

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 576.32/.36

## Наночастицы полимера молочной кислоты с рифампицином снижают активность мультилекарственного транспортера Р-gr в макрофагах человека

М.В. Ерохина<sup>1, 2, \*</sup> , Е.Н. Павлова<sup>1</sup> , Е.К. Тарасова<sup>2</sup> , А.В. Курынина<sup>1</sup>,  
Д.М. Поташникова<sup>1</sup> , Л.Н. Лепеха<sup>2</sup> , А.Э. Эргешов<sup>2</sup> , Г.Е. Онищенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>2</sup>Отдел патоморфологии, клеточной биологии и биохимии, Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Россия, 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

\*e-mail: masha.erokhina@gmail.com

В настоящее время проблему снижения эффективности действия противотуберкулезных препаратов связывают не только с развитием лекарственной устойчивости у возбудителя, но и с функциональной активностью белка множественной лекарственной устойчивости клеток макроорганизма Р-гликопротеина (P-glycoprotein, Р-gr). Один из основных противотуберкулезных препаратов – рифампицин (РИФ) – является субстратом для Р-gr, что снижает его эффективность. В статье представлены данные об активности Р-gr в провоспалительных макрофагах человека и проведена оценка влияния на его активность новой формы РИФ, инкапсулированного в наночастицы полимера молочной кислоты, разрешенного для медицинского применения. Показано, что макрофаги ТНР-1, в отличие от исходных клеток, характеризуются возрастанием функциональной активности Р-gr в процессе дифференцировки, а также сохранением жизнеспособности в присутствии РИФ, что связано с активацией Р-gr. Новая форма РИФ является нетоксичной для моноцитов и макрофагов ТНР-1 в сравнении с традиционной формой. При использовании инкапсулированной формы РИФ происходят активация процесса эндоцитоза/фагоцитоза в макрофагах и снижение функциональной активности Р-gr. Полученные данные демонстрируют, что создание инкапсулированных противотуберкулезных препаратов – активаторов фагоцитоза, направленно снижающих активность Р-gr и таким образом влияющих на функциональные особенности макрофагов человека, представляется перспективным и актуальным направлением для повышения эффективности действия противотуберкулезных препаратов.

**Ключевые слова:** Р-gr, полимер молочной кислоты, наночастицы, рифампицин, провоспалительные макрофаги, туберкулез

Развитие нанотехнологий позволяет создавать лекарственные препараты, обладающие не только новыми физико-химическими свойствами, по сравнению с их традиционными формами, но и влияющие на функциональную активность клеток-мишеней. В связи с ростом числа случаев туберкулеза легких с множественной и широкой лекарственной устойчивостью перспективным направлением является разработка новых форм противотуберкулезных препаратов (ПТП) [1, 2]. Следует отметить, что в настоящее время проблеме снижения эффективности действия ПТП связывают не только с развитием лекарственной устойчивости у возбудителя *Mycobacterium tuberculosis*, но и с функциональной активностью белка множественной лекарственной устойчивости соматических клеток макроорганизма Р-гликопротеина (P-glycoprotein, Р-gr). Ранее

нами было показано, что в процессе развития туберкулезного воспаления происходит возрастание экспрессии гена белка Р-gr (*MDR1/Mdr1*) в клетках легких [3, 4]. Р-gr локализуется преимущественно на плазматической мембране и, используя энергию АТФ, связывает широкий спектр субстратов, в том числе и ПТП рифампицин (РИФ) [5]. В связи с этим создание технологий ингибирования Р-gr в клетках человека в целях увеличения внутриклеточной концентрации РИФ является важной фундаментальной и клинической задачей. Один из подходов такого ингибирования связан с активацией эндоцитоза, так как известно, что в процессе эндоцитоза происходит интернализация Р-gr и снижение его функциональной активности [6]. Способы активации интернализации Р-gr в настоящее время разрабатываются при доставке лекарств через гематоэнцефалический ба-

рьер для повышения их эффективности [7]. При этом разновидность эндоцитоза — фагоцитоз — является фундаментальным свойством макрофагов, позволяющим им бороться с возбудителем. В свою очередь, макрофаги — ключевые клетки для адресной доставки РИФ.

