБ низкий уровень экспрессии гена *ABCBI* ассоциирован с повышенной экспрессией *TNFα*. Мы предполагаем, что высокая экспрессия *TNFα* может быть обусловлена повышенной (аберрантной) активацией NF-κB в макрофагах. Кроме того, при длительном персистировании *M.tb* происходит переключение с NF-κB в макрофагах на STAT3, которое приводит к активации противовоспалительной программы и индукции в них экспрессии и секреции противовоспалительных цитокинов (Park et al., 2021; Queval et al., 2016). Таким образом, в макрофагах активация провоспалительного ответа может снижать экспрессию гена *ABCBI*. В то время как активация STAT3, напротив, повышает экспрессию *ABCBI*. Активация STAT3 в иммунных клетках, в том числе макрофагах, может способствовать персистированию патогена и обуславливать высокую активность воспаления в легочной ткани.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При выполнении данной работы впервые была проанализирована взаимосвязь между экспрессией гена *ABCB1* белка Р-гр и экспрессией генов-маркеров различных типов иммунных клеток, транскрипционных факторов и цитокинов в перифокальной области туберкулом легких больных ТБ в зависимости от активности специфического воспаления. Проведенный анализ не только выявил, что экспрессия гена *ABCB1* не однородна при высокой активности воспаления, но и позволил идентифицировать две различные молекулярно-генетические сигнатуры, ассоциированные с высокой активностью воспаления, одна из которых связана с высокой экспрессией гена *ABCB1*, а другая – с низкой. Обнаружено, что 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. Идентифицированные молекулярно-генетические сигнатуры, ассоциированные с высокой активностью воспаления в легких больных, расширяют знания об иммунопатологии ТБ и могут быть использованы при разработке терапевтических подходов, направленных на регуляцию туберкулёзного воспаления, и предотвращение повреждения структур респираторного отдела.

Впервые продемонстрировано, что бедаквилин, новый противотуберкулезный антибиотик, в терапевтических концентрациях не индуцирует экспрессию *ABCB1* в макрофагах человека и обладает слабой субстратной специфичностью к Р-гр, в отличие от рифампицина. Это важный для клинического использования бедаквилина результат, который демонстрирует, что Р-гр не снижает внутриклеточную концентрацию антибиотика, что особенно важно в случае инфицированных макрофагов. Это может быть одним из факторов эффективности бедаквилина при терапии лекарственно-устойчивых форм туберкулёза. При этом препарат обладает иммуномодулирующими свойствами и, что актуально при туберкулёзном воспалении, является активатором фагоцитоза в макрофагах.

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. Полученные нами данные о влиянии фармакологического ингибирования Р-гр на макрофаги важно учитывать при разработке стратегий лечения туберкулеза.

Также стоит отметить, что разнонаправленные эффекты в макрофагах на 7 сутки

дифференцировки, по сравнению с 3 сутками, при действии разных экспериментальных агентов, использованных в нашей работе, указывают на изменения в функциональном состоянии макрофагов ТНР-1 при их дифференцировке. Таким образом, эффекты бедаквилаина и рифампицина могут различаться в зависимости от статуса макрофагов и могут иметь важное значение в клинической практике.

При ТБ в очаг воспаления мигрируют моноциты и макрофаги, находящиеся на разных стадиях дифференцировки. Наше исследование экспрессии генов в перифокальной области туберкулом больных ТБ с высокой активностью воспаления по сравнению с умеренной активностью, также выявило повышенный уровень экспрессии генов-маркеров макрофагов, характерных как для М1, так и для М2 макрофагов. Это подчеркивает важность исследования действия ПТП не только на зрелые макрофаги, но и на клетки, находящиеся в процессе дифференцировки.

Впервые получена стабильная клеточная линия моноцитов ТНР-1 со сниженной экспрессией гена *ABCB1*. Создание данной линии позволит продолжить исследования, направленные на определение роли Р-gp в макрофагах человека.

7. 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*.

8. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

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 бетадквилина 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.

9. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global Tuberculosis Report. - URL: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>
2. 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.
3. Ерохина М.В., Лепеха Л.Н., Рыбалкина Е.Ю., Никоненко Б.Б., Бочарова И.А., Эргешов А.Э. Возрастание экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости Mdr1a/b в клетках легких мышей, инфицированных *M. tuberculosis*//Вестник ЦНИИТ. – 2019. – № 2. – С. 16-25.
4. Ерохина М.В., Лепеха Л.Н., Эргешов А.Э., Рыбалкина Е.Ю., Садовникова С.С., Сычевская К.А. Белки множественной лекарственной устойчивости соматических клеток легкого и особенности их экспрессии при фиброзно-кавернозном туберкулезе//Туберкулез и болезни легких. – 2016. – Т. 94. – N 9. – С. 53-58.
5. Ерохина М. В., Курынина А. В., Онищенко Г. Е. Митохондрии являются мишенью для противотуберкулезного препарата рифампицина в культивируемых эпителиальных клетках // *Биохимия*. — 2013. — Т. 78, № 10. — С. 1473–1484.
6. 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-гр в макрофагах человека// *Вестник Московского университета*. Серия 16: Биология. — 2022. — Т. 77, № 3. — С. 166–172.
7. 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 THP-1 при макрофагальной дифференцировке//Биохимия. – 2018. – Т. 83. – № 3. – С. 200-214.
8. 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-гр в провоспалительных макрофагах человека//Антибиотики и химиотерапия. – 2022. – Т. 67. – № 3-4. – С. 16-22.
9. Холодок, О.А., Григоренко, А.А., Черемкин, М.И. Туберкулема легкого как форма туберкулезного процесса//Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2014. – Т. 53. – С. 126-131.
10. Якушева Е.Н., Черных И.В., Шулькин А.В., Попова Н.М. Влияние гипоксии различных видов на функциональную активность и экспрессию гликопротеина Р // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. - 2016. - Т. 14. - № 1. - С. 71-77.
11. 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. – Т. 60. – № 3. – P. 1216-1225.
12. Abdin, S.M., Tolba, M.F., Zaher, D.M., Omar, H.A. Nuclear factor- κ B signaling inhibitors revert multidrug-resistance in breast cancer cells//*Chemico-biological interactions*. – 2021. – Т. 340.
13. Abengozar-Muela, M., Esparza, M.V., Garcia-Ros, D., Vásquez, C.E., Echeveste, J.I.,

