

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 576.32/.36+576.31+576.3.08

Активность белка-транспортера Р-gr в макрофагах человека усиливает эффект легочного сурфактанта как активатора фагоцитоза

Е.К. Тарасова¹ , Л.Н. Лепеха¹ , А.Г. Масютин^{1, 2} ,
Е.А. Щербакова¹ , М.В. Ерохина^{1, 2, *}

¹Отдел патоморфологии, клеточной биологии и биохимии, Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Россия, 107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2;

²Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

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

Легочный сурфактант — необходимый компонент респираторного отдела для реализации фагоцитоза альвеолярными макрофагами. Туберкулез легких сопровождается снижением выработки легочного сурфактанта и фагоцитарной функции макрофагов. Белок-транспортер Р-gr (ген *ABCB1*) высокоэкспрессирован в клетках легких, экспортирует из них многочисленные субстраты. Встраивание Р-gr в плазматическую мембрану изменяет ее характеристики. Целью настоящей работы стал анализ взаимосвязи между Р-gr и фагоцитарной активностью макрофагов при воздействии экзогенного легочного сурфактанта. В работе применяли методы сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), а также две модели, использующие культивируемые клетки человека: (1) провоспалительные макрофаги ТНР-1 (Р-gr⁺), инфицированные *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (*M. bovis* BCG) (данная модель при действии сурфактанта рассматривается как модель альвеолярно-подобных макрофагов); (2) родительские клетки миелобластной лейкемии K562 (Р-gr⁻) и клетки K562/i-S9 (Р-gr⁺) с трансфицированным геном *ABCB1*, индуцированные к адгезии. На модели 1 выявлено, что добавление 1 мг/мл экзогенного легочного сурфактанта на 1 ч приводит к формированию многочисленных длинных филоподий, раффлов и фагоцитарных чаш, возрастанию фагоцитарного индекса в 1,7 раза. Это демонстрирует, что препарат сурфактанта является эффективным активатором фагоцитоза при инфицировании макрофагов. На модели 2 показано, что в присутствии Р-gr значительно возрастает поверхностная активность клеток под действием экзогенного легочного сурфактанта, по сравнению с клетками без Р-gr. Предполагается, что за счет взаимодействия между Р-gr, белками комплекса ERM (эзрин, радиксин, моэзин) и актиновыми филаментами, клетки Р-gr⁺ более подвержены активации клеточной поверхности и фагоцитозу, чем клетки Р-gr⁻. В дальнейшем анализ особенностей реализации фагоцитоза инфицированными макрофагами в зависимости от активности Р-gr может способствовать разработке новых препаратов, направленных на регуляцию фагоцитарной активности макрофагов.

Ключевые слова: туберкулез, Р-гликопротеин, легочный сурфактант, макрофаги, *M. bovis* BCG, сканирующая электронная микроскопия, конфокальная лазерная микроскопия

DOI: 10.5959/MSU0137-0952-16-80-3-5

Введение

Туберкулез легких (ТЛ) — социально значимое инфекционное заболевание, которое ежегодно уносит жизни более миллиона человек [1]. Туберкулезное воспаление сопровождается снижением выработки альвеолоцитами II легочного сурфактанта (ЛС) — компонента сурфактантно-альвеолярного мембранного комплекса, необходимого не

только для дыхания, но и для реализации защитных реакций в легких. Снижение выработки сурфактанта сопровождается накоплением в бронхоальвеолярном лаваже макрофагов с нарушенной фагоцитарной функцией. В свою очередь, введение экзогенного ЛС (ЭЛС) в материал бронхоальвеолярного лаважа, полученного от больных активным ТЛ, вызывает снижение доли нефагоцитирующих

макрофагов почти в 2 раза [2]. Предполагается, что благодаря специфическим белкам SP-A и SP-D, сурфактант выступает в качестве опсонизирующего фактора, который узнается паттерн-распознающими рецепторами макрофагов. Одновременно с ними с мишенью взаимодействуют «scavenger»-рецепторы [3]. Таким образом, ЛС является необходимым компонентом легких для реализации фагоцитарной функции макрофагов.

В макрофагах, а также в эпителии бронхов и респираторного отдела, присутствуют белки-экспортеры, получившие название «белки множественной лекарственной устойчивости» (МЛУ). Они экспортируют различные субстраты из клеток, в том числе лекарственные препараты, снижая эффективность химиотерапии при различных заболеваниях. Среди белков МЛУ особое внимание заслуживает Р-гликопротеин (P-glycoprotein, P-gp).

