

Влияние рифампицина на индукцию активности *MDR1/P-gp* в провоспалительных макрофагах человека

Е. Н. ПАВЛОВА¹, *М. В. ЕРОХИНА^{1,2}, Е. Ю. РЫБАЛКИНА^{2,3},
Д. М. ПОТАШНИКОВА¹, А. Г. МАСЮТИН^{1,2}, Л. Н. ЛЕПЕХА², А. Э. ЭРГЕШОВ²

¹ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

² ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулёза», Москва, Российская Федерация

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина Минздрава России», Москва, Российская Федерация

The Effect of Rifampicin on the Induction of *MDR1/P-gp* Activity in Proinflammatory Human Macrophages

EKATERINA N. PAVLOVA¹, *MARIA V. EROKHINA^{1,2}, EKATERINA YU. RYBALKINA^{2,3},
DARIA M. POTASHNIKOVA¹, ALEXANDER G. MASYUTIN^{1,2},
LARISA N. LEPEKHA², ATADZHAN E. ERGESHOV²

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

² Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

³ National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Резюме

Актуальность. Влияние на активность белка множественной лекарственной устойчивости Р-гликопротеина (Р-гр, ген *MDR1*) в провоспалительных (M1) макрофагах человека рассматривается в качестве одной из перспективных стратегий повышения эффективности лечения больных туберкулёзом лёгких: активность Р-гр является фактором, который может снижать внутриклеточное накопление рифампицина (RIF) — субстрата для Р-гр.

Цель работы: выявить влияние терапевтической концентрации RIF на активность Р-гр в M1 макрофагах человека. Поставлены задачи: определить уровни экспрессии гена *MDR1*, белка Р-гр и его функциональной активности на разных сроках дифференцировки клеток и при действии RIF.

Материал и методы. В работе использованы следующие клеточные линии: суспензионные клетки промиелоцитарной лейкемии THP-1 и индуцированные по провоспалительному фенотипу фтороболовым эфиром макрофаги THP-1. Суспензионные клетки миелобластной лейкемии K562/IS-9 с трансфицированным геном *MDR1* использовались в качестве группы сравнения. Важным фактором является выбор экспериментальной концентрации RIF: у больных туберкулёзом лёгких средняя концентрация препарата составляет 10 мкг/мл. В работе использованы методы ОТ-ПЦР, иммуноцитохимии, проточной цитометрии.

Результаты и обсуждение. Выявлена индукция экспрессии гена *MDR1* в M1-макрофагах при краткосрочном воздействии «терапевтической» концентрации RIF. Этот эффект характерен только для макрофагов THP-1, в которых регистрируется значительная функциональная активность Р-гр. В клетках, в которых активность Р-гр не выявляется (суспензионные клетки THP-1), такая индукция не происходит. Это свидетельствует о наличии разных механизмов влияния RIF на *MDR1*, что может быть использовано для разработки стратегии ингибирования Р-гр в макрофагах воспаления.

Заключение. Учитывая ключевую роль макрофагов при туберкулёзе, необходима дальнейшая оценка *MDR1/P-gp* в операционном материале больных туберкулёзом лёгких, что позволит сделать вывод о необходимости разработки и применения лекарственных стратегий, направленных на блокировку функциональной активности Р-гр и выборе более эффективных схем противотуберкулёзной терапии.

Ключевые слова: рифампицин; провоспалительные макрофаги; *MDR1*; Р-гликопротеин; Р-гр

Для цитирования: 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 *MDR1/P-gp* в провоспалительных макрофагах человека. *Антибиотики и химиотерапия*. 2022; 67: 3–4: 16–22. doi: 10.37489/0235-2990-2022-67-3-4-16-22.

Abstract

Background. The effect on the activity of the multidrug resistance protein P-glycoprotein (P-gp, *MDR1* gene) in pro-inflammatory (M1) human macrophages is considered one of the promising strategies for increasing the effectiveness of the treatment in patients with pulmonary tuberculosis: P-gp activity is considered a factor that reduces intracellular accumulation of rifampicin (RIF), a substrate for P-gp.

© Коллектив авторов, 2022

*Адрес для корреспонденции: Каширское шоссе, 24, НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина, г. Москва, Российская Федерация, 115522. E-mail: erokhina@bk.ru

© Team of Authors, 2022

*Correspondence to: 24 Kashirskoe highway, Moscow, Russian Federation. E-mail: erokhina@bk.ru

The aim of this work was to reveal the effect of the therapeutic concentration of RIF on the activity of P-gp in M1 human macrophages. The objectives were as follows: to determine the expression levels of the *MDR1* gene, P-gp protein, as well as its functional activity at different periods of cell differentiation and under the influence of RIF.

Material and methods. The following cell lines were used in the work: suspension cells of promonocytic leukemia THP-1 and THP-1 macrophages induced by phorbol ether according to the pro-inflammatory phenotype. Suspension cells of myeloid leukemia K562/IS-9 transfected with the *MDR1* gene were used as a comparison group. An important factor is the choice of the experimental concentration of RIF: the average concentration of the drug in patients with pulmonary tuberculosis was 10 µg/ml. The methods of RT-PCR, immunocytochemistry, and flow cytometry were used in the work.

Results and discussion. The induction of *MDR1* gene expression in M1 macrophages under short-term exposure to a therapeutic concentration of RIF was revealed. This effect is typical only for THP-1 macrophages, in which a significant functional activity of P-gp is registered. This induction does not occur in the cells with no detectable P-gp activity (THP-1 suspension cells). This indicates the presence of different mechanisms of RIF influence on *MDR1*, which can be used to develop a strategy for P-gp inhibition in inflammatory macrophages.

Conclusion. Given the key role of macrophages in tuberculosis, further evaluation of *MDR1*/P-gp in the surgical material of patients with pulmonary tuberculosis is necessary, which makes it possible to draw a conclusion that it is necessary to develop and apply drug strategies aimed at blocking the functional activity of P-gp and choosing more effective anti-tuberculosis therapy regimens.

Keywords: proinflammatory macrophages; *MDR1*; P-glycoprotein; P-gp

For citation: Pavlova E. N., Erokhina M. V., Rybalkina E. Yu., Potashnikova D. M., Masyutin A. G., Lepekha L. N., Ergeshov A. E. The effect of rifampicin on the induction of *MDR1*/P-gp activity in proinflammatory human macrophages. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2022; 67: 3–4: 16–22. doi: 10.37489/0235-2990-2022-67-3-4-16-22.

Введение

Туберкулёз лёгких входит в десятку ведущих причин смертности в мире: несмотря на успехи антибактериальной терапии, наблюдается увеличение доли его лекарственно-устойчивых форм [1]. Развитие данной тенденции ставит вопрос не только об изучении механизмов резистентности возбудителя туберкулёза и путях её преодоления, но и о повышении эффективности лечения в результате разработки новых, научно-обоснованных стратегий, направленных на организм самого больного [2]. Следует отметить, что до сих пор недостаточно изучены и учитываются в клинической практике механизмы, снижающие накопление противотуберкулёзных препаратов в области туберкулёзного воспаления за счёт активности специальных белков-экспортёров клеток организма человека. Особую роль среди таких белков-экспортёров играют «белки множественной лекарственной устойчивости» и их наиболее яркий представитель — Р-гликопротеин (Р-гр, кодируется геном *MDR1*). Изучение влияния Р-гр на эффективность противотуберкулёзных препаратов рассматривается в качестве одной из перспективных организм-ориентированных стратегий, направленных на повышение эффективности лечения больных туберкулёзом [3].

В настоящее время известно не менее 300 субстратов Р-гр, к которым относятся лекарственные препараты различного спектра действия, в том числе и один из основных противотуберкулёзных препаратов рифампицин (RIF) [4]. Одно из преимуществ RIF является его эффективность против внутриклеточных форм *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ): его внутриклеточная концентрация может превышать внеклеточную в 4–5 раз [5].

Это является особенно актуальным при его действии на инфицированные макрофаги.

При туберкулёзе лёгких макрофаги воспаления выполняют ключевые функции, как клетки, формирующие защитную гранулёматозную реакцию, регулирующие характер воспалительного процесса и осуществляющие фагоцитоз *M. tuberculosis* [6]. От их функциональной активности зависит успешность элиминации внутриклеточных форм МБТ. Изучение молекулярных и клеточных механизмов, через которые возможно терапевтически «улучшить» или изменить потенции макрофагов, в настоящее время рассматривается в качестве одной из перспективных стратегий повышения эффективности лечения больных туберкулёзом лёгких [7]. В этой связи актуальным является вопрос о влиянии RIF на экспрессию гена *MDR1* и его белка Р-гр в модели макрофагов человека, характеризующихся провоспалительным фенотипом. При этом важным является выбор экспериментальной концентрации препарата, которая соответствует терапевтической: показано, что средняя концентрация RIF в крови и в области гранулём у больных туберкулёзом лёгких составляет 10 мкг/мл [8, 9]. Таким образом, цель данного исследования — выявить влияние терапевтической концентрации RIF на активность Р-гр в провоспалительных макрофагах человека. Для реализации цели исследования поставлены задачи охарактеризовать изменение экспрессии гена *MDR1*, уровня Р-гр на плазматической мембране клеток и его функциональной активности при разных функциональных состояниях макрофагов — в процессе их дифференцировки и при действии RIF в терапевтической концентрации. В условиях *in vitro* классическим индуктором макрофагальной дифференцировки яв-

ляется форболовый эфир (PMA). Ранее нами была отработана и охарактеризована модель индукции в клетках THP-1 активации/дифференцировки по провоспалительному типу M1 макрофагов [10]. Для изучения фенотипа макрофагов моноцитарные клетки человека линии THP-1 представляют собой удобную и широко используемую модельную систему.

Материал и методы

Клеточные линии. В работе были использованы следующие клеточные линии: 1) суспензионные клетки промоноцитарной лейкемии THP-1 (Российская коллекция клеточных культур, Санкт-Петербург) и индуцированные по провоспалительному фенотипу форболовым эфиром (PMA, 12-O-tetradecanoyl-13-phorbol myristate, Sigma, США) макрофаги THP-1; 2) суспензионные клетки миелобластной лейкемии K562/IS-9 с трансфицированным геном MDR1 [11] (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). Культивирование проводилось в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, Южная Америка), 2 mM L-глутамина (ПанЭко, Россия) при 37°C и 5% CO₂. Для индукции провоспалительной макрофагальной дифференцировки клеток THP-1 использовали 100 нМ PMA, согласно методике Курыниной А. В. [10].

Схема эксперимента. Стоковая концентрация RIF (Sigma-Aldrich, США) составляла 50 мг/мл в ДМСО. Исходные клетки THP-1 культивировали с 10 мкг/мл RIF в течение 28 дней. К дифференцированным в макрофагальном направлении THP-1, добавляли 10 мкг/мл RIF через 72 ч дифференцировки и культивировали в течение 96 ч (в связи с ограниченными сроками их жизнеспособности после индукции дифференцировки). Согласно нашим ранее полученным данным, 10 мкг/мл RIF является субтоксической концентрацией для суспензионных клеток THP-1 и не оказывает влияние на жизнеспособность макрофагов THP-1 [12, 13].

ОТ-ПЦР в реальном времени. Тотальную РНК выделяли с помощью Trizol-Reagent (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию РНК определяли на спектрофотометре NanoVue Plus (GE Healthcare, США). Для синтеза кДНК использовали 500 нг тотальной РНК. Обратную транскрипцию и ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем EvaGreen проводили в соответствии с протоколом производителя (все наборы реагентов Синтол, Россия). Использовали следующие последовательности праймеров (Евроген, Россия): MDR1: прямой — GGGATGGTCAGTGTTCATGGA, обратный — GCTATCGTGGTGGCAACAATA, длина 110 п.н.; RPL27: прямой — ACCGCTACCCCGCAAAGTG, обратный — CCCGTCGGGCGCTTGGTTA, длина 198 п.н. Реакцию проводили в амплификаторе CFX96 Touch. Продукты ПЦР проверяли на специфичность методом кривой плавления в программном обеспечении Bio-Rad CFX Manager. Нормализацию результатов проводили по экспрессии гена RPL27. Уровень экспрессии генов оценивали по значению $R = 2^{-\Delta C_t}$. Для каждого образца было выполнено три технических повтора.

Проточная цитометрия. Иммуноцитохимическое выявление P-gr. Использовали моноклональные мышиные антитела, конъюгированные с изотиоцианатом флуоресцина (FITC), клон 17F9 (BD Biosciences, кат. номер 557002, США), согласно протоколу производителя. Интенсивность флуоресценции представлена в виде отношения медианы интенсивности флуоресценции меченых антителами клеток к медиане интенсивности аутофлуоресценции немеченых клеток.

Оценка функциональной активности P-gr. Клетки инкубировали в течение 30 мин в RPMI-1640 без сыворотки с 5 мМ Родамина 123 (Sigma Aldrich, США) при температуре 4°C (на льду) в темноте, затем дважды отмывали в фосфатно-со-

левом буфере при температуре 4°C. Далее клетки инкубировали в среде без сыворотки 30 мин при 37°C в CO₂ инкубаторе в отсутствии или присутствии 22 мМ ингибитора P-gr винбластина. Для оценки функциональной активности P-gr определяли фактор активности P-gr:

$$FA_{P-gr} = ((MIF^1 - MIF^2) / MIF^1) \times 100 (\%);$$

где: MIF — медиана интенсивности флуоресценции клеток; MIF¹ — выброс родамина 123 в присутствии ингибитора; MIF² — выброс родамина 123 в культуральной среде. Интенсивность флуоресценции родамина 123 регистрировали в канале FITC.

Программное обеспечение. Интенсивность флуоресценции регистрировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) с использованием программы Cell Quest или FACS Aria SORP с помощью программного обеспечения FACSDiva Software: для антител, конъюгированных с FITC и Родамина 123 использовали синий возбуждающий лазер (488 нм, 60 мВт) и фильтры обнаружения 530/30 нм. Записывали 30 000 событий. Каждый эксперимент был проведен в трёх независимых повторах. Для дальнейшего анализа и визуализации полученных на FACS Aria SORP данных использовалось программное обеспечение Flowing Software 2.5.1.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ полученных результатов проводился при помощи MS Excel v.16.37 или в программном пакете GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США). Соответствие данных нормальному распределению проверяли критерием Шапиро-Уилка, для проверки равенства дисперсий — критерий Фишера. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Для сравнения результатов, соответствующих нормальному распределению и с равными дисперсиями, использовали *t*-критерии Стьюдента или One-Way ANOVA с последующим тестом Тьюки-Крамера.

Результаты исследования

Анализ индукции экспрессии гена MDR1

Результаты ОТ-ПЦР экспериментов суммированы на рис. 1. В исходных клетках THP-1 уровень экспрессии гена *MDR1* определяется на уровне $0,071 \pm 0,038$ у. е., который является достаточно низким, по сравнению с K562/IS-9 с трансфицированным геном *MDR1*. Для этих клеток относительный уровень экспрессии равен $38,0 \pm 0,009$ у. е.

После длительного культивирования в присутствии RIF уровень экспрессии гена *MDR1* в суспензионных клетках THP-1 составил $0,008 \pm 0,006$ у. е. Таким образом, субтоксическая концентрация RIF не только не индуцировала экспрессию гена *MDR1* в суспензионных клетках THP-1, но и статистически значимо снижала её.

В экспериментальной модели макрофагов THP-1 уровень экспрессии гена *MDR1* составляет $0,28 \pm 0,09$ у. е. на 3-и сутки (THP1+PMA_3c) и $0,30 \pm 0,07$ у. е. — на 7-е сутки (THP1+PMA_7c) дифференцировки: по сравнению с исходной суспензионной клеточной линией THP-1 уровень экспрессии гена возрастает в 4 раза (см. рис. 1).

Для того чтобы оценить влияние RIF на экспрессию гена *MDR1* препарат был добавлен в среду культивирования на 3-и сутки дифференцировки: к этому сроку формируются макрофаги THP-1 с провоспалительными фенотипом [10].

Уровень экспрессии гена *MDR1* после культивирования с RIF составляет $0,50 \pm 0,057$ у. е. против $0,30 \pm 0,07$ у. е. в контрольных клетках, и представленные различия являются статистически значимыми ($p=0,02$). Таким образом, инкубация макрофагальных клеток в присутствии 10 мкг/мл RIF увеличивает уровень экспрессии гена *MDR1* в 1,7 раза.

Иммуоцитохимическое выявление Р-гр

Иммуоцитохимическое мечение антителами не выявило присутствие Р-гр на плазматической мембране суспензионных клеток THP-1: интенсивность флуоресценции меченых антителами клеток не отличалась от немеченых. После их длительного культивирования в присутствии RIF уровень интенсивности флуоресценции остался на том же уровне и составил $1,3 \pm 0,05$ для клеток THP-1 (рис. 2).

Для клеток THP-1 на 3-и сутки дифференцировки (THP1+PMA_3c) это соотношение составляет уже $2,235 \pm 0,265$ и $2,035 \pm 0,205$ — на 7-е сутки (THP1+PMA_7c) дифференцировки, то есть между 3- и 7-ми сутками макрофагальной дифференцировки не обнаруживается статистически значимых различий. Но в сравнении с исходными суспензионными клетками THP-1 интенсивность флуоресценции статистически значимо возрастает в 1,8–1,9 раза ($p=0,049$). После воздействия RIF (THP1+PMA_Риф_4с) уровень интенсивности флуоресценции составляет $2,38 \pm 0,12$ (см. рис. 2). По сравнению с макрофагами на 7-й день дифференцировки (THP-1+PMA_7c) данные статистически значимо не различаются. Таким образом, увеличение экспрессии гена *MDR1* в процессе дифференцировки приводит к выявлению Р-гр на плазматической мембране макрофагальных клеток, но культивирование макрофагов с терапевтической концентрацией RIF в течение 4 сут не приводит к увеличению уровня Р-гр на плазматической мембране.

Определение фактора активности Р-гр

Анализ накопления родамина 123, его выброса и ингибирования винбластином показал, что после инкубации с RIF в течение 4 суток средние значения ФАР-гр для макрофагов THP-1 составляют $65,5 \pm 10,24$ и статистически значимо не отличаются от средних значений ФАР-гр для контрольных макрофагов THP-1 (рис. 3, а). В присутствии 22 мкМ винбластина выброс родамина 123 полностью ингибируется, и кривые интенсивности флуоресценции выброса родамина 123 совпадают с кривыми его накопления на всех сроках дифференцировки (рис. 3, б). Несмотря на сравнительно невысокие уровни иммуоцитохимического выявления Р-гр на плазматической мембране клеток, данный показатель свидетельствует о высокой функциональной активности Р-гр в клетках THP-1 при их дифференцировке.

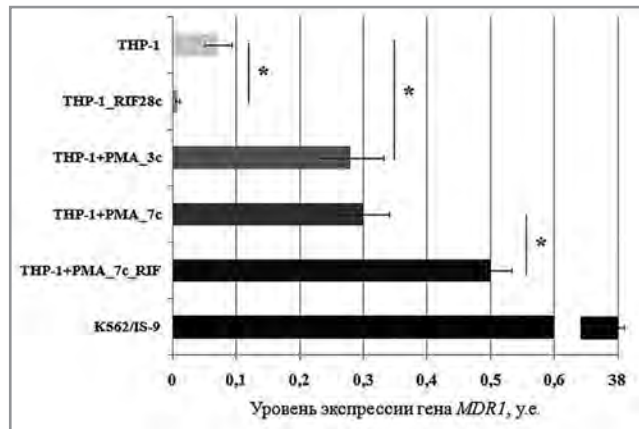


Рис. 1. Гистограмма изменения экспрессии гена *MDR1* при действии RIF в суспензионных клетках и провоспалительных макрофагах THP-1.

Примечание. На графике представлены средние значения относительного уровня экспрессии гена в условных единицах (у. е.) по результатам 3 экспериментов. Метод ОТ-ПЦР в реальном времени. * — статистически значимые различия при $p < 0,05$.

Fig. 1. Histogram of changes in *MDR1* gene expression under the influence of RIF in suspension cells and pro-inflammatory macrophages THP-1.

Note. The graph shows the average values of the relative level of gene expression in conventional units (c.u.) based on the results of 3 experiments. Real-time RT-PCR method. * — statistically significant differences at $P < 0.05$.

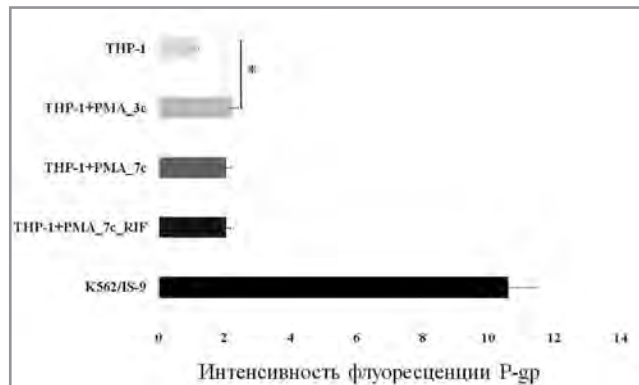


Рис. 2. Гистограмма иммуоцитохимического выявления Р-гр под действие RIF в суспензионных клетках и в провоспалительных макрофагах THP1.

Примечание. На графиках представлены средние значения отношения медиан интенсивности флуоресценции окрашенных антителами клеток к медиане интенсивности неокрашенных клеток $\pm$ стандартная ошибка среднего по результатам трёх экспериментов. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Fig. 2. Histogram of immunocytochemical detection of P-gr under the influence of RIF in suspension cells and in pro-inflammatory THP1 macrophages.

Note. The graphs show the mean values of the ratio of the median fluorescence intensity of antibody-stained cells to the median intensity of unstained cells $\pm$ standard error of the mean for the results of three experiments. The differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

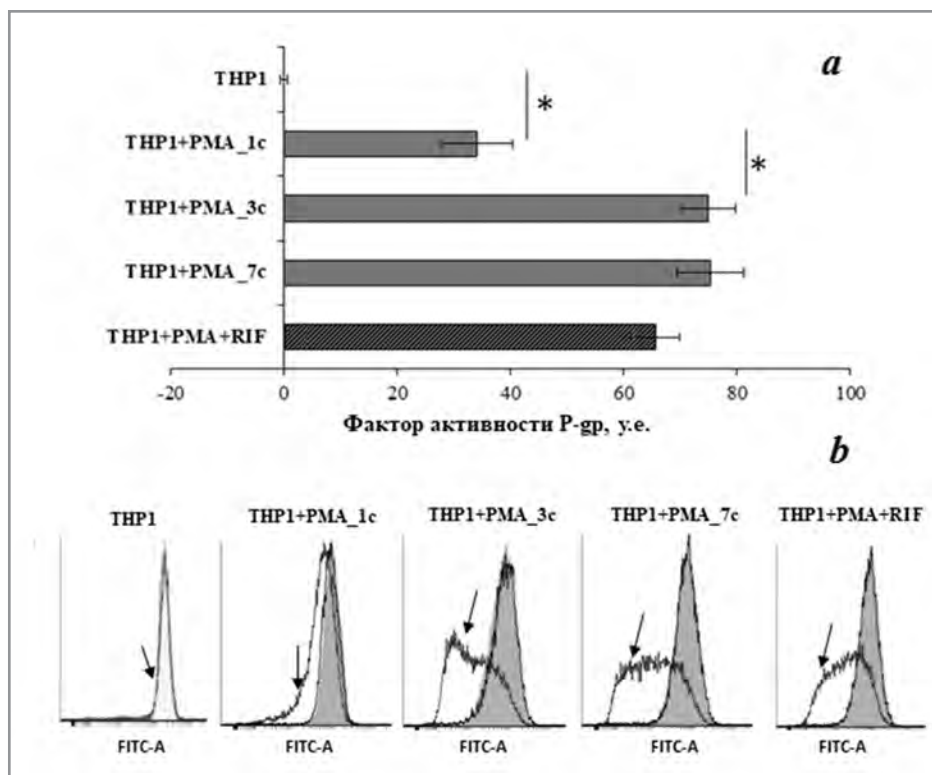


Рис. 3. Изменения функциональной активности P-гр в процессе макрофагальной дифференцировки и под воздействием RIF в клетках THP-1. *a* — гистограмма анализа ФАР-гр; *b* — графики интенсивности накопления и выброса родамина 123. **Примечание.** *a* — на графике представлены средние значения трёх независимых экспериментов $\pm$ стандартная ошибка среднего. * — статистически значимые различия при $p < 0,05$. *b* — серая гистограмма — накопление и выброс родамина 123 в присутствии ингибитора P-гр винбластин 22 μ M (гистограммы совпадают на всех рисунках). Черная кривая, обозначенная стрелкой — выброс Родамина 123. По горизонтальной оси — относительная флуоресценция в канале FITC (о. е.), которая соответствует флуоресцентной эмиссии родамина 123. По вертикальной оси — число событий.

Fig. 3. Changes in the functional activity of P-gp during macrophage differentiation and under the influence of RIF in THP-1 cells. *A.* Histogram of FAP-gp analysis. *B.* Graphs of the intensity of accumulation and release of rhodamine 123.

Note. *a* — the graph shows the means of three independent experiments $\pm$ standard error of the mean values. * — statistically significant differences at $P < 0.05$. *b* — Gray histogram — accumulation and release of rhodamine 123 in the presence of the P-gp inhibitor vinblastine 22 μ M (the histograms are the same in all figures). The black curve marked with an arrow — the release of Rhodamine 123. Horizontal axis — the relative fluorescence in the FITC channel (p.u.), which corresponds to the fluorescent emission of Rhodamine 123. Vertical axis — the number of events.

При этом в выбранном нами дизайне эксперимента нам не удалось обнаружить повышение функциональной активности P-гр в макрофагах при действии RIF.

Обсуждение исследования

Мы продемонстрировали индукцию экспрессии гена *MDR1* при краткосрочном воздействии терапевтической концентрации RIF в макрофагах THP-1. Этот эффект характерен для клеток, которые уже находятся в процессе макрофагальной дифференцировки по M1-фенотипу и в них является функционально-активный P-гр. В мо-

ноцитах периферической крови человека экспрессия гена *MDR1* также регистрируется на очень низком уровне, но при их адгезии к субстрату и дифференцировке в макрофаги экспрессия гена увеличивается и на мембране клеток детектируется P-гр [14].

Как нами ранее было показано, в используемой модели макрофаги THP-1 характеризуются высокой экспрессией провоспалительных цитокинов (IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1) и выраженной способностью к фагоцитозу через Fc-рецепторы на протяжении всего срока эксперимента (до 7 сут), что является характерным для M1-макрофагов [10]. Стабилизация функциональной активности P-гр регистрируется к 3-м сут эксперимента и совпадает с ранее полученными данными о формировании к этому сроку функционально-зрелого фенотипа макрофагов THP-1 и активации P-гр [10, 15]. Данный срок эксперимента был выбран для добавления RIF. Таким образом, нами выявлена индукция гена *MDR1* в провоспалительных макрофагах, уже характеризующихся высокими значениями фактора активности P-гр. Важно, что этот результат получен при действии те-

рапевтической концентрации RIF, которая выявляется в плазме крови и в туберкуломах лёгких [8, 9].

В тоже время мы не наблюдали аналогичного индуцирующего эффекта в исходных моноцитарных клетках THP-1, хотя известно, что в этих клетках ген *MDR1* характеризуется индуцибельностью при фармакологическом воздействии [16–18]. В экспериментах на мононуклеарах, выделенных из крови, и клетках лимфобластной лимфомы CCRF-CEM также было показано, что RIF (25 мкМ, ~20 мкг/мл) не индуцирует экспрессию гена *MDR1* [19]. Эти факты указывают на имеющиеся принципиальные различия в действии RIF на ген *MDR1* в миелоидных клетках и на наличие

разных молекулярных механизмов такой индукции, что может быть использовано для разработки молекулярных и клеточных стратегий воздействия на макрофаги воспаления.

Согласно имеющимся данным, область промотора гена *MDR1* содержит множественные сайты связывания для различных факторов транскрипции, включая Мус, Sp1, AP-1, NF-κB и другие [20]. Одна из современных гипотез предполагает взаимодействие PXR (прегнанный X рецептор) с областью промотора гена *MDR1*. PXR — ядерный рецептор, основной функцией которого является регуляция экспрессии белков, участвующих в детоксикации и выведении ксенобиотиков из организма. Для клеток эпителиального происхождения уже продемонстрирована ведущая роль PXR в стимулировании экспрессии гена *MDR1* при действии RIF [21]. На клеточной линии LS174T (рак толстой кишки человека, характеризуется высокой индукцией *MDR1* под действием RIF) выявлены возможные варианты такой активации: RIF действует на киназу 2, которая фосфорилирует белок теплового шока HSP80b. Это вызывает стабилизацию PXR, его перемещение в ядро, связывание с промотором *MDR1* и запуск его транскрипции [22]. В то же время в более ранней работе на этой же линии клеток было идентифицировано, что PXR связывается не с промотором, а со сложным регуляторным кластером примерно из 8 пар нуклеотидов, в котором ключевую роль при действии RIF играет мотив DR4 в области энхансера. Это может означать, что PXR при действии RIF способен регулировать экспрессию генов, но не запускать её [23]. Мы предполагаем, что такой механизм может как раз и объяснить те различия в индукции экспрессии гена *MDR1*, которые нами были выявлены: PXR индуцирует экспрессию гена *MDR1* только при её наличии на значимом уровне (об этом свидетельствует присутствие в клетках активного P-gr), который уже и выявляется в макрофагах.

При макрофагальной дифференцировке в клетках THP-1 уровень PXR значимо не возрастает, по сравнению с исходной клеточной линией, но увеличивается при действии RIF (показано для высокой концентрации препарата 100 мкг/мл) [24]. В свою очередь, ингибирование кетоконазолом PXR или его нокдаун подавляют RIF-индуцированную экспрессию *MDR1* в макрофагах [24, 25]. Эти свидетельства в пользу ги-

потезы о ключевой роли PXR в индукции экспрессии гена *MDR1* под действием RIF в макрофагах.

Так как RIF является субстратом для P-gr, то постоянная индукция экспрессии гена *MDR1* и функциональной активности P-gr будет снижать накопление локальных концентраций RIF в макрофагах воспаления, тем самым способствуя выживаемости возбудителя. В настоящее время ряд исследователей предлагает разработать стратегию ингибирования функциональной активности P-gr в инфицированных макрофагах [3, 26]. Предполагается, что такая стратегия должна привести к повышению концентраций RIF в инфицированных *M. tuberculosis* макрофагах, и тем самым будет способствовать более эффективному внутриклеточному уничтожению патогена.

Заключение

Показано, что терапевтическая концентрация рифампицина индуцирует в провоспалительных макрофагах THP-1 экспрессию гена *MDR1*, и этот эффект связан с дифференцировкой клеток и появлением в них функционально-активного P-gr. Учитывая ключевую роль макрофагов в развитии и заживлении туберкулёзного воспаления, возможности персистенции в них возбудителя, необходима дальнейшая оценка *MDR1*/P-gr в макрофагах воспаления, а также в операционном материале больных туберкулёзом лёгких. Эти данные позволят в дальнейшем сделать вывод о необходимости разработки и применения лекарственных стратегий, направленных на блокировку функциональной активности P-gr и выборе более эффективных схем противотуберкулёзной терапии.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90161 Аспиранты и в рамках темы НИР «Влияние противотуберкулёзных препаратов на белки множественной лекарственной устойчивости клеток человека (МЛУ-СКМ) при туберкулёзе лёгких». Работа по цитометрическому анализу клеток поддержана программой развития МГУ (комплекс для клеточной сортировки на базе FACS Aria SORP).

Литература/References

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2020. Geneva: World Health Organization; (2020).
2. Hawn T.R., Shah J.A., Kalman D. New tricks for old dogs: countering antibiotic resistance in tuberculosis with host-directed therapeutics. *Immunol Rev.* 2015; 264 (1): 344–362. doi: 10.1111/imr.12255.
3. Te Brake L.H.M., de Knecht G.J., de Steenwinkel J.E. et al. The Role of efflux pumps in tuberculosis treatment and their promise as a target in drug development: unraveling the black box. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 2018; 58: 271–291. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010617-052438.

4. Kim R.B. Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers. *Drug Metab Rev.* 2002; 34 (1–2): 47–54. doi: 10.1081/dmr-120001389.
5. Burman W.J. The value of *in vitro* drug activity and pharmacokinetics in predicting the effectiveness of antimycobacterial therapy: a critical review. *Am J Med Sci.* 1997; 313 (6): 355–363. doi: 10.1097/00000441-199706000-00008.
6. Pahari S., Kaur G., Negi S. et al. Reinforcing the functionality of mononuclear phagocyte system to control tuberculosis. *Front Immunol.* 2018; 9: 193. Published 2018 Feb 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.00193.
7. Khan A., Singh V.K., Hunter R.L., Jagannath C. Macrophage heterogeneity and plasticity in tuberculosis. *J Leukoc Biol.* 2019; 106 (2): 275–282. doi: 10.1002/JLB.MR0318-095RR.

8. Alsultan A., Peloquin C.A. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis: an update [published correction appears in *Drugs*. 2014 Jun; 74 (9): 2061. Dosage error in article text]. *Drugs*. 2014; 74 (8): 839–854. doi: 10.1007/s40265-014-0222-8.
9. Prideaux B., Via L.E., Zimmerman M.D. et al. The association between sterilizing activity and drug distribution into tuberculosis lesions. *Nat Med*. 2015; 21 (10): 1223–1227. doi: 10.1038/nm.3937.
10. Курьина 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; 83 (3): 309–325. [Kurynina A.V., Erokhina M.V., Makarevich O.A., Sysoeva V.Yu., Lepekha L.N., Kuznetsov S.A., Onishchenko G.E. Plastichnost' fagotsitarnoy aktivnosti kletok cheloveka linii THP-1 pri makrofagal'noy differentsirovke. *Biokhimiya*. 2018; 83 (3): 309–325. (in Russian)]
11. Mechetner E.B., Schott B., Morse B.S. et al. P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94 (24): 12908–12913. doi: 10.1073/pnas.94.24.12908.
12. Ерохина М.В., Александрова Е.А., Прокопенко А.В., Лепеха Л.Н. и Онищенко Г.Е. Особенности влияния рифампицина на механизмы гибели моноцитарных клеток. *Туберкулёз и болезни лёгких*. 2009; 11: 49–55. [Erokhina M.V., Aleksandrova E.A., Prokopenko A.V., Lepekha L.N. i Onishchenko G.E. Osobennosti vliyaniya rifampitsina na mekhanizmy gibeli monotsitarnykh kletok. *Tuberkulez i Bolezni Legkikh*. 2009; 11: 49–55. (in Russian)]
13. Erokhina M., Rybalkina E., Barsegyan G., Onishchenko G., Lepekha L. The Toxicity of rifampicin polylactic acid nanoparticles against *Mycobacterium Bovis* BCG and human macrophage THP-1 Cell Line. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2015.
14. van de Ven R., Oerlemans R., van der Heijden J.W. et al. ABC drug transporters and immunity: novel therapeutic targets in autoimmunity and cancer. *J Leukoc Biol*. 2009; 86 (5): 1075–1087. doi: 10.1189/jlb.0309147.
15. Mittar D., Paramban R., McIntyre C. Flow cytometry and high-content imaging to identify markers of monocyte-macrophage differentiation. *BD Biosciences*. 2011; 20.
16. Yagüe E., Armesilla A.L., Harrison G. et al. P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation. *J Biol Chem*. 2003; 278 (12): 10344–10352. doi: 10.1074/jbc.M211093200.
17. Carrett-Dias M., Almeida L.K., Pereira J.L. et al. Cell differentiation and the multiple drug resistance phenotype in human erythroleukemic cells. *Leuk Res*. 2016; 42: 13–20. doi: 10.1016/j.leukres.2016.01.008.
18. Williams M.S., Amaral F.M., Simeoni F., Somerville T.C. A stress-responsive enhancer induces dynamic drug resistance in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2020; 130 (3): 1217–1232. doi: 10.1172/JCI130809.
19. Manceau S., Giraud C., Declèves X. et al. Lack of P-glycoprotein induction by rifampicin and phenobarbital in human lymphocytes. *Int J Pharm*. 2010; 395 (1–2): 98–103. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.05.016.
20. Lee W.-K., Frank T. Teaching an old dog new tricks: reactivated developmental signaling pathways regulate ABCB1 and chemoresistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*. 2021; 4 (2): 424–452. doi: 10.20517/cdr.2020.114.
21. Magnarin M., Morelli M., Rosati A. et al. Induction of proteins involved in multidrug resistance (P-glycoprotein, MRP1, MRP2, LRP) and of CYP 3A4 by rifampicin in LLC-PK1 cells. *Eur J Pharmacol*. 2004; 483 (1): 19–28. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.10.010.
22. Kim S.W., Hasanuzzaman M., Cho M. et al. Casein Kinase 2 (CK2)-mediated Phosphorylation of Hsp90 β as a Novel Mechanism of Rifampin-induced MDR1 Expression. *J Biol Chem*. 2015; 290 (27): 17029–17040. doi: 10.1074/jbc.M114.624106.
23. Geick A., Eichelbaum M., Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem*. 2001; 276 (18): 14581–14587. doi: 10.1074/jbc.M010173200.
24. 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. *J Pharm Sci*. 2019; 108 (9): 3106–3111. doi: 10.1016/j.xphs.2019.04.009.
25. Bhagyaraj E., Tiwari D., Ahuja N. et al. A human xenobiotic nuclear receptor contributes to nonresponsiveness of *Mycobacterium tuberculosis* to the antituberculosis drug rifampicin. *The J Biol Chem*. 2018; 293 (10): 3747. doi: 10.1074/jbc.M117.818377.
26. Nasiri M.J., Haeili M., Ghazi M. et al. New insights in to the intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in mycobacteria. *Front Microbiol*. 2017; 8: 681. Published 2017 Apr 25. doi: 10.3389/fmicb.2017.00681.

Информация об авторах

Павлова Екатерина Николаевна — аспирант биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация. ORCID: 0000-0001-5662-3715

Ерохина Мария Владиславовна — д. б. н., доцент, заместитель заведующего кафедрой клеточной биологии и гистологии ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова»; заведующий лабораторией клеточной биологии, ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулёза», Москва, Российская Федерация. ORCID: 0000-0002-7256-4679

Рыбалкина Екатерина Юрьевна — старший научный сотрудник лаборатории генетики опухолевых клеток НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; старший научный сотрудник лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулёза», Москва, Российская Федерация. ORCID: 0000-0002-3068-0233

Поташикова Дарья Марковна — к. б. н., старший научный сотрудник кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация. ORCID: 0000-0002-0098-827X

Масютин Александр Георгиевич — научный сотрудник кафедры клеточной биологии и гистологии ФГБОУ ВО «МГУ им. М. В. Ломоносова»; научный сотрудник лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулёза», Москва, Российская Федерация. ORCID: 0000-0002-8067-4261

Лепеха Лариса Николаевна — д. б. н., профессор, ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулёза», Москва, Российская Федерация

Эргешов Атаджан Эргешович — д. м. н., профессор, директор ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулёза», Москва, Российская Федерация. ORCID: 0000-0002-2494-9275

About the authors

Ekaterina N. Pavlova — post-graduate student of the Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation. ORCID: 0000-0001-5662-3715

Maria V. Erokhina — D. Sc. in biology, Associate Professor, Lomonosov Moscow State University, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-7256-4679

Ekaterina Yu. Rybalkina — Researcher at the Laboratory of Tumor Cell Genetics, Research Institute of Carcinogenesis, National Medical Research Center of Oncology named after N. N. Blokhin of the Ministry of Health of the Russian Federation; Senior Researcher at the Laboratory of Cell Biology, Department of Pathomorphology, Cell Biology and Biochemistry, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-3068-0233

Daria M. Potashnikova — Ph. D. in biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-0098-827X

Alexander G. Masyutin — Researcher at the Department of Cell Biology and Histology, Lomonosov Moscow State University; Researcher at the Laboratory of Cell Biology, Department of Pathomorphology, Cell Biology and Biochemistry, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-8067-4261

Larisa N. Lepekha — D. Sc. in biology, Professor, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation

Atadzhan E. Ergeshov — D. Sc. in medicine, Professor, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-2494-9275