- Idoate, M.A., Lozano, M.D., Melero, I., de Andrea C.E. Diverse immune environments in human lung tuberculosis granulomas assessed by quantitative multiplexed immunofluorescence//*Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*. – 2020. – T. 33. – № 12. – P. 2507-2519.
14. Adams, K.№, 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. – T. 210. – № 3. – P. 456-466.
 15. 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. – Vol. 18. – № 8. – P. 2062-2064.
 16. Al-Ghafli, H., Al-Hajoj, S. Clinical Management of Drug-resistant Mycobacterium tuberculosis Strains: Pathogen-targeted Versus Host-directed Treatment Approaches//*Current Pharmaceutical Biotechnology*. – 2019. – T. 20. – N 4. – P. 272-284.
 17. 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. – T. 323. – № 5922. – P. 1718-1722.
 18. Alsultan, A., Peloquin, C.A. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis: an update//*Drugs*. – 2014. – T. 74. – № 8. – P. 839-854.
 19. Andrade Júnior, D.R. de, Santos, S.A. dos, Castro, I. de, Andrade, D.R. de. Correlation between serum tumor necrosis factor alpha levels and clinical severity of tuberculosis//*The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. – 2008. – T. 12. – № 3. – P. 226-233.
 20. 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, №, Jarlier, V. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis//*Science*. – 2005. – T. 307. – № 5707. – P. 223-227.
 21. Asghar, A., Gorski, J.C., Haehner-Daniels, B., Hall, S.D. Induction of multidrug resistance-1 and cytochrome P450 mRNAs in human mononuclear cells by rifampin//*Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. – 2002. – T. 30. – № 1. – P. 20-26.
 22. Bandarra, D., Biddlestone, J., Mudie, S., Müller, H.-A.J., Rocha, S. HIF-1 α restricts NF- κ B-dependent gene expression to control innate immunity signals//*Disease Models & Mechanisms*. – 2015. – T. 8. – № 2. – P. 169-181.
 23. Becquemont, L., Camus, M., Eschwege, V., Barbu, V., Rey, E., Funck-Brentano, C., Jaillon, P. Lymphocyte P-glycoprotein expression and activity before and after rifampicin in man//*Fundamental & Clinical Pharmacology*. – 2000. – T. 14. – № 5. – P. 519-525.
 24. Behr, M.A., Edelstein, P.H., Ramakrishnan, L. Is Mycobacterium tuberculosis infection life long?//*BMJ*. – 2019. – P. 15770.
 25. Beig, T.Y., Khan, U.H., Ganie, B.A., Tahir, S., Shah, S., Dhobi, G.№ Correlation Between Serum Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) and Clinical Severity of Tuberculosis: A Hospital-Based Study//*Cureus*. – 2023. – T. 15. – № 2. – P. e35626.
 26. Belosludtsev, K.№, 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. – T. 1861. – № 1. – P. 288-297.
27. Belton, M., Brilha, S., Manavaki, R., Mauri, F., Nijran, K., Hong, Y.T., Patel, N.H., Dembek, M., Tezera, L., Green, J., Moores, R., Aigbirhio, F., Al-Nahhas, A., Fryer, T.D., Elkington, P.T., Friedland, J.S. Hypoxia and tissue destruction in pulmonary TB//*Thorax.* – 2016. – T. 71. – № 12. – P. 1145-1153.
 28. Bentires-Alj, M., Barbu, V., Fillet, M., Chariot, A., Relic, B., Jacobs, N., Gielen, J., Merville, M.-P., Bours, V. NF-kappaB transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells//*Oncogene.* – 2003. – T. 22. – № 1. – P. 90-97.
 29. Berg, T., Hegelund-Myrbäck, T., Öckinger, J., Zhou, X.-H., Brännström, M., Hagemann-Jensen, M., Werkström, V., Seidegård, J., Grunewald, J., Nord, M., Gustavsson, L. Expression of MATE1, P-gp, OCTN1 and OCTN2, in epithelial and immune cells in the lung of COPD and healthy individuals//*Respiratory Research.* – 2018. – T. 19. – № 1. – P. 68.
 30. 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. – Vol. 293. – № 10. – P. 3747.
 31. 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. – T. 1395. – P. 12-20.
 32. 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. – Vol. 97. – P. 105166.
 33. Bossenne, M., Di Roio, A., Caux, C., Ménétrier-Caux, C. MDR1 in immunity: friend or foe?//*Oncoimmunology.* – 2018. – T. 7. – N 12. – P. e1499388.
 34. Burel, J.G., Lindestam Arlehamn, C.S., Khan, N., Seumois, G., Greenbaum, J.A., Taplitz, R., Gilman, R.H., Saito, M., Vijayanand, P., Sette, A., Peters, B. Transcriptomic Analysis of CD4+ T Cells Reveals Novel Immune Signatures of Latent Tuberculosis//*Journal of Immunology.* – 2018. – T. 200. – № 9. – P. 3283-3290.
 35. 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. – T. 62. – № 8. – P. 613-619.
 36. 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. – T. 7. – № 10. – P. e47573.
 37. 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. – Vol. 22. – № 22. – P. 12189.
 38. Campbell, L., Abulrob, A.-N.G., 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. – T. 304. – N 1. – P. 441-452.
39. Chen, C., Gardete, S., Jansen, R.S., Shetty, A., Dick, T., Rhee, K.Y., Dartois, V. Verapamil Targets Membrane Energetics in Mycobacterium tuberculosis//Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2018. – T. 62. – № 5. –P. e02107-17.
 40. 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. – T. 217. – № 5. – P. e20191388.
 41. Chen, Q., Bian, Y., Zeng, S. Involvement of AP-1 and NF- κ B in the Up-regulation of P-gp in Vinblastine Resistant Caco-2 Cells//Drug Metabolism and Pharmacokinetics. – 2014. – Vol. 29. – № 2. – P. 223-226.
 42. Chen, Y., Tang, Y., Guo, C., Wang, J., Boral, D., Nie, D. Nuclear receptors in the multidrug resistance through the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters//Biochemical Pharmacology. – 2012. – T. 83. – № 8. – P. 1112-1126.
 43. Chen, Y.-L., Yang, T.-Y., Chen, K.-C., Wu, C.-L., Hsu, S.-L., Hsueh, C.-M. Hypoxia can impair doxorubicin resistance of non-small cell lung cancer cells by inhibiting MRP1 and P-gp expression and boosting the chemosensitizing effects of MRP1 and P-gp blockers//Cellular Oncology (Dordrecht). – 2016. – T. 39. – № 5. – P. 411-433.
 44. 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. – T. 20. – № 1. – P. 81.
 45. 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//Journal of Hepatology. – 2006. – T. 45. – № 1. – P. 117-126.
 46. 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. – T. 62. – № 1. – P. 159-168.
 47. Chufan, E.E., Kapoor, K., Sim, H.-M., Singh, S., Talele, T.T., Durell, S.R., Ambudkar, S.V. Multiple transport-active binding sites are available for a single substrate on human P-glycoprotein (ABCB1)//PloS One. – 2013. – T. 8. – № 12. – P. e82463.
 48. Churchyard, G., Kim, P., Shah, №S., Rustomjee, R., Gandhi, №, Mathema, B., Dowdy, D., Kasmar, A., Cardenas, V. What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview//The Journal of Infectious Diseases. – 2017. – T. 216. – № S6. – P. S629-S635.
 49. Comerford, K.M., Wallace, T.J., Karhausen, J., Louis, №A., Montalto, M.C., Colgan S.P. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene//Cancer Research. – 2002. – T. 62. – № 12. – P. 3387-3394.
 50. 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. – T. 33. – № 11. – P. 2713-2721.
 51. 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. – T. 184. – № 7. – P. 1757-1774.e14.