Р-gp — трансмембранный белок-экспортер, относящийся к суперсемейству АТФ-связывающих транспортеров (ATP Binding Cassette). Р-gp кодируется геном *ABCB1* (*MDR1*), в норме на высоком уровне экспрессируется в бронхоальвеолярном эпителии, альвеолярных и рециркулирующих макрофагах [4]. При активном туберкулезном воспалении уровень его экспрессии возрастает [5]. На сегодняшний день известно, что Р-gp обладает наиболее широкой субстратной «всеядностью» из известных белков МЛУ и может экспортировать вещества самой разной химической структуры. Список субстратов для Р-gp постоянно пополняется, и по данным сайта Drugbank включает в себя сотни различных лекарственных агентов, в том числе — противотуберкулезные препараты [6]. Инфицированные *Mycobacterium tuberculosis* макрофаги также характеризуются экспрессией гена *ABCB1* и присутствием функционально активного Р-gp [7].

Функциональная активность Р-gp определяется его структурными особенностями и свойствами плазматической мембраны клеток, на которой он локализуется [8]. Массовое встраивание Р-gp в плазматическую мембрану изменяет ее характеристики и, в частности, взаимодействие с актиновым цитоскелетом [9]: именно актиновые филаменты задействуются клетками при активации клеточной поверхности на ранних стадиях эндоцитоза/фагоцитоза [10]. Таким образом, имеются данные, указывающие на возможное участие Р-gp в процессе фагоцитоза.

Реализация фагоцитоза является фундаментальным свойством макрофагов. Макрофаги, как фагоциты, играют наибольшую роль в поддержании гомеостаза тканей в норме и при воспалении, регенерации и восстановлении, а также в иммунном ответе на патогенные микроорганизмы. Именно эти клетки одни из первых контактируют с возбудителем ТЛ, и их функциональная активность определяет эффективность борьбы с *Mycobacterium tuberculosis*. В связи с этим является чрез-

вычайно актуальным совершенствование наших знаний о факторах, определяющих эффективность фагоцитоза. Представляется важным ответить на вопрос о роли Р-gp в макрофагах при воздействии активатора фагоцитоза — препарата ЭЛС, который используется в клинической практике. Целью настоящей работы стало выявление взаимосвязи между активацией клеточной поверхности и присутствием Р-gp в миелоидных клетках человека при действии ЭЛС. В работе использовали две экспериментальные модели на основе культивируемых клеток человека:

(1) провоспалительные макрофаги человека ТНР-1, инфицированные *M. bovis* BCG. Нами ранее было продемонстрировано, что высокие уровни фагоцитоза, экспрессии гена *ABCB1* и функциональной активности Р-gp реализуются в макрофагах ТНР-1 к 3-м сут дифференцировки [11–13]. Модель макрофагов ТНР-1 при действии сурфактанта может рассматриваться как модель альвеолярно-подобных макрофагов [14].

(2) родительские клетки миелобластной лейкемии K562 (Р-gp⁺) и клетки K562/i-S9 с трансфицированным геном *ABCB1* и высокой активностью Р-gp [15], индуцированные к адгезии. В данной модели клетки различаются по выраженной экспрессии только одного гена *ABCB1*, что позволяет ответить на вопрос о влиянии присутствия Р-gp на ранние стадии фагоцитоза.

В качестве активатора клеточной поверхности для обеих моделей использовали препарат бычьего ЭЛС.

Материалы и методы

Линии культивируемых клеток. Клеточная линия ТНР-1 — острая моноцитарная лейкемия (Российская коллекция клеточных культур, г. Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ПанЭко, Россия), 2 mM L-глутамина (ПанЭко, Россия) и 80 мкг/мл гентамицина при 37°C и 5% CO₂ в культуральных флаконах (25 см³, SPL Life Sciences, Республика Корея). Суспензионную культуру пассировали каждые 3–5 сут.

Клеточная линия K562 — хроническая миелогенная лейкемия, клетки выделены из плевральной жидкости (Российская коллекция клеточных культур, г. Санкт-Петербург, Россия), и ее субклон K562/i-S9 с активным Р-gp получен путем стабильной трансфекции гена *MDR1* (*ABCB1*) проф. Мечетнером Е.Б., Калифорнийский Университет в Ирвайне (University of California at Irvine) [15]. Обе линии любезно предоставлены Рыбалкиной Е.Ю. (ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России).

Для индукции макрофагальной дифференцировки клеток ТНР-1 и адгезии клеток K562 и K562/i-S9 использовали форболовый эфир

(РМА, 12-О-tetradecanoyl-13-phorbolmyristate; Sigma, США). Стоковая концентрация РМА составила 2×10^{-2} М в ДМСО (ПанЭко, Россия). Клетки в концентрации 1×10^6 на 5 мл среды рассевали в культуральные флаконы и добавляли РМА в конечной концентрации 100 нМ на 2–4 ч однократно, затем меняли среду культивирования. В эксперименты с ЭЛС клетки K562 и K562/i-S9 брали через 24 ч после их адгезии, а ТНР-1 — через 72 ч после индукции дифференцировки.

Экзогенный легочный сурфактант. Экзогенный легочный сурфактант — препарат Сурфактант БЛ (ООО «Биосурф», Россия), полученный из легких крупного рогатого скота. Готовая лекарственная форма представляет собой 75 мг лиофилизата. По данным разработчