

ВОЗМОЖНОСТЬ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ МОНОЦИТАРНЫХ И ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК К РИФАМПИЦИНУ

М.В. Ерохина^{1,2}, Л.Н. Лепеха¹, А.Э. Эргешов¹

FORMATION OF RESISTANCE TO RIFAMPICIN IN MONOCYTE-MACROPHAGIC AND EPITHELIAL CELL LINES

M.V. Erokhina, L.N. Lepekha, A.E. Ergeshov

Установлена возможность формирования лекарственной устойчивости моноцитарно-макрофагальных и эпителиальных клеток к рифампицину. Устойчивость соматических клеток к этому препарату формируется в присутствии его субтоксичной концентрации: индекс цитотоксичности IC50 (выживаемость 50% клеток) в течение трех месяцев возрастает в 1,5–2,5 раза. Клетки, устойчивые к рифампицину, отличаются повышенной функциональной активностью одного из основных белков, обуславливающих развитие МЛУ соматических клеток – Pgp. В макрофагах с фенотипом лекарственной устойчивости к рифампицину фагоцитарная активность возрастает, по сравнению с исходными клетками: индекс фагоцитоза *M.bovis*-GFP увеличивается в 1,5 раза. Феномен устойчивости соматических клеток к рифампицину зависит от времени воздействия препарата и является обратимым.

Ключевые слова: устойчивость эпителиальных и моноцитарно-макрофагальных клеток, рифампицин, изониазид, белок Pgp

Our data demonstrate that drug resistance to subtoxic concentrations of rifampicin can form in monocyte-macrophagic and epithelial cell lines. The index of cytotoxicity IC50 (50% cell survival) increased 1.5–2.5 times during the first 3 months of drug administration. Rifampicin resistant cells were characterized by high functional activity of Pgp, one of the major MDR proteins mediating resistance to multiple structurally diverse drugs. In drug resistant macrophages, phagocytic activity increased. Thus, the index of phagocytosis of *M. bovis*-GFP increased 1.5 times after 3 month of drug administration. The phenomenon of resistance of monocytic and epithelial cell lines to rifampicin depended on the time of exposure to the drug and was reversible.

Keywords: drug resistance of epithelial and monocytic cells, rifampicin, isoniazid, Pgp

Введение

Известно, что активация и формирование механизмов лекарственной устойчивости могут происходить на двух уровнях организации живого: микроорганизма (возбудителя) и клеток макроорганизма [11]. Если условия и механизмы развития резистентности микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам активно изучаются, то возможность активации механизмов лекарственной устойчивости соматических клеток к этим препаратам до сих пор остается неясной. Следует отметить, что лекарственная устойчивость (ЛУ) соматических клеток может развиваться при участии как

специфических механизмов, так и общеуниверсальных, которые известны как механизмы «множественной лекарственной устойчивости» (МЛУ) ³. Последние обеспечиваются работой специальных транспортных белков (МЛУ-белков), локализованных на плазматической мембране и снижающих внутриклеточное накопление препарата за счет его постоянного выведения во внеклеточную среду. Характерной особенностью таких белков является их широкая субстратная «всеядность»: функциональная активность одного такого белка обеспечивает ЛУ клеток к целому спектру лекарственных препаратов [4, 5].

¹ ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва.

² ФГБОУВО «МГУ имени М.В. Ломоносова», г. Москва.

³ Здесь речь идет об универсальных механизмах устойчивости клеток, во фтизиатрии термин МЛУ используют для характеристики штаммов *M. tuberculosis*, устойчивых к изониазиду и рифампицину (прим. автора).

Феномен МЛУ соматических клеток впервые был описан для опухолевых клеток, что привело к открытию целого ряда белков-транспортеров, ответственных за его формирование. Первым из них был открыт P-glycoprotein (Pgp) – наиболее универсальный из всех белков семейства МЛУ [10, 11]. Белок Pgp (170kDa) кодируется геном MDR1, в нормальных клетках и тканях он осуществляет транспорт ксенобиотиков, липидов, коротких пептидов и гормонов. Высокая экспрессия Pgp характерна для «барьерных клеток» – эпителия и эндотелия [8,9], умеренное присутствие Pgp наблюдается в макрофагах [12]. В этой связи особую актуальность приобретает исследование возможности формирования ЛУ в моноцитарно-макрофагальных и эпителиальных клетках к противотуберкулезным препаратам основного ряда, длительно применяемым при лечении туберкулеза.