52. Danelishvili, L., McGarvey, J., Li, Y.-J., Bermudez, L.E. Mycobacterium tuberculosis infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells//Cellular Microbiology. – 2003. – T. 5. – № 9. – P. 649-660.
53. Dartois, V.A., Rubin, E.J. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities//Nature Reviews. – 2022. – P. 1-17.
54. Demitto, F. de O., do Amaral, R.C.R., Maltempe, F.G., Siqueira, V.L.D., Scodro, R.B. de L., Lopes, M.A., Caleffi-Ferracioli, K.R., Canezin, P.H., Cardoso, R.F. In vitro activity of rifampicin and verapamil combination in multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis//PloS One. – 2015. – T. 10. – № 2. –P. e0116545.
55. DiFazio, R.M., Mattila, J.T., Klein, E.C., Cirrincione, L.R., Howard, M., Wong, E.A., Flynn, J.L. Active transforming growth factor- β is associated with phenotypic changes in granulomas after drug treatment in pulmonary tuberculosis//Fibrogenesis & Tissue Repair. – 2016. – Vol. 9. – № 1. – P. 6.
56. 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. – T. 136. – № 11. – P. 1697-1707.
57. Domingo-Gonzalez R., Prince O., Cooper A., Khader S.A. Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis Infection//Microbiology Spectrum. – 2016. – T. 4. – № 5.
58. Dorhoi, A., Kaufmann, S.H.E. Tumor necrosis factor alpha in mycobacterial infection//Seminars in Immunology. – 2014. – T. 26. – № 3. – P. 203-209.
59. Drach, J., Gsur, A., Hamilton, G., Zhao, S., Angerler, J., Fiegl, M., Zojer, №, Raderer, M., Haberl, I., Andreeff, M., Huber, H. 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. – T. 88. – № 5. – P. 1747-1754.
60. Durk, M.R., Chan, G.№Y., Campos, C.R., Peart, J.C., Chow, E.C.Y., Lee, E., Cannon, R.E., Bendayan, R., Miller, D.S., Pang, K.S. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃-liganded vitamin D receptor increases expression and transport activity of P-glycoprotein in isolated rat brain capillaries and human and rat brain microvessel endothelial cells//Journal of Neurochemistry. – 2012. – T. 123. – № 6. – P. 944-953.
61. Dutta, R.K., Kathania, M., Raje, M., Majumdar, S. IL-6 inhibits IFN- γ induced autophagy in Mycobacterium tuberculosis H37Rv infected macrophages//The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2012. – T. 44. – № 6. – P. 942-954.
62. Endter, S., Becker, U., Daum, №, 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. – T. 328. – № 1. – P. 77-84.
63. Fardel, O., Lecreur, V., Loyer, P., Guillouzo, A. Rifampicin enhances anti-cancer drug accumulation and activity in multidrug-resistant cells//Biochemical Pharmacology. – 1995. – T. 49. – № 9. – P. 1255-1260.
64. 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. – T. 194. – № 2. – P. 180-191.
65. Fiorenza, G., Rateni, L., Farroni, M.A., Bogue, C., Dlugovitzky, D.G. TNF- α , TGF- β and NO relationship in sera from tuberculosis (TB) patients of different severity//Immunology Letters. – 2005. – Vol. 98. – № 1. – P. 45-48.

66. Fromm, M.F. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers//Trends in Pharmacological Sciences. – 2004. – T. 25. – № 8. – P. 423-429.
67. Fu, D. Where is it and How Does it Get There – Intracellular Localization and Traffic of P-glycoprotein//Frontiers in Oncology. – 2013. – T. 3. – P. 321.
68. 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. – Vol. 88. – № 6. – P. e12727.
69. Geick, A., Eichelbaum M., Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin//The Journal of Biological Chemistry. – 2001. – T. 276. – № 18. – P. 14581-14587.
70. Gern, B.H., Adams, K.№, 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. TGFβ restricts expansion, survival, and function of T cells within the tuberculous granuloma//Cell Host & Microbe. – 2021. – T. 29. – № 4. – P. 594-606.e6.
71. 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. – T. 10. – № 4. – P. 349.
72. Gidal, B.E. P-glycoprotein Expression and Pharmacoresistant Epilepsy: Cause or Consequence?//Epilepsy Currents. – 2014. – T. 14. – N 3. – P. 136-138.
73. 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. – T. 9. – P. e55692.
74. 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. – T. 59. – № 5. – P. 572-579.
75. 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. – T. 8. – № 6. – P. e1000407.
76. 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. – T. 21. – № 6. – P. 420-430.
77. 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//Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1994. – T. 199. – № 3. – P. 1181-1187.
78. Gottesman, M.M., Pastan, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter//Annual Review of Biochemistry. – 1993. – T. 62. – P. 385-427.
79. Grobbelaar, M., Louw, G.E., Sampson, S.L., van Helden, P.D., Donald, P.R., Warren, R.M. Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis//Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases. – 2019. – T. 74. – P. 103937.

80. 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. – T. 12. – № 6. – P. 451-458.
81. Gupta, S., Tyagi, S., Almeida, D.V., Maiga, M.C., Ammerman, №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. – T. 188. – № 5. – P. 600-607.
82. 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. – T. 59. – № 1. – P. 673-676.
83. 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. – T. 10. – № 10. – P.1572.
84. Harling, K., Adankwah, E., Güler, A., Afum-Adjei Awuah, A., Adu-Amoah, L., Mayatepek, E., Owusu-Dabo, E., Nausch, №, Jacobsen, M. Constitutive STAT3 phosphorylation and IL-6/IL-10 co-expression are associated with impaired T-cell function in tuberculosis patients//*Cellular and Molecular Immunology*. – 2019. – T. 16. – № 3. – P. 275-287.
85. 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 (Edinburgh, Scotland)*. – 2007. – T. 87. – № 3. – P. 248-255.
86. Hasanuzzaman, M., Yi, M., Cho, M., Parvez, M.M., Lee, S.-J., Shin, J.-G. Rifampin Induces Expression of P-glycoprotein on the THP1 Cell-Derived Macrophages, Causing Decrease Intramacrophage Concentration of Prothionamide//*Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2019. – T. 108. – № 9. – P. 3106-3111.
87. 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. – T. 374. – № 1. – P. 1-20.
88. Herr, A.S., Wochnik, G.M., Rosenhagen, M.C., Holsboer, F., Rein, T. Rifampicin is not an activator of glucocorticoid receptor. – 2000. – T. 57. – № 4. – P. 732-737.
89. Higgins, C.F., Gottesman, M.M. Is the multidrug transporter a flippase?//*Trends in Biochemical Sciences*. – 1992. – T. 17. – № 1. – P. 18-21.
90. Ho, E.A., Piquette-Miller, M. Regulation of multidrug resistance by pro-inflammatory cytokines//*Current Cancer Drug Targets*. – 2006. – T. 6. – № 4. – P. 295-311.
91. Hunter, R.L. The Pathogenesis of Tuberculosis–The Koch Phenomenon Reinstated//*Pathogens*. – 2020. – Vol. 9. – № 10. – P. 813.
92. 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. – T. 524. – № 3. – P. 629-636.
93. Ismail, №A., Omar, S.V., Moultrie, H., Bhyat, Z., Conradie, F. et.al. Assessment of epidemiological and genetic characteristics and clinical outcomes of resistance to bedaquiline in patients treated for rifampicin-resistant tuberculosis: a cross-sectional and longitudinal study//*The Lancet Infectious Diseases*. – 2022. – T. 22. – № 4. – P. 496-506.

94. 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. – T. 55. – № 5. – P. 841-846.
95. Jayaraman, P., Sada-Ovalle, I., Nishimura, T., Anderson, A.C., Kuchroo, V.K., Remold, H.G., Behar, S.M. IL-1 β Promotes Antimicrobial Immunity in Macrophages by Regulating TNFR Signaling and caspase-3 activation//*Journal of immunology*. – 2013. – T. 190. – № 8. – P. 4196-4204.
96. Juliano, R.L., Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants//*Biochimica Et Biophysica Acta*. – 1976. – T. 455. – № 1. – P. 152-162.
97. 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. – T. 126. – № 14. – P. 3043-3054.
98. Kanagasabai, R., Krishnamurthy, K., Druhan, L.J., Ilangovan, G. Forced expression of heat shock protein 27 (Hsp27) reverses P-glycoprotein (ABCB1)-mediated drug efflux and MDR1 gene expression in Adriamycin-resistant human breast cancer cells//*The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – T. 286. – № 38. – P. 33289-33300.
99. Kaur, M., Esau, L. Two-step protocol for preparing adherent cells for high-throughput flow cytometry//*BioTechniques*. – 2015. – T. 59. – № 3. – P. 119-126.
100. Kearns, M.D., Tangpricha, V. The role of vitamin D in tuberculosis//*Journal of Clinical & Translational Endocrinology*. – 2014. – T. 1. – № 4. – P. 167-169.
101. Khan, T.A., Mazhar, H., Saleha, S., Tipu, H.№, Muhammad, №, Abbas, M.№ Interferon-Gamma Improves Macrophages Function against *M. tuberculosis* in Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients//*Chemotherapy Research and Practice*. – 2016. – Vol. 2016. – P. e7295390.
102. Khoshnood, S., Goudarzi, M., Taki, E., Darbandi, A., Kouhsari, E., Heidary, M., Motahar, M., Moradi, M., Bazyar, H. Bedaquiline: Current status and future perspectives//*Journal of Global Antimicrobial Resistance*. – 2021. – Vol. 25. – P. 48-59.
103. Kim, B.-H., Shenoy, A.R., Kumar, P., Das, R., Tiwari, S., MacMicking, J.D. A family of IFN- γ -inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection//*Science*. – 2011. – T. 332. – № 6030. – P. 717-721.
104. 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 β as a Novel Mechanism of Rifampin-induced MDR1 Expression//*The Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – T. 290. – № 27. – P. 17029-17040.
105. Kissler, S., Stern, P., Takahashi, K., Hunter, K., Peterson, L.B., Wicker, L.S. In vivo RNA interference demonstrates a role for Nramp1 in modifying susceptibility to type 1 diabetes//*Nature Genetics*. – 2006. – T. 38. – № 4. – P. 479-483.
106. 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. – T. 83. – № 9. – P. 2451-2458.
107. Kooij, G., Backer, R., Koning, J.J., Reijerkerk, A., van Horssen, J., van der Pol, S.M.A.,

- Drexhage, J., Schinkel, A., Dijkstra, C.D., den Haan, J.M.M., Geijtenbeek, T.B.H., de Vries, H.E. P-glycoprotein acts as an immunomodulator during neuroinflammation//*PloS One*. – 2009. – T. 4. – № 12. – P. e8212.
108. 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. – T. 6. – № 7. – P. ofz257.
 109. Kumar, S., Mehta, K. Tissue Transglutaminase Constitutively Activates HIF-1 α Promoter and Nuclear Factor- κ B via a Non-Canonical Pathway//*PLoS ONE*. – 2012. – T. 7. – № 11. – P. e49321.
 110. 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. – T. 65. – № 11. – P. 4843-4849.
 111. 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//*The European Respiratory Journal*. – 1997. – T. 10. – № 8. – P. 1837-1843.
 112. Lee, B.K., Yun, Y., Park, K. PLA micro- and nano-particles//*Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – T. 107. – P. 176-191.
 113. Lee, J.S., Jung, I.D., Lee, C.-M., Noh, K.T., Park, J.W., Son, K.H., Heo, D.R., Shin, Y.K., Kim, D., Park, Y.-M. Venlafaxine inhibits the development and differentiation of dendritic cells through the regulation of P-glycoprotein//*International Immunopharmacology*. – 2011. – T. 11. – № 9. – P. 1348-1357.
 114. Lenaerts, A., Barry, C.E., Dartois, V. Heterogeneity in tuberculosis pathology, microenvironments and therapeutic responses//*Immunological Reviews*. – 2015. – T. 264. – № 1. – P. 288-307.
 115. Li, Y., Huang, L., Wei, X., Wen, J., Zhong, G., Huang, M., Bi, H. Regulation of P-glycoprotein gene expression by PKC/NF- κ B-PXR signaling pathway//*Yaoxue Xuebao*. – 2017. – T. 52. – P. 51-57.
 116. Li-Blatter, X., Nervi, P., Seelig, A. Detergents as intrinsic P-glycoprotein substrates and inhibitors//*Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2009. – T. 1788. – № 10. – P. 2335-2344.
 117. Liptrott, N.J., Penny, M., Bray, P.G., Sathish, J., Khoo, S.H., Back, D.J., Owen, A. The impact of cytokines on the expression of drug transporters, cytochrome P450 enzymes and chemokine receptors in human PBMC//*British Journal of Pharmacology*. – 2009. – T. 156. – № 3. – P. 497-508.
 118. Litwin, A., Brooks, S.M., Claes, F. A pilot study concerning the early immunosuppressive effects of rifampin in man//*Chest*. – 1974. – T. 65. – № 5. – P. 548-551.
 119. 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- κ b pathway in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis mice//*Scientific Reports*. – 2015. – T. 5. – P. 13558.
 120. 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. – Vol. 19. – № 1.
 121. Liu, R., Muliadi, V., Mou, W., Li, H., Yuan, J., Holmberg, J., Chambers, B.J., Ullah, N., 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. – Vol. 13. – № 1. – P. 5093.
122. 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. – T. 18. – № 7. – P. e0286056.
 123. 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. – T. 60. – № 2-3. – P. 373-380.
 124. Lyadova I.V., Panteleev A.V. Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers//Mediators of Inflammation. – 2015. – T. 2015. – P. 854507.
 125. 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. – Vol. 2022. – P. e2703635.
 126. Maeß, M.B., Wittig, B., Lorkowski, S. Highly efficient transfection of human THP-1 macrophages by nucleofection//Journal of Visualized Experiments: JoVE. – 2014. – № 91. – P. e51960.
 127. 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//European Journal of Pharmacology. – 2004. – T. 483. – № 1. – P. 19-28.
 128. Manceau, S., Giraud, C., Declèves, X., Batteux, F., Chouzenoux, S., Tang, R., Dauchy, S., Scherrmann, J.M., Weill, B., Morini, J.P., Perrot, J.Y., Tréluyer, J.M. Lack of P-glycoprotein induction by rifampicin and phenobarbital in human lymphocytes//International Journal of Pharmaceutics. – 2010. – T. 395. – № 1-2. – P. 98-103.
 129. 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. – T. 83. – № 1. – P. 324-338.
 130. Martinec, O., Biel, C., de Graaf, I.A.M., Huliciak, M., de Jong, K.P., Staud, F., Cecka, F., Olinga, P., Vokral, I., Cervený, L. Rifampicin Induces Gene, Protein, and Activity of P-Glycoprotein (ABCB1) in Human Precision-Cut Intestinal Slices//Frontiers in Pharmacology. – 2021. – T. 12. – P. 1364.
 131. Martinez, F.O., Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment//F1000Prime Reports. – 2014. – T. 6. – P. 13.
 132. Mathema, B., Andrews, J.R., Cohen, T., Borgdorff, M.W., Behr, M., Glynn, J.R., Rustomjee, R., Silk, B.J., Wood, R. Drivers of Tuberculosis Transmission//The Journal of Infectious Diseases. – 2017. – T. 216. – № S6. – P. S644-S653.
 133. McCaffrey, E.F., Donato, M., Keren, L., Chen, Z., Delmastro, A., Fitzpatrick, M.B., Gupta, S., Greenwald, N.F., Baranski, A., Graf, W., Kumar, R., Bosse, M., Fullaway, C.C., Ramdial, P.K., Forgó, E., Jojic, V., Van Valen, D., Mehra, S., Khader, S.A., Bendall, S.C., van de Rijn, M., Kalman, D., Kaushal, D., Hunter, R.L., Banaei, N., Steyn, A.J.C., Khatri, P., Angelo, M. The immunoregulatory landscape of human tuberculosis granulomas//Nature Immunology. – 2022. – Vol. 23. – № 2. – P. 318-329.

134. Mechetner, E.B., Schott, B., Morse, B.S., Stein, W.D., Druley, T., Davis, K.A., Tsuruo, T., Roninson, I.B. P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity//*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – T. 94. – № 24. – P. 12908-12913.
135. 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. – T. 164(12). – P. 6166-73.
136. Mohandas, S., Vairappan, B. Role of pregnane X-receptor in regulating bacterial translocation in chronic liver diseases//*World Journal of Hepatology*. – 2017. – T. 9. – № 32. – P. 1210-1226.
137. Murdaca, G., Colombo, B.M., Puppo, F. The role of Th17 lymphocytes in the autoimmune and chronic inflammatory diseases//*Internal and Emergency Medicine*. – 2011. – T. 6. – № 6. – P. 487-495.
138. Nocera, A.L., Meurer, A.T., Miyake, M.M., Sadow, P.M., Han, X., Bleier, B.S. Secreted P-glycoprotein is a noninvasive biomarker of chronic rhinosinusitis//*The Laryngoscope*. – 2017. – T. 127. – № 1. – P. E1-E4.
139. O'Donnell, J.L., Joyce, M.R., Shannon, A.M., Harmey, J., Geraghty, J., Bouchier-Hayes, D. Oncological implications of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) expression//*Cancer Treatment Reviews*. – 2006. – T. 32. – № 6. – P. 407-416.
140. 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. – Vol. 89. – № 18. – P. 8676-8680.
141. Othieno, C., Hirsch, C.S., Hamilton, B.D., Wilkinson, K., Ellner, J.J., Toossi, Z. Interaction of Mycobacterium tuberculosis-induced transforming growth factor beta1 and interleukin-10//*Infection and Immunity*. – 1999. – T. 67. – № 11. – P. 5730-5735.
142. Owen, A., Goldring, C., Morgan, P., Park, B.K., Pirmohamed, M. Induction of P-glycoprotein in lymphocytes by carbamazepine and rifampicin: the role of nuclear hormone response elements//*British Journal of Clinical Pharmacology*. – 2006. – T. 62. – № 2. – P. 237-242.
143. Pahari, S., Kaur, G., Negi, S., Aqdas, M., Das, D.K., Bashir, H., Singh, S., Nagare, M., Khan, J., Agrewala, J. № Reinforcing the Functionality of Mononuclear Phagocyte System to Control Tuberculosis//*Frontiers in Immunology*. – 2018. – T. 9. – P. 193.
144. 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. – T. 10. – P. 3042.
145. Park, H.-E., Lee, W., Shin, M.-K., Shin, S.J. Understanding the Reciprocal Interplay Between Antibiotics and Host Immune System: How Can We Improve the Anti-Mycobacterial Activity of Current Drugs to Better Control Tuberculosis?//*Frontiers in Immunology*. – 2021. – T. 12. – P. 703060.
146. 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. – T. 48. – № 4. – P. 720-727.
147. Park, H.-S., Back, Y.W., Jang, I.-T., Lee, K.-I., Son, Y.-J., Choi, H.-G., Dang, T.B., Kim, H.-J. Mycobacterium tuberculosis Rv2145c Promotes Intracellular Survival by STAT3 and

- IL-10 Receptor Signaling//Frontiers in Immunology. – 2021. – T. 12. – P. 666293.
148. Pathak, Y., Mishra, A., Choudhir, G., Kumar, A., Tripathi, V. Rifampicin and Letemovir as potential repurposed drug candidate for COVID-19 treatment: insights from an in-silico study//Pharmacological reports. – 2021. – T. 73. – № 3. – P. 926-938.
 149. Păunescu, E. In vivo and in vitro suppression of humoral and cellular immunological response by rifampicin//Nature. – 1970. – T. 228. – № 5277. –P. 1188-1190.
 150. Pavlova, E., Shaposhnikova, D., Petrichuk, S., Radygina, T., Erokhina, M. Quantitative Analysis of Latex Beads Phagocytosis by Human Macrophages Using Imaging Flow Cytometry with Extended Depth of Field (EDF)//Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). – 2023. – T. 2635. – P. 203-215.
 151. Pawlik, A., Baskiewicz-Masiuk, M., Machalinski, B., Gawronska-Szklarz, B. Involvement of P-gp in the process of apoptosis in peripheral blood mononuclear cells//International Immunopharmacology. – 2005. – T. 5. – № 5. – P. 821-828.
 152. Pennington, K.№, Taylor, J.A., Bren, G.D., Paya, C.V. IκB Kinase-Dependent Chronic Activation of NF-κB Is Necessary for p21WAF1/Cip1 Inhibition of Differentiation-Induced Apoptosis of Monocytes//Molecular and Cellular Biology. – 2001. – T. 21. – № 6. – P. 1930-1941.
 153. Perez-Guerrero, E.E., Gamez-Nava, J.I., Muñoz-Valle, J.F., Cardona-Muñoz, E.G., Bonilla-Lara, D., Fajardo-Robledo, №S., Nava-Zavala, A.H., Garcia-Cobian, T.A., Rincón-Sánchez, A.R., Murillo-Vazquez, J.D., Cardona-Müller, D., Vazquez-Villegas, M.L., Totsuka-Sutto, S.E., Gonzalez-Lopez, L. Serum levels of P-glycoprotein and persistence of disease activity despite treatment in patients with systemic lupus erythematosus//Clinical and Experimental Medicine. – 2018. – T. 18. – № 1. – P. 109-117.
 154. Perez-Guerrero, E.E., Gonzalez-Lopez, L., Muñoz-Valle, J.F., Vasquez-Jimenez, J.C., Ramirez-Villafaña, M., Sanchez-Rodriguez, E.№, Gutierrez-Ureña, S.R., Cerpa-Cruz, S., Aguilar-Chavez, E.A., Cardona-Muñoz, E.G., Vazquez-Villegas, M.L., Saldaña-Cruz, A.M., Rodriguez-Jimenez, №A., Fajardo-Robledo, №S., Gamez-Nava, J.I. Serum P-glycoprotein level: a potential biomarker of DMARD failure in patients with rheumatoid arthritis//Inflammopharmacology. – 2018.
 155. Perrin, C., Athersuch, K., Elder, G., Martin, M., Alsalhani, A. Recently developed drugs for the treatment of drug-resistant tuberculosis: a research and development case study//BMJ Global Health. – 2022. – T. 7. – № 4. – P. e007490.
 156. 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. – T. 358. – № 3. – P. 793-805.
 157. 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. – T. 12. – P. 679458.
 158. Ponnusamy, №, Arumugam, M. Meta-analysis of active tuberculosis gene expression ascertains host directed drug targets//Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2022. – T. 12. – P. 1010771.
 159. Pontual, Y., Pacheco, V.S.S., Monteiro, S.P., Quintana, M.S.B., Costa, M.J.M., Rolla, V.C., de Castro, L. ABCB1 gene polymorphism associated with clinical factors can predict drug-

- resistant tuberculosis//Clinical Science. – 2017. – T. 131. – № 15. – P. 1831-1840.
160. 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. – T. 25. – № 22. – P. 10504-10520.
 161. 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//Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology. – 1999. – T. 79. – № 10. – P. 1299-1309.
 162. Queval, C.J., Song, O.-R., Deboosère, N., Delorme, V., Debrie, A.-S., Iantomasi, R., Veyron-Churlet, R., Jouny, S., Redhage, K., Deloison, G., Baulard, A., Chamailard, M., Loch, C., Brodin, P. STAT3 Represses Nitric Oxide Synthesis in Human Macrophages upon Mycobacterium tuberculosis Infection//Scientific Reports. – 2016. – T. 6. – P. 29297.
 163. Ramesh, R., Kozhaya, L., McKeivitt, K., Djuretic, I.M., Carlson, T.J., Quintero, M.A., McCauley, J.L., Abreu, M.T., Unutmaz, D., Sundrud, M.S. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids//The Journal of Experimental Medicine. – 2014. – T. 211. – № 1. – P. 89-104.
 164. Rapposelli, S., Digiacomio, M., Balsamo, A. P-gp transporter and its role in neurodegenerative diseases//Current Topics in Medicinal Chemistry. – 2009. – T. 9. – N 2. – P.209-217.
 165. Richaud-Patin, Y., Soto-Vega, E., Jakez-Ocampo, J., Llorente, L. P-glycoprotein in autoimmune diseases//Autoimmunity Reviews. – 2004. – T. 3. – № 3. – P. 188-192.
 166. 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. – T. 316. – № 6031. – P. 817-819.
 167. 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//The Journal of Biological Chemistry. – 2011. – T. 286. – № 45. – P. 39489-39496.
 168. 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. – T. 18. – № 7. – P. 1644-1651.
 169. 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. – T. 95. – № 5. – P. 532-537.
 170. 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//The Journal of Biological Chemistry. – 2005. – T. 280. – № 4. – P. 2857-2862.
 171. Rottenberg, M.E., Carow, B. SOCS3 and STAT3, major controllers of the outcome of infection with Mycobacterium tuberculosis//Seminars in Immunology. – 2014. – T. 26. – № 6. – P. 518-532.
 172. Safa, A.R. Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators//Current Medicinal Chemistry. Anti-

- Cancer Agents. – 2004. – T. 4. – № 1. – P. 1-17.
173. 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. – T. 174. – № 8. – P. 4852-4859.
 174. 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. – T. 220. – № 6. – P. e20221392.
 175. Scheffer, G.L., Pijnenborg, A.C.L.M., 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. – T. 55. – № 5. – P. 332-339.
 176. 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//Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1997. – T. 94. – № 8. – P. 4028-4033.
 177. Schinkel, A.H., Mol, C.A., Wagenaar, E., van Deemter, L., Smit, J.J., Borst, P. Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice//European Journal of Cancer (Oxford, England). – 1995. – T. 31A. – № 7-8. – P. 1295-1298.
 178. Schwende, H., Fitzke, E., Ambs, P., Dieter, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3//Journal of Leukocyte Biology. – 1996. – T. 59. – № 4. – P. 555-561.
 179. Shapiro, A.B., Ling, V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities//European Journal of Biochemistry. – 1997. – T. 250. – № 1. – P. 130-137.
 180. 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. – T. 254. – № 1. – P. 181-188.
 181. 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. – T. 3. – P. 3.
 182. 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. – T. 4. – P. 41.
 183. Sharom, F.J. The P-glycoprotein multidrug transporter//Essays in Biochemistry. – 2011. – T. 50. – № 1. – P. 161-178.
 184. Sia, J.K., Rengarajan, J. Immunology of Mycobacterium tuberculosis infections//Microbiology spectrum. – 2019. – T. 7. – № 4. – P.10.1128/microbiolspec.GPP3-0022-2018.
 185. Sigal, №, 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. – T. 83. – № 6. – P. 2358-2368.