Создание инкапсулированных препаратов на основе полимера молочной кислоты (ПМК) и РИФ находится в фокусе внимания современной фармакологии [2]. В отличие от свободного РИФ, проникающего в клетки путем диффузии, наночастицы (НЧ) РИФ-ПМК попадают в макрофаги путем эндоцитоза/фагоцитоза [8, 9]. В фагосомах и фаголизосомах полимер деградирует, в результате чего высвобождается РИФ в свободной форме. Так как *M. tuberculosis* персистирует в фагосомах, то идеология создания НЧ РИФ-ПМК предполагает его более эффективное воздействие на внутриклеточные формы *M. tuberculosis* за счет адресной доставки и создания более высокой внутриклеточной концентрации препарата, чем в случае традиционной формы РИФ. Следует отметить, что как активность самого P-gr в макрофагах, так и влияние на него НЧ РИФ-ПМК до сих пор недостаточно изучены. В связи с этим целью данной работы являлись изучение активности P-gr и оценка влияния НЧ РИФ-ПМК на его функциональную активность в макрофагах человека. ПМК разрешен к медицинскому применению, что является его серьезным преимуществом перед другими формами биоразлагаемых полимеров [10]. В работе использовали клетки линии ТНР-1, которые являются хорошо изученной моделью для индукции макрофагальной дифференцировки под воздействием форболового эфира [11, 12]. В данной работе мы использовали модель провоспалительных макрофагов ТНР-1, характеризующихся высоким уровнем секреции провоспалительных цитокинов и фагоцитозом через Fc-рецепторы [13].

### Материалы и методы

**Культивирование клеток ТНР-1** проводили на среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 mM глутамин. Для индукции макрофагальной дифференцировки клетки ТНР-1 обрабатывали форболовым эфиром в концентрации 100 нМ, как было описано ранее [13].

РИФ-ПМК был разработан в НИИ Молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (патент RU2418585C1) и любезно предоставлен проф. Г.Г. Барсегяном. Согласно данным разработчика, средний размер частиц, измеренный с использованием метода автокорреляционной спектроскопии, равен  $378 \pm 84$  нм. Доля РИФ в препарате составляет 8–10% (в среднем 8,5% по массе).

**Определение цитотоксического действия РИФ и НЧ РИФ-ПМК на клетки линии ТНР-1** проводи-

ли с помощью МТТ-теста. Клетки засевали в 96-луночный планшет в концентрации 30000 клеток на лунку и культивировали в течение 4 сут. Были выбраны следующие экспериментальные концентрации препаратов: 10 и 25 мкг/мл РИФ и 100 или 250 мкг/мл НЧ РИФ-ПМК. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре Униплан (Пикон, Россия) при длине волны 530 нм. Значения ОП для контроля принимали за 100%. В каждом эксперименте использовали три технических повтора, было проведено пять независимых экспериментов. Для технических повторов использовали средние значения, результаты МТТ-теста представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.

**Функциональную активность P-gr** оценивали по выбросу клетками классического субстрата — флуоресцентного красителя родамина 123 [14]. Клетки инкубировали с красителем в концентрации 5 мМ в темноте при 4°C 20 мин, затем культуральную среду меняли и клетки инкубировали 30 мин при 37°C в присутствии агентов. Для оценки функциональной активности P-gr, а также влияния исследуемых препаратов на выброс родамина 123 использовали параметр фактора активности P-gr ( $\Phi A_{P-gr}$ ), который рассчитывали по формуле:

$$\Phi A_{P-gr} = 100 \times [(\text{МИФ}_{\text{винбластина}} - \text{МИФ}_{\text{выброса родамина 123}}) / \text{МИФ}_{\text{винбластина}}],$$

где  $\text{МИФ}_{\text{винбластина}}$  — показатель медианы интенсивности флуоресценции родамина 123 в макрофагах в присутствии винбластина в концентрации 22 мМ, который полностью ингибирует функциональную активность P-gr [14].  $\text{МИФ}_{\text{выброса родамина 123}}$  — интенсивность флуоресценции выброса родамина 123 в клетках в присутствии исследуемых агентов или без них. Клетки анализировали на проточном цитометре 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 30000 событий. Значения  $\Phi A_{P-gr}$  представлены как средние  $\pm$  стандартное отклонение по результатам трех независимых экспериментов.

**Конститутивный фагоцитоз** в культуре клеток ТНР-1 изучали с помощью анализа поглощения ими в течение 3 ч немеченых латексных шариков (диаметром 0,5 мкм, 0,005%, Invitrogen, США) на 1-е, 3-и и 7-е сут дифференцировки. Клетки промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и фиксировали 4%-ным параформальдегидом (MP Biochemicals, Франция) в течение 20 мин при 4°C. Затем проводили пермеабиллизацию 0,1%-ным Triton X-100 в течение 5 мин при 20°C и окрашивали фаллоидином, конъюгированным с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ-фаллоидин, Sigma-Aldrich, США) в течение 40 мин,

затем трижды промывали ФСБ по 5 мин и заключали препараты в монтажную среду (Mowiol 4-88, Sigma-Aldrich, США), содержащую 100 нМ 4',6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорида (DAPI, Sigma-Aldrich, США).

**Фагоцитарную активность клеток** ( $n = 200$  в каждом эксперименте) оценивали по следующим параметрам: 1) фагоцитарный индекс (ФИ, процент клеток, начавших фагоцитоз); 2) фагоцитарное число (ФЧ, среднее число поглощенных шариков на клетку); 3) доля активно фагоцитирующих клеток (АФ-клетки, в цитоплазме выявляются 20 и более латексных шариков). Клетки анализировали при помощи сканирующего конфокального микроскопа TCS SPE (Leica, Германия) с набором лазеров (405, 488, 532 нм) и соответствующими фильтрами (RT 30/70, DD 405/532, DD 488/635). Изображения клеток получали, используя объективы с увеличением  $\times 40$  и  $\times 63$ , и анализировали в программе LAS AF (версия 3.2, Leica, Германия). Проводили четыре независимых эксперимента.

**Для сканирующей электронной микроскопии** одну каплю суспензии НЧ ПМК или НЧ РИФ-ПМК помещали на покровное стекло и высушивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Клетки после воздействия 100 мкг/мл НЧ ПМК или 100 мкг/мл НЧ РИФ-ПМК в течение 4 сут фиксировали 2,5%-ным глутаровым альдегидом (Ted Pella, США) с добавлением 2%-ного параформальдегида на ФСБ в течение 1 ч, обезвоживали в восходящих концентрациях этилового спирта по следующей схеме:  $30^\circ - 40^\circ - 50^\circ - 60^\circ - 70^\circ - 80^\circ$  и  $96^\circ$ , 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  $\text{CO}_2$  ( $31^\circ\text{C}$ , 73,8 бар), покрывали платиной и золотом, а затем анализировали в сканирующем электронном микроскопе JSM-6380 LA (Jeol, Япония), 20 кВ.

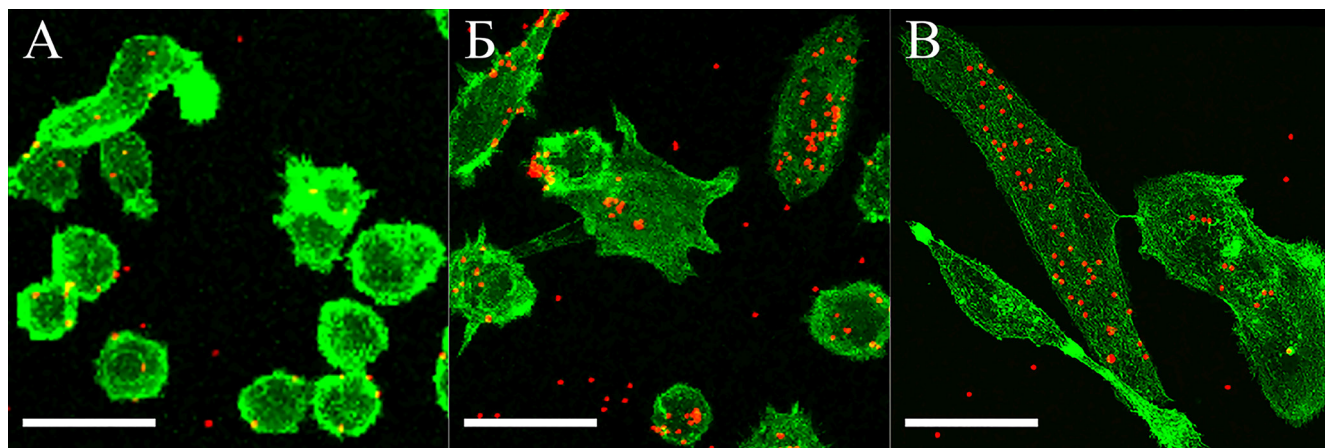
**Статистическую обработку данных** проводили в программе STATISTICA 10 (TIBCO Software Inc, Palo Alto, CA, США). Для сравнения независимых выборок использовали критерий Стьюдента. Различия между группами признавали значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

**Характеристика модели клеток ТНР-1 при макрофагальной дифференцировке.** Макрофагальная дифференцировка клеток ТНР-1 сопровождается изменением их морфологии от моноцитоподобной до веретенообразной (рис. 1). Оценка фагоцитарной активности показала, что на 1 сут макрофагальной дифференцировки ФИ составляет  $25 \pm 4,5\%$ , а на 3-и и 7-е сут —  $75 \pm 5\%$  и  $85 \pm 1,5\%$  соответственно. На 7-е сут возрастает и значение ФЧ — до 30,59 шариков на клетку (на 3-и сут ФЧ равно 6,62), а также увеличивается доля АФ-клеток до  $41 \pm 2\%$  по сравнению с 3 сут макрофагальной дифференцировки ( $5 \pm 2\%$ ). Таким образом, в процессе макрофагальной дифференцировки происходит активация конститутивного фагоцитоза.

Уже через сутки дифференцировки в макрофагах ТНР-1 отмечено присутствие Р-гр с максимумом функциональной активности на 3-и сут, сохраняющимся в течение всего периода эксперимента, до 7-х сут (таблица). Таким образом, в макрофагальных клетках, в отличие от исходных моноцитарных, экспрессируется Р-гр, который обладает высокой функциональной активностью. Эти данные определили выбранный диапазон эксперимента: препараты добавляли в среду культивирования на 3-и сут дифференцировки клеток, и дальнейшую инкубацию с препаратами проводили в течение 4-х сут (до 7-х сут дифференцировки).

**Влияние РИФ и НЧ РИФ-ПМК на макрофаги ТНР-1.** Как показали данные электронной микроскопии, размер НЧ ПМК и РИФ-ПМК преимущественно находится в диапазоне 50–400 нм (рис. 2, А и Б).



**Рис. 1.** Морфологическая и фагоцитарная характеристика макрофагов ТНР-1. А — 1-е сут; Б — 3-и сут, В — 7-е сут. Красный цвет — латексные шарики; диаметр 0,5 мкм; зеленый цвет — актиновые микрофиламенты, окрашенные ФИТЦ-фаллоидином. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Масштабный отрезок — 20 мкм.

Контрольные макрофаги ТНР-1 имеют преимущественно сглаженный рельеф поверхности. Могут выявляться одиночные складки или филоподии размером до 1 мкм (рис. 2, В). Воздействие РИФ в концентрации 10 мкг/мл не активирует поверхность клеток (не отличается от контроля) (рис. 2, Г), в то время как при воздействии ПМК НЧ и РИФ-ПМК НЧ образуются многочисленные выросты и складки по всей поверхности клеток (рис. 2, Д и Е). В целом, при действии НЧ регистрируется активация клеточной поверхности с формированием многочисленных филоподий размером до 4 мкм, раффлов, складок и фагоцитарных чаш. Эти изменения свидетельствуют об активации процесса эндоцитоза/фагоцитоза под воздействием как НЧ ПМК, так и НЧ РИФ-ПМК.

Для НЧ ПМК показаны разные механизмы поступления в клетки. Так, предполагается, что может быть задействован эндоцитоз с образованием кавеол [7]. На клетках эпителия легкого линии A549 показано, что НЧ ПМК меньше 100 нм по-

ступают в цитоплазму через клатрин-опосредованный эндоцитоз (если плазматическая мембрана богата фосфолипидами), либо через области липидных рафтов (при высоком содержании сфинголипидов и холестерина) [9]. Для препарата на основе сополимера молочной кислоты с гликолевой, в состав которого включен РИФ, показано, что в макрофаги красного костного мозга и мышинные макрофаги линии Raw 264.7 он поступает фагоцитозом и в дальнейшем выявляется в фаголизосомах [14], где полимер деградирует. Это приводит к высвобождению лекарственного агента и его частичной диффузии в цитоплазму [8]. Деградация ПМК осуществляется за счет действия фосфатаз и лактатдегидрогеназ макрофагов [15] и происходит в течение 10–15 сут [16], при этом низкий pH лизосом ускоряет данный процесс [17]. Таким образом, после фагоцитоза НЧ РИФ-ПМК не происходит резкого накопления свободного РИФ в клетках. Это является важным для обеспечения жизнеспособности клеток, так как извест-

Таблица

Изменение  $\Phi A_{P-gr}$  в макрофагах при дифференцировке и действии ПМК НЧ НЧ

| Дифференцировка ТНР-1, сут |          |                     |                    | Дифференцировка ТНР-1, 7-е сут |                      |           |
|----------------------------|----------|---------------------|--------------------|--------------------------------|----------------------|-----------|
|                            |          |                     |                    | агент                          |                      |           |
| 0                          | 1        | 3                   | 7                  | РИФ-ПМК                        | ПМК                  | РИФ       |
| $\Phi A_{P-gr}$            |          |                     |                    |                                |                      |           |
| —                          | 34,1±1,1 | 74,9±10,8* $\Delta$ | 75,3±8,3* $\Delta$ | 42,6±17,3* $\diamond$          | 66,4±3,8* $\diamond$ | 65,5±10,2 |

$\Phi A_{P-gr}$  = средние значения  $\Phi A_{P-gr} \pm$  стандартное отклонение по результатам трех экспериментов

Примечание:  $\Delta$  — в сравнении с 1 сут дифференцировки;  $\diamond$  — в сравнении с 7 сут дифференцировки; \* — различия между группами статистически значимы при  $p < 0,05$ .

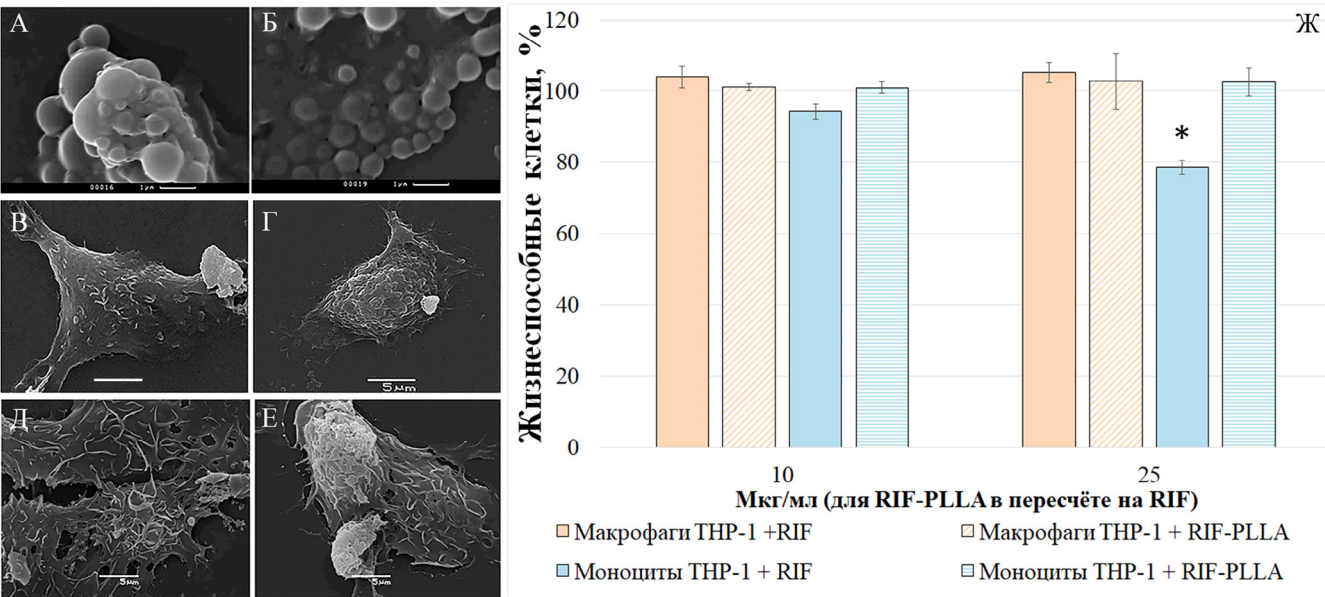


Рис 2. Влияние ПМК НЧ и РИФ-ПМК НЧ на макрофаги ТНР-1. А – ПМК НЧ, Б – РИФ-ПМК НЧ; В–Е – клетки ТНР-1 после воздействия РИФ, ПМК НЧ и РИФ-ПМК НЧ (4 сут): В – контроль; Г – РИФ (10 мкг/мл); Д – РИФ-ПМК НЧ (100 мкг/мл); Е – ПМК НЧ (100 мкг/мл). Сканирующая электронная микроскопия. Масштабный отрезок: А, Б – 1  $\mu$ м, В–Е – 5  $\mu$ м. Ж – гистограмма выживаемости моноцитов и макрофагов ТНР-1 (МТТ-тест) при действии 10 и 25 мкг/мл РИФ либо 100 и 250 мкг/мл РИФ-ПМК НЧ (на гистограмме концентрации указаны в пересчёте на РИФ). Даны средние значения  $\pm$  стандартное отклонение по результатам пяти экспериментов. \* – различия статистически значимы по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

но, что в клетках млекопитающих РИФ может индуцировать апоптоз, вызывая патологию митохондрий и окислительный стресс [18, 19].

Для оценки токсичности НЧ РИФ-ПМК использовали препарат в концентрациях, которые соответствуют концентрациям РИФ, выявляемым в крови больных туберкулезом легких и в области туберкулезного воспаления [20]. В присутствии НЧ РИФ-ПМК с помощью МТТ-теста не было выявлено снижения жизнеспособности моноцитарных и макрофагальных клеток ТНР-1 (рис. 2, Ж), что совпадает с данными других авторов [2, 21–23]. При этом сравнительный анализ показал, что традиционный РИФ является токсичным для исходной клеточной линии ТНР-1 и нетоксичным для макрофагальных клеток. Эти различия можно объяснить присутствием в макрофагах Р-гр, субстратом которого является РИФ [24].

**Влияние НЧ РИФ-ПМК на активность Р-гр в макрофагах ТНР-1.** Анализ накопления родамина 123, его выброса и ингибирования показал, что в процессе дифференцировки макрофагов ТНР-1 возрастают значения  $\Phi A_{P-gr}$  на 1-е и 3-и сут дифференцировки с дальнейшей стабилизацией данного параметра к 7-м сут (таблица). Анализ влияния НЧ РИФ-ПМК в концентрации 100 мкг/мл (содержит 10 мкг/мл РИФ) на активность Р-гр выявил, что значение  $\Phi A_{P-gr}$  ниже по сравнению с контролем.