Цель исследования

Изучить возможность формирования ЛУ в клетках разного происхождения к противотуберкулезным препаратам 1-го ряда и участие в данном процессе белка Pgp.

В связи с этим поставлены следующие задачи: 1) определить возможность формирования ЛУ в клетках моноцитарного и эпителиального происхождения к основным противотуберкулезным препаратам – рифампицину и изониазиду; 2) получить устойчивые к противотуберкулезным препаратам клеточные линии; 3) определить функциональную активность белка Pgp в клетках с феноменом ЛУ; 4) определить фагоцитарную активность макрофагальных клеток с феноменом ЛУ.

Материал и методы исследования

Клеточные линии. Эксперименты проводили на клетках линии ТНР-1 (острая моноцитарная лейкемия человека, суспензионная культура) и линии SPEV (СПЭВ, эпителий эмбриона почки свиньи). Культивирование моноцитарных клеток осуществляли с использованием среды RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, в атмосфере, обогащенной 5% углекислого газа. Для дифференцировки моноцитов в макрофаги *in vitro* использовали препарат форболового эфира (PMA) в концентрации 10^{-7} M (Sigma). Для культивирования линии SPEV использовали стандартную среду 199 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота. При проведении экспериментов дополнительные антибиотики в среду культивирования не вводили. Миелолейкозная линия клеток человека K562 и ее производная сублиния K562-Is9 с трансфицированным геном MDR1 использовали для дополнительной оценки участия белка-транспортера Pgp в развитии устойчивости к рифампицину. Получение устойчивых к рифампицину сублиний происходило путем поэтапной селекции исходных клеток возрастающими дозами рифампицина в течение первых двух недель с последующим культивированием в присутствии субтоксичных концентраций препарата.

Лекарственные препараты. В качестве лекарственных препаратов были использованы рифампицин в виде чистой субстанции (Sigma), изониазид (10% раствор для инъекций, ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко).

МТТ-тест. Выживаемость клеток в среде с рифампицином определяли по стандартной методике МТТ-теста и подсчета жизнеспособных клеток, окрашенных 0,1% раствором трипанового синего, в камере Горяева. Данные оптической плотности среды для МТТ-теста получены на спектрофотометре «Униплан» (Россия) при длине волны 530 нм [7].

Оценка выброса родамина 123. Активность Pgp определяли по выбросу флуоресцентного красителя родамина 123 (Rh123, Sigma) по стандартной методике [13]. 100 мкл клеточной суспензии инкубировали в присутствии 5 мкг красителя в течение 15 мин при 37 °С. После отмывания красителя и регистрации флуоресценции суспензию разделяли на две пробирки, в одну из которых добавляли ингибитор Pgp верапамил (10 мкМ, 30–60 мин, Sigma). Измерение выброса родамина 123 проводили на проточном цитометре «FACSCalibur» (Becton Dickinson), укомплектованном воздухоохлаждаемым аргонным лазером с длиной волны 488 нм, с применением программного обеспечения CellQwest. Гистограммы строили на основе результатов трех опытов по соотношению интенсивности средней флуоресценции на клетку сразу и через 1 час после окрашивания.

Бактериальная культура. *M. bovis BCG-GFP* были выращены на среде Middlebrook 7H9 (Difco) с добавлением 10% OADC, глицерина 0,02% и 0,05% твина-80 до экспоненциальной фазы роста при 37 °С.

Фагоцитарная активность. Индекс фагоцитарной активности анализировали путем подсчета макрофагов линии ТНР-1, содержащих в цитоплазме *M. bovis BCG-GFP*.

Статистический анализ. Все эксперименты были повторены трижды. Результаты представлены как «среднее значение» ± «среднее отклонение». Для статистической обработки использовали t-тест Стьюдента. Данные проточной флуориметрии оценивали с применением Фактора Активности МЛУ (*MDR Activity Factor* – MAF) по следующей формуле:

$$MAF = 100 \times [(MFI_{inh} - MFI_0) / MFI_{inh}],$$

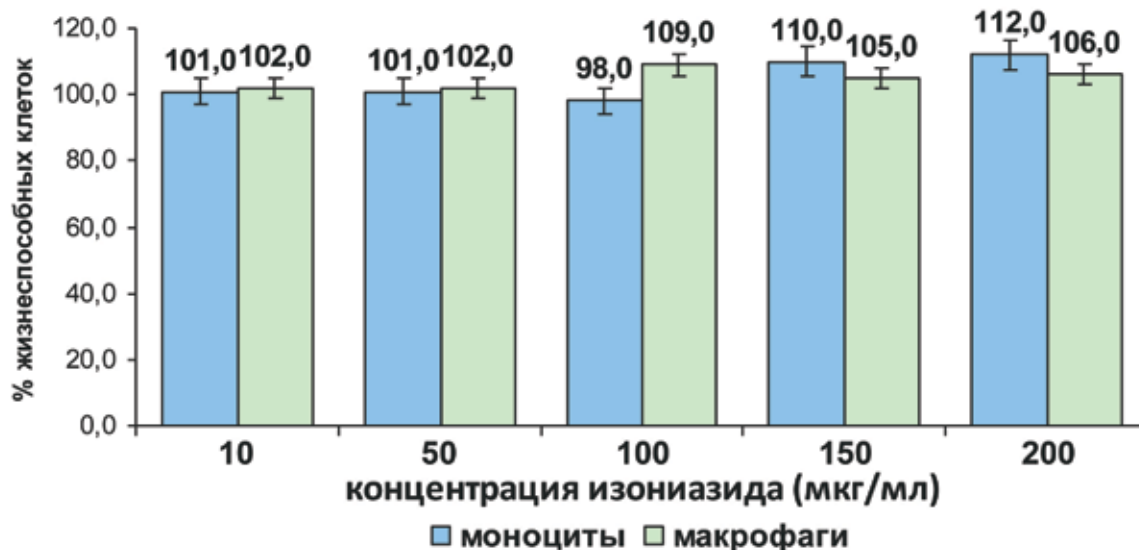
где MFI_{inh} и MFI_0 являются показателями среднего значения флуоресценции в присутствии и отсутствии ингибитора.

Результаты исследования и обсуждение

Определение чувствительности клеток моноцитарного и эпителиального происхождения к рифампицину и изониазиду

Для определения чувствительности клеток к действию изониазида выбран широкий диапазон его концентраций: от

а



б

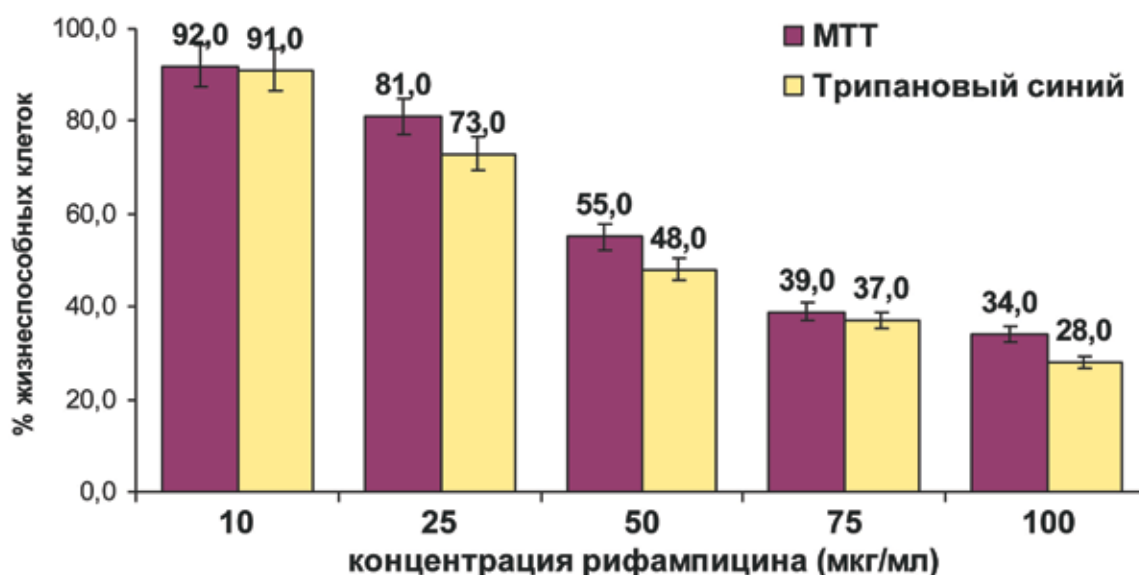


Рис. 1. Выживаемость клеток моноцитарного происхождения линии THP-1 в присутствии возрастающих концентраций: а) изониазида; б) рифампицина

10 мкг/мл до 200 мкг/мл. Вместе с тем проведенные исследования показали, что моноцитарно-макрофагальные клетки практически нечувствительны к действию этого противотуберкулезного препарата даже при достаточно высоких его концентрациях (рис. 1а). Аналогичные результаты получены в экспериментах с изониазидом и для клеток линии SPEV.

В отличие от изониазида присутствие рифампицина в среде культивирования приводит к уменьшению процента жизнеспособных моноцитарных клеток, по сравнению с контролем. В исследованные сроки эксперимента гибель 50% клеточной

популяции (IC_{50}) наблюдается при концентрации рифампицина 50 мкг/мл. Наименьшая же концентрация рифампицина (10 мкг/мл) приводит к уменьшению клеточной популяции на 10–15% (рис. 1б).

Ранее нами было показано, что рифампицин индуцирует апоптоз в моноцитарных клетках человека уже при низких концентрациях [2]. Известно, что при пероральном приеме у взрослых концентрация рифампицина в плазме крови составляет от 4 до 32 мкг/мл и 9–17 мкг/мл – при внутривенном. У детей при внутривенном введении концентрация рифампицина в крови доходит до 26 мкг/мл [1].

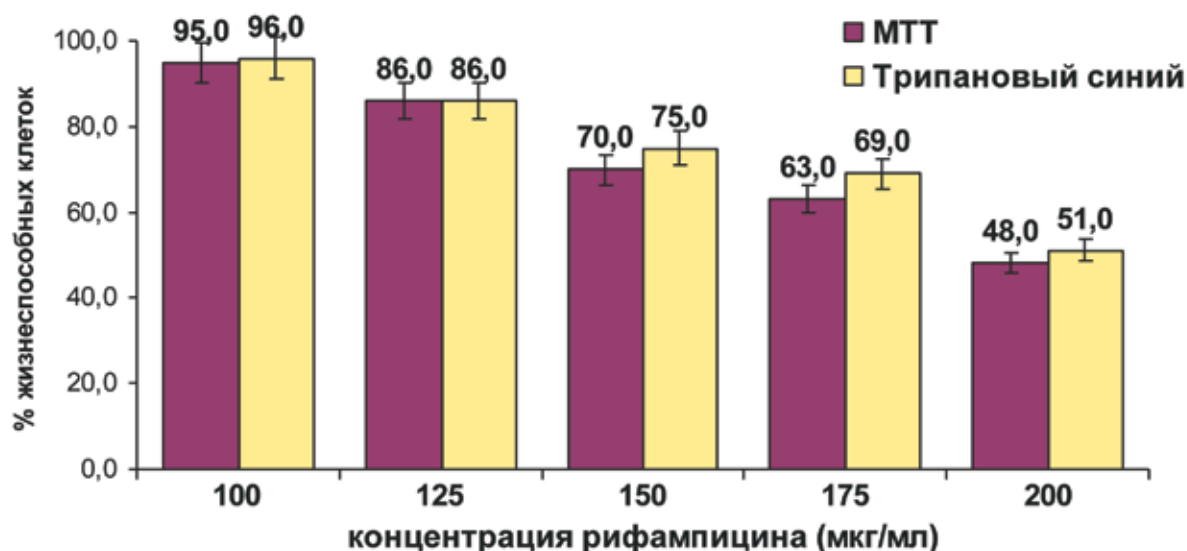


Рис. 2. Выживаемость клеток эпителиального происхождения линии SPEV в присутствии возрастающих концентраций рифампицина

В культуре эпителиальных клеток при концентрациях рифампицина 100–160 мкг/мл через 72 часа воздействия процент выживших клеток постепенно уменьшается в среднем на 20–25%, достигая значений IC_{50} при концентрации 200 мкг/мл (рис. 2).

Уменьшение доли жизнеспособных эпителиальных клеток связано с развитием окислительного стресса и индукцией апоптотического пути их гибели [3]. Известно, что в клетках бактерий рифампицин связывается с β -субъединицей РНК-полимеразы [6], тогда как в клетках человека он оказывает воздействие на митохондрии [3].

Получение устойчивых к рифампицину линий клеток

Проведенные исследования показали, что формирование ЛУ (изменение уровня IC_{50}) можно регистрировать только для одного из изученных препаратов – рифампицина. Для получения устойчивых линий культивирование клеток про-

водили в присутствии субтоксичных концентраций рифампицина (10 мкг/мл – для моноцитарных клеток, 100 мкг/мл – для эпителиальных клеток) в течение 3 месяцев. Устойчивость к рифампицину определяли методом оценки выживаемости 50% клеточной популяции в возрастающих концентрациях препарата на разных сроках культивирования: происходило постоянное повышение уровня устойчивости культуры (IC_{50}) к токсическим концентрациям препарата (от 1,5 до 2,5 раз) (рис. 3). Это свидетельствует о развитии механизмов устойчивости моноцитарных клеток к рифампицину, зависящем от времени воздействия препарата.

Эпителиальные клетки демонстрируют более выраженное развитие устойчивости: IC_{50} возрастает в 2–2,5 раза и увеличивается с 190 до 450 мкг/мл (рис. 4).

При удалении препарата из среды культивирования происходит нивелирование эффекта «устойчивости», и через

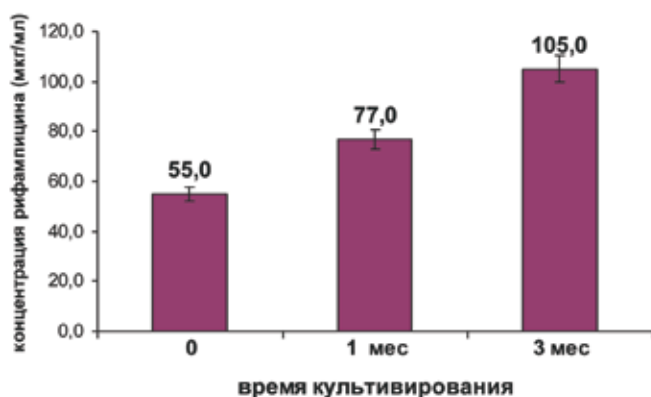


Рис. 3. Увеличение индекса цитотоксичности IC_{50} к рифампицину моноцитарных клеток линии THP-1 в присутствии субтоксичной (10 мкг/мл) концентрации рифампицина

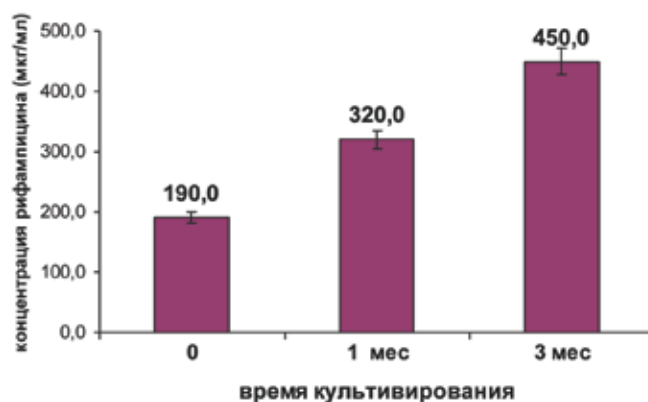


Рис. 4. Увеличение индекса цитотоксичности IC_{50} к рифампицину эпителиальных клеток линии SPEV в присутствии субтоксичной (100 мкг/мл) концентрации рифампицина

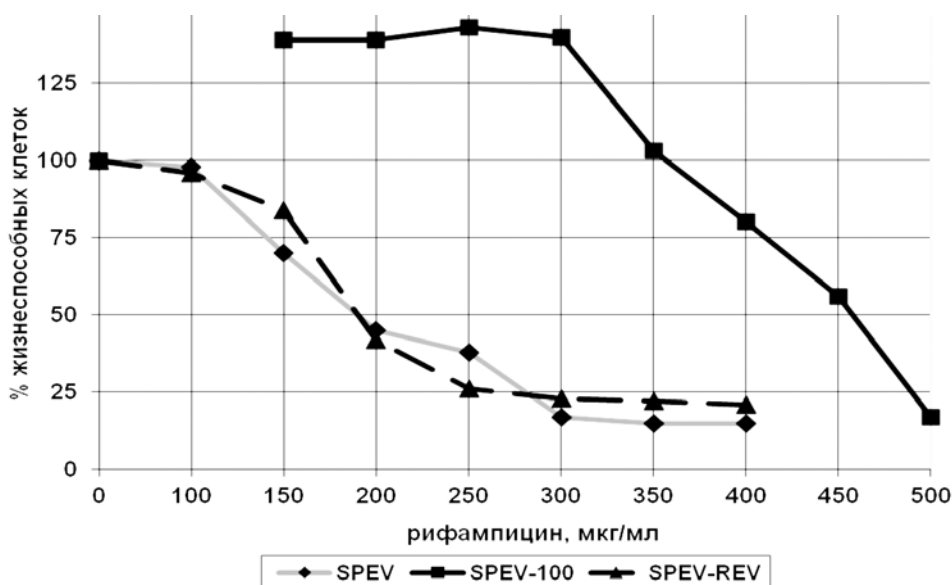


Рис. 5. Снижение устойчивости к рифампицину в эпителиальных клетках линии SPEV-100 при удалении препарата из среды культивирования. SPEV – исходная линия клеток; SPEV-100 – устойчивая к рифампицину линия клеток; SPEV-REV – линия клеток, утратившая устойчивость к рифампицину

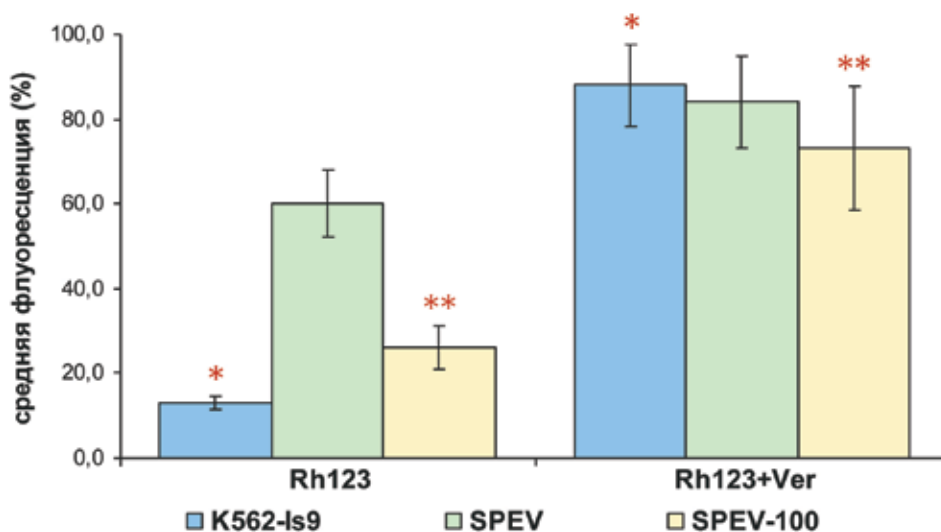


Рис. 6. Увеличение выброса родамина 123 (Rh123) в клетках линии SPEV, устойчивых к рифампицину. Верапамил (Ver) – специфический блокатор Pgp – ингибирует выброс красителя. Звездочками отмечены достоверные различия ($p < 0,05$)

1 месяц клетки возвращаются к исходному уровню чувствительности к рифампицину (рис. 5).

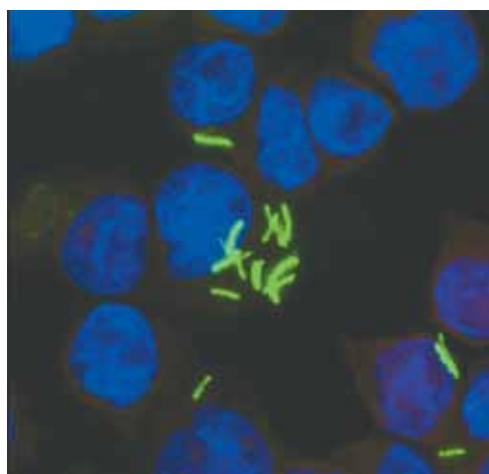
Таким образом, показана возможность формирования ЛУ клеток моноцитарного и эпителиального ряда к рифампицину. Устойчивость формируется в присутствии субтоксичных концентраций препарата и зависит от времени его воздействия. Эффект «устойчивости» является обратимым, в отсутствие рифампицина данный механизм утрачивается, клетки демонстрируют исходный уровень чувствительности к препарату.