186. Silva Miranda, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F., Altare, F. The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria?//*Clinical & Developmental Immunology*. – 2012. – T. 2012. – P. 139127.
187. Silvério, D., Gonçalves, R., Appelberg, R., Saraiva, M. Advances on the Role and Applications of Interleukin-1 in Tuberculosis//*mBio*. – 2021. – Vol. 12. – № 6. – P. e03134-21.
188. Smani, Y., Domínguez-Herrera, J., Pachón, J. Rifampin protects human lung epithelial cells against cytotoxicity induced by clinical multi and pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii*//*The Journal of Infectious Diseases*. – 2011. – T. 203. – № 8. – P. 1110-1119.
189. Smith, D., Hänsch, H., Bancroft, G., Ehlers, S. T-cell-independent granuloma formation in response to *Mycobacterium avium*: role of tumour necrosis factor- α and interferon- γ //*Immunology*. – 1997. – Vol. 92. – № 4. – P. 413-421.
190. 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 κ B Kinase)-p65 Pathway to Attenuate Vascular Inflammation in Diabetic db/db Mice//*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2019. – T. 39. – № 4. – P. 719-730.
191. Staud, F., Ceckova, M., Micuda, S., Pavek P. Expression and function of p-glycoprotein in normal tissues: effect on pharmacokinetics//*Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. – 2010. – T. 596. – P. 199-222.
192. Subbian, S., Tsenova, L., Kim, M.-J., Wainwright, H.C., Visser, A., Bandyopadhyay, N., Bader, J.S., Karakousis, P.C., Murrmann, G.B., Bekker, L.-G., Russell, D.G., Kaplan, G. Lesion-Specific Immune Response in Granulomas of Patients with Pulmonary Tuberculosis: A Pilot Study//*PLoS ONE*. – 2015. – T. 10. – № 7. – P. e0132249.
193. Suresh, M.V., Balijepalli, S., Solanki, S., Aktay, S., Choudhary, K., Shah, Y.M., Raghavendran, K. Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Its Role in Lung Injury: Adaptive or Maladaptive//*Inflammation*№ – 2023. – T. 46. – № 2. – P. 491-508.
194. 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. – T. 14. – № 1. – P. 57-64.
195. 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. – T. 8. – P. 13129.
196. Takashiba, S., Van Dyke, T.E., Amar, S., Murayama, Y., Soskolne, A.W., Shapira, L. Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB//*Infection and Immunity*. – 1999. – T. 67. – № 11. – P. 5573-5578.
197. 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. – Vol. 8. – № 4.
198. 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. – T. 58. – P. 271-291.
199. Tiberi, S., du Plessis, N., Walzl, G., Vjecha, M.J., Rao, M., Ntoumi, F., Mfinanga, S., Kapata, N., Mwaba, P., McHugh, T.D., Ippolito, G., Migliori, G.B., Maeurer, M.J., Zumla, A. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies//The Lancet. Infectious Diseases. – 2018. – T. 18. – № 7. – P. e183-e198.
 200. Tobin, D.M. Host-Directed Therapies for Tuberculosis//Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. – 2015. – T. 5. – № 10. – P. a021196.
 201. 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. – T. 86. – N 5. – P. 1075-1087.
 202. 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. – T. 8. –P. 49.
 203. van Loo, G., Bertrand, M.J.M. Death by TNF: a road to inflammation//Nature Reviews Immunology. – 2023. – Vol. 23. – № 5. – P. 289-303.
 204. Veldman, C.M., Cantorna, M.T., DeLuca, H.F. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system//Archives of biochemistry and biophysics. – 2000. – Vol. 374. – No. 2.
 205. 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. – T. 63. – № 9. – P. e00705-19.
 206. 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. – T. 11. – P. 669394.
 207. 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. – T. 25. – № 3. – P. 76.
 208. Worley, M.V., Estrada, S.J. Bedaquiline: a novel antitubercular agent for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis//Pharmacotherapy. – 2014. – T. 34. – № 11 – P. 1187-1197.
 209. Wu, Q., Hossfeld, A., Gerberick, A., Saljoughian, N., Tiwari, C., Mehra, S., Ganesan, L.P., Wozniak, D.J., Rajaram, M.V.S. 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. – T. 220. – № 12. – P. 1989-1998.
 210. Xie, A., Robles, R.J., Mukherjee, S., Zhang, H., Feldbrügge, L., Csizmadia, E., Wu, Y., Enjyoji, K., Moss, A.C., Otterbein, L.E., Quintana, F.J., Robson, S.C., Longhi, M.S. HIF-1 α -induced xenobiotic transporters promote Th17 responses in Crohn's disease//Journal of autoimmunity. – 2018. – T. 94. – P. 122-133.
 211. 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. – T. 62. – № 1. – P. e01692-17.
212. 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. – T. 24. – № 36. – P. 5552-5560.
 213. 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. – T. 11. – № 9. – P. e0161346.
 214. Yamansarov E.Y., Lopatukhina E.V., Evteev S.A., Skvortsov D.A., Lopukhov A.V., Kovalev S.V., Vaneev A.№, Shkil' D.O., Akasov R.A., Lobov A.№, Naumenko V.A., Pavlova E.№, Ryabaya O.O., Burenina O.Y., Ivanenkov Y.A., Klyachko №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. – T. 32. – № 4. – P. 763-781.
 215. 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 NFkappaB//Genes & Development. – 2007. – T. 21. – № 11. – P. 1396-1408.
 216. 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. – T. 22. – № 1. – P. 37-47.
 217. Young, C., Walzl, G., Du Plessis, № Therapeutic host-directed strategies to improve outcome in tuberculosis//Mucosal Immunology. – 2020. – Vol. 13. – № 2. – P. 190-204.
 218. Yuhas, Y., Berent, E., Ashkenazi, S. Effect of rifampin on production of inflammatory mediators in HepG2 liver epithelial cells//Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2011. – T. 55. – № 12. – P. 5541-5546.
 219. 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. – T. 53. – № 4. – P. 1539-1545.
 220. 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. – T. 15. – № 6. – P. e0233993.
 221. 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. – T. 6. – № 6. – P. e20965.
 222. 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. – T. 264. – № 5155. – P. 95-98
 223. 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. – T. 116. – № 8. – P. 2280-2289.

224. Zhou, S.-F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition//*Xenobiotica*. – 2008. – T. 38. – № 7-8. – P. 802-832.
225. Ziglam, H.M., Daniels, I., Finch, R.G. Immunomodulating activity of rifampicin//*Journal of Chemotherapy*. – 2004. – T. 16. – № 4. – P. 357-361.
226. 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. – T. 72. – № 7. – P. 1901-1906.