Чем ниже значение  $\Phi A_{P-gr}$ , тем в большей степени лекарственное средство оказывает ингибирующее влияние на функциональную активность Р-гр. Таким образом, более низкие значения  $\Phi A_{P-gr}$  при воздействии НЧ РИФ-ПМК можно объяснить активацией эндоцитоза/фагоцитоза в экспериментальных клетках. Согласно имеющимся данным, активация эндоцитоза способствует «уходу» Р-гр с плазматической мембраны в эндосомы/фагосомы. Это сокращает количество Р-гр на плазматической мембране клеток и приводит к снижению выброса родамина 123, т.е. к ингибированию функциональной активности Р-гр. При этом НЧ ПМК также снижают  $\Phi A_{P-gr}$ , но в меньшей степени, чем НЧ РИФ-ПМК. Имеются данные, что физико-химические свойства НЧ влияют на активность Р-гр, изменяя свойства не только плазматической мембраны, но и мембран синтетического аппарата клетки, а также посттрансляционные механизмы, что приводит к снижению количества функционально активного Р-гр [25, 26]. Схожие результаты — ингибирование НЧ РИФ-

ПМК выброса родамина 123 — нами были получены в краткосрочных экспериментах на миелоцитарных клеточных линиях человека KG1 и K562/i-S9, которые также характеризуются высокой экспрессией гена *MDR1* [27, 28]. Учитывая, что Р-гр является АТФ-зависимым транспортером, возможно, что снижение его функциональной активности связано с истощением внутриклеточных запасов АТФ в ходе активации фагоцитоза, необходимого для транспорта НЧ ПМК [7]. Свойства полимерных частиц, предназначенных для применения при заболеваниях легких, зависят от химического состава, их размера, формы, заряда [29]. Мы предполагаем, что РИФ в составе ПМК может придавать новые свойства НЧ, которые оказывают более выраженное влияние на активность Р-гр по сравнению с воздействием только НЧ ПМК.

Таким образом, нами показано, что: (1) макрофагальная дифференцировка клеток ТНР-1 сопровождается повышением функциональной активности Р-гр; (2) такие клетки характеризуются сохранением жизнеспособности в присутствии терапевтической концентрации РИФ, в отличие от моноцитарных клеток; (3) НЧ РИФ-ПМК нетоксичны для моноцитов и макрофагов ТНР-1; (4) НЧ РИФ-ПМК снижают функциональную активность Р-гр.

При использовании инкапсулированных форм препаратов происходит активация процесса фагоцитоза в макрофагах, что играет важную роль в борьбе с возбудителем туберкулеза. В то же время, при фагоцитозе может происходить снижение функциональной активности Р-гр. Таким образом, нам представляется перспективным и актуальным разработка инкапсулированных ПТП — активаторов фагоцитоза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №20-34-90161), а также как часть научно-исследовательского проекта государственного задания ФГБНУ ЦНИИТ (№ 122041100257–9) и МГУ (№ 121032300098–5). Работа по цитометрическому анализу клеток поддержана программой развития МГУ (комплекс для клеточной сортировки на базе FACSARIA SORP). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Park M., Satta G., Kon O.M. An update on multidrug-resistant tuberculosis // Clin. Med. 2019. Vol. 19. N 2. P. 135–139.
2. Guoping Y., Guofu W., Liting L., Kaixin Z., Xiaowen C., Yue C. Protective effect of rifampicin loaded by HPMA-PLA nanopolymer on macrophages infected with

*Mycobacterium tuberculosis* // Comput. Math. Methods Med. 2022. Vol. 2022: 784283.

3. Ерохина М.В., Лепеха Л.Н., Рыбалкина Е.Ю., Никоненко Б.В., Бочарова И.В., Эргешов А.Э. Возрастное изменение экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости MDR1A/B в клетках легких мышей, ин-

фицированных *M. tuberculosis* // Вестник ЦНИИТ. 2019. № 2. С. 16–25.

4. Erokhina M., Lepekha L., Rybalkina E., Pavlova E., Tarasov R., Krasnikova E., Ergeshov A. Expression of MDR1 gene encoding P-glycoprotein is significantly increased in active pulmonary tuberculomas // Eur. Respir. J. 2021. Vol. 58. Suppl. 65: PA2467.

5. Jouan E., Le Vee M., Denizot C., Da Violante G., Fardel O. The mitochondrial fluorescent dye rhodamine 123 is a high-affinity substrate for organic cation transporters (OCTs) 1 and 2 // Fundam. Clin. Pharmacol. 2014. Vol. 28. N 1. P. 65–77.

6. Kim H., Barroso M., Samanta R., Greenberger L., Sztul E. Experimentally induced changes in the endocytic traffic of P-glycoprotein alter drug resistance of cancer cells // Am. J. Physiol. 1997. Vol. 273. N 2. P. 687–702.