Определение функциональной активности белка Pgp в клетках с феноменом лекарственной устойчивости к рифампицину

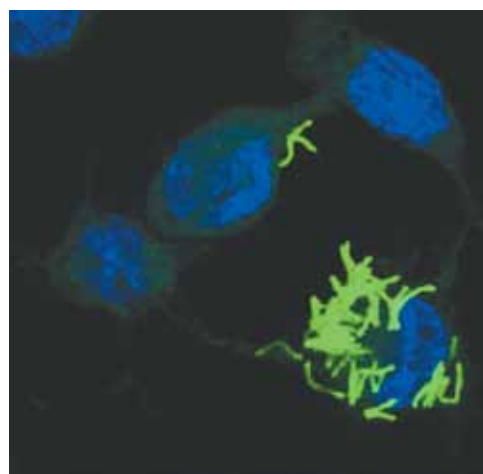
Классическим субстратом для Pgp является флуоресцентный краситель родамин 123. Его выброс из внутриклеточной

среды (снижение накопления красителя внутри клеток) является функциональным тестом на активность Pgp при действии различных лекарственных препаратов – клетки активно выбрасывают краситель в том случае, если на мембране присутствует Pgp [4]. При этом уровень флуоресценции будет снижаться, отражая степень активности этого белка. Если принять уровень свечения культуры в точке 0 час (сразу после инкубации красителя) за 100%, то можно составить сравнительную гистограмму изменения средней флуоресценции культуры через 1 час эксперимента.

В клетках культуры SPEV-100 выброс родамина 123 идет значительно активнее, чем в клетках исходной линии (рис. 6): через 1 час интенсивность флуоресценции снижается в 4–5 раз и составляет около 25% от первоначальной,



а



б

Рис. 7. Разное содержание *M. bovis-GFP* в цитоплазме макрофагальных клеток линий THP-1 (а) и THP-1-10 (б). Конфокальная лазерная микроскопия; голубой цвет – ядра, зеленый цвет – *M. bovis-GF*

тогда как в исходной линии – только в 1,5–2 раза (составляет 60% от первоначального).

Для сравнения приведен выброс родамина 123 клетками линии K562-Is9, которые содержат функционально-активный Pgp и способны активно выбрасывать родамин 123: через 1 час интенсивность флуоресценции в этих клетках снижается до 12% от первоначального уровня. Верапамил (R(+)-verapamil hydrochloride) – специфический блокатор Pgp и в его присутствии происходит ингибирование выброса красителя. Как в моноцитарных, так и в эпителиальных клетках инкубация с верапамилем приводит к достоверному уменьшению выброса красителя: в клетках культуры K562-Is9 уровень флуоресценции увеличивается с 12 до 86% и в клетках культуры SPEV-100 – с 25 до 72%, то есть выявленные отличия достоверны. Для клеток культуры SPEV получен достаточно вариабельный диапазон данных: большой разброс значений в этом случае не позволяет сделать вывод о достоверности отличий. Таким образом, длительное культивирование эпителиальных клеток в среде с рифампицином приводит к достоверному увеличению активности одного из основных белков множественной лекарственной устойчивости – Pgp и сопровождается развитием устойчивости клеток к рифампицину.

Определение фагоцитарной активности макрофагальных клеток, устойчивых к рифампицину

Макрофагальные клетки человека линии THP-1 были получены при дифференцировке моноцитов в макрофаги при помощи форболового эфира. Оценка фагоцитарной активности клеток проводили в присутствии штамма *M. bovis-GFP*. Данный штамм микобактерий характеризуется наличием трансфицированного гена флуоресцентного зеленого белка (GFP), что позволяет их визуализировать внутри макрофагов при светоптическом исследовании. Метод конфокальной лазерной

микроскопии позволяет в оценке фагоцитарного индекса учитывать только те клетки, в которых *M. bovis-GFP* располагаются непосредственно в цитоплазме. Макрофаги THP-1 демонстрируют индекс фагоцитарной активности в пределах 17–18% ($18,4 \pm 1,2\%$), тогда как клетки устойчивые к рифампицину (линия THP-1-10) характеризуются его увеличением до $29,0 \pm 0,8\%$. При этом в популяции встречаются клетки с высоким содержанием микобактерий, что не характерно для исходной клеточной линии THP-1 (рис. 7).