7. Chen J., Cao L., Cui Y., Tu K., Wang H., Wang L. The exploration of endocytic mechanisms of PLA-PEG nanoparticles prepared by coaxial tri-capillary electrospray-template removal method // Colloids Surf. B. 2018. Vol. 161. P. 10–17.

8. Kalluru R., Fenaroli F., Westmoreland D., et al. Poly(lactide-co-glycolide)-rifampicin nanoparticles efficiently clear *Mycobacterium bovis* BCG infection in macrophages and remain membrane-bound in phago-lysosomes // J. Cell Sci. 2013. Vol. 126. Pt. 14. P. 3043–3054.

9. da Luz C.M., Boyles M.S., Falagan-Lotsch P., Pereira M.R., Tutumi H.R., de Oliveira Santos E., Martins N.B., Himly M., Sommer A., Foissner I., Duschl A., Granjeiro J.M., Leite P.E.C. Poly-lactic acid nanoparticles (PLA-NP) promote physiological modifications in lung epithelial cells and are internalized by clathrin-coated pits and lipid rafts // J. Nanobiotechnology. 2017. Vol. 15: 11.

10. Vasir J.K., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics // Adv. Drug Deliv. Rev. 2008. Vol. 59. N 8. P. 718–728.

11. Grigoryeva O.A., Korovina I.V., Gogia B.Sh., Sysoeva V.Yu. Migration properties of adipose-tissue-derived mesenchymal stromal cells cocultured with activated monocytes *in vitro* // Cell Tissue Biol. 2014. Vol. 8. N 5. P. 359–367.

12. Genin M., Clement F., Fattaccioli A., Raes M., Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide // BMC Cancer. 2015. Vol. 15: 577.

13. Kuryina A., Erokhina M., Makarevich O., Sysoeva V., Lepekha L., Kuznetsov S., Onishchenko G. Plasticity of human THP-1 cell phagocytic activity during macrophagic differentiation // Biochem. 2018. Vol. 83. N 3. P. 200–214.

14. Mechetner E., Kyshtobayeva A., Zonis S., Kim H., Stroup R., Garcia R., Parker R.J., Fruehauf J.P. Levels of multi-drug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with *in vitro* resistance to taxol and doxorubicin // Clin. Cancer Res. 1998. Vol. 4. N 2. P. 389–398.

15. da Silva D., Kaduri M., Poley M., Adir O., Krinsky N., Shainsky-Roitman J., Schroeder A. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems // Chem. Eng. J. 2018. Vol. 340. P. 9–14.

16. Cardoso M.M., Peca I. N., Lopez T., Gardner R., Bicho A. Double-walled poly-(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA) nanoparticles for the sustained release of doxorubicin // Polymers (Basel). 2021. Vol. 13. N 19: 3230.

17. Elmowafy E.M., Tiboni M., Soliman M.E. Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and

nanoparticles // J. Pharm. Investig. 2019. Vol. 49. N 4. P. 347–380.

18. Erokhina M., Kuryina A., Onishchenko G. Mitochondria are targets for the antituberculosis drug rifampicin in cultured epithelial cells // Biochemistry (Mosc.). 2013. Vol. 78. N 10. P. 1155–1163.

19. Cahill C., Phelan J.J., Keane J. Understanding and exploiting the effect of tuberculosis antimicrobials on host mitochondrial function and bioenergetics // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020. Vol. 10: 493.

20. Ait Moussa L., El Bouazzi O., Serragui S., Soussi Tanani D., Soulaymani A., Soulaymani R. Rifampicin and isoniazid plasma concentrations in relation to adverse reactions in tuberculosis patients: a retrospective analysis // Ther. Adv. Drug Saf. 2016. Vol. 7. N 6. P. 239–247.

21. Basarkar A., Devineni D., Palaniappan R., Singh J. Preparation, characterization, cytotoxicity and transfection efficiency of poly (DL-lactide-co-glycolide) and poly (DL-lactic acid) cationic nanoparticles for controlled delivery of plasmid DNA // Int. J. Pharm. 2007. Vol. 343. N 1–2. P. 247–254.

22. Mattu C., Pabari R. M., Boffito M., Sartori S., Ciardelli G., Ramtoola Z. Comparative evaluation of novel biodegradable nanoparticles for the drug targeting to breast cancer cells // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2013. Vol. 85. N 3. Pt. A. P. 463–472.

23. Moorkoth D., Nampoothiri K.M. Synthesis, colloidal properties and cytotoxicity of biopolymer nanoparticles // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. Vol. 174. N 6. P. 2181–2194.

24. He H., Buckley M., Britton B., Mu Y., Warner K., Kumar S., Cory T. J. Polarized macrophage subsets differentially express the drug efflux transporters MRP1 and BCRP, resulting in altered HIV production // Antivir. Chem. Chemother. 2018. Vol. 26: 2040206617745168.