Выводы

1. Установлена возможность формирования лекарственной устойчивости к рифампицину на уровне соматических клеток разного происхождения – моноцитарно-макрофагальных и эпителиальных.
2. Устойчивость соматических клеток к рифампицину формируется в присутствии субтоксичной концентрации препарата: IC_{50} в первые 3 месяца возрастает в 1,5–2,5 раза.
3. Клетки, устойчивые к рифампицину, отличаются повышенной функциональной активностью одного из основных белков МЛУ – Pgp.
4. В макрофагах с фенотипом лекарственной устойчивости фагоцитарная активность возрастает: индекс фагоцитоза *M. bovis-GFP* увеличивается в 1,5 раза.
5. Феномен устойчивости соматических клеток к рифампицину зависит от времени воздействия препарата и является обратимым, что свидетельствует о наличии в клетках механизмов, его обуславливающих.

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда (проект № 14-50-00029).

Литература

1. Визель А.А., Гурылева М.Э. Туберкулез. – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. – 208 с.
2. Ерохина М.В., Александрова Е.А., Прокопенко А.В., Лепеха Л.Н., Онищенко Г.Е. Особенности влияния рифампицина на механизмы гибели моноцитарных клеток. // Туберкулез и болезни легких. – 2009. – № 11. – С. 49-55.
3. 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.
4. Ставровская А.А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток (обзор). // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 112-126.
5. Borst P., Oude Elferink R. Mammalian ABC transporters in health and disease. // Annu. Rev. Biochem. – 2002. – Vol. 71. – P. 537-592.
6. Campbell E., Korzheva N., Mustaev A. et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. // Cell. – 2001. – Vol. 104. – P. 901-912.
7. Carmichael J., De Graff W., Gazdar A. et al. Evaluation of a teirazoilium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. // Cancer. Res. – 1987. – Vol. 47. – P. 936-942.
8. Florea B., van der Sandt I., Schrier S. et al. Evidence of P-glycoprotein mediated apical to basolateral transport of flunisolide in human broncho-tracheal epithelial cells (Calu-3). // Br. J. Pharmacol. – 2001. – Vol. 134. – N. 7. – P. 1555-1563.
9. Hamilton K., Backstrom G., Yazdanian M. et al. P-glycoprotein efflux pump expression and activity in Calu-3 cells. // J. Pharm. Sci. – 2001. – Vol. 90. – N. 5. – P. 647-658.
10. Ling V. Drug resistance and membrane alteration in mutants of mammalian cells // Can. J. Genet. Cytol. – 1975. – Vol. 17. – P. 503-515.
11. Sheps J., Ling V. Preface: the concept and consequences of multidrug resistance. // Eur. J. Physiol. – 2007. – Vol. 453. P. 545-553.
12. Scheffer G., Pijnenborg A., Smit E. et al. Multidrug resistance related molecules in human and murine lung. // J. Clin. Pathol. – 2002. – Vol. 55. – P. 332-339.
13. Stromskaya T., Rybalkina E., Shtil A. et al. Influence of exogenous RAR alpha gene on MDR1 expression and P-glycoprotein function in human and rodent cell lines. // Br. J. Cancer. – 1998. – Vol. 77. – N. 11. – P. 1718-1725.

Сведения об авторах

Ерохина Мария Владиславовна – старший научный сотрудник отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», кандидат биологических наук

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-91-79

e-mail: erokhinam@bk.ru

Лепеха Лариса Николаевна – руководитель отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор биологических наук, профессор

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-91-79

e-mail: lep3@yandex.ru

Эргешов Атаджан Эргешович – директор ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», доктор медицинских наук, профессор

Адрес: 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. + 7 (499) 785-91-79

e-mail: cniit@ramn.ru