25. Gopisetty M.K., Kovács D., Igaz N., Rónavári A., Béltéky P., Rázga Z., Venglovecz V., Csoboz B., Boros I.M., Kónya Z., Kiricsi M. Endoplasmic reticulum stress: major player in size-dependent inhibition of P-glycoprotein by silver nanoparticles in multidrug-resistant breast cancer cells // J. Nanobiotechnology. 2019. Vol. 17. N 1: 9.

26. Davis T.P., Sanchez-Covarubias L., Tome M.E. P-glycoprotein trafficking as a therapeutic target to optimize CNS drug delivery // Adv. Pharmacol. Sci. 2014. Vol. 71. P. 25–44.

27. Erokhina M., Rybalkina E., Barsegyan G., Onishchenko G., Lepekha L. The toxicity of rifampicin polylactic acid nanoparticles against *Mycobacterium bovis* BCG and human macrophage THP-1 cell line // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, (vol. 98, N 1, 012017). IOP Publishing, 2015.

28. 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.

29. Lim Y.H., Tiemann K.M., Hunstad D.A., Elsabahy M., Wooley K.L. Polymeric nanoparticles in development for treatment of pulmonary infectious diseases // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed Nanobiotechnol. 2017. Vol. 8. N 6. P. 842–871

Поступила в редакцию 17.05.2022

После доработки 28.07.2022

Принята в печать 29.07.2022

## RESEARCH ARTICLE

# Nanoparticles of lactic acid polymer with rifampicin decrease activity of multi-drug transporter P-gp in human macrophages

M.V. Erokhina<sup>1, 2, \*</sup> , E.N. Pavlova<sup>1</sup> , E.K. Tarasova<sup>2</sup> , A.V. Kurynina<sup>1</sup>,  
D.M. Potashnikova<sup>1</sup> , L.N. Lepekha<sup>2</sup> , A.E. Ergeshov<sup>2</sup> , G.E. Onishchenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>Department of Pathomorphology, Central Tuberculosis Research Institute, 2 Yauzskaya alleya, Moscow, 107564, Russia

\*e-mail: masha.erokhina@gmail.com

Currently, the problem of effectiveness reduction of the anti-tuberculosis drugs is associated not only with the development of drug resistance by the pathogen, but also with the activity of the multidrug resistance protein P-gp (P-glycoprotein) of macroorganism cells. Rifampicin, the main anti-tuberculosis drug, is a substrate for P-gp. The article presents data on the activity of P-gp in pro-inflammatory human macrophages and assesses the effect of a new form of the anti-tuberculosis drug – rifampicin-loaded lactic acid polymer nanoparticles – on it. Scanning electron microscopy, laser confocal microscopy, MTT test and flow cytometry methods were used. It was shown that the new form of rifampicin is non-toxic for human monocytes and macrophages of the THP-1 cell line. In addition, it activates the processes of endocytosis/phagocytosis and reduces the functional activity of P-gp. Thus, it seems promising to develop encapsulated anti-tuberculosis drugs – with phagocytosis-activating properties that specifically affect certain features of human macrophages.

**Keywords:** *P-gp, poly-l-lactic acid nanoparticles, rifampicin, proinflammatory macrophages, tuberculosis*

**Funding:** The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 20-34-90161. The research was carried out as part of the scientific project of the state order of the Government of Russian Federation to Central Tuberculosis Research Institute (project number 122041100257-9) and Lomonosov Moscow State University (project number 121032300098-5). The work on cytometric analysis of cells was supported by the Moscow State University development program (a complex for cell sorting based on FACSaria SORP).

## Сведения об авторах

*Ерохина Мария Владиславовна* – докт. биол. наук, доц. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ, зав. лабораторией клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ. Тел.: 8-495-939-45-67; e-mail: masha.erokhina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7256-4679>

*Павлова Екатерина Николаевна* – аспирант кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-45-67; e-mail: guchia@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5662-3715>

*Тарасова Екатерина Константиновна* – мл. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ. Тел.: 8-499-785-91-79; e-mail: shalioto6@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0438-7233>

*Курынина Анна Викторовна* – старший преподаватель кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-45-67; e-mail: frasska@gmail.com

*Поташикова Дарья Марковна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-20-84; e-mail: dariapotashnikova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0098-827X>

*Лепеха Лариса Николаевна* – проф., докт. биол. наук, гл. науч. сотр. отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ. Тел.: 8-499-785-91-79; e-mail: lep3@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6894-2411>

*Эргешов Атаджан Эргешович* – член-корр. РАН, проф., докт. мед. наук, директор ЦНИИТ. Тел.: 8-499-785-91-19; e-mail: cniit@ctri.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5669-5345>

*Онищенко Галина Евгеньевна* – проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-17-94; e-mail: galina22@mail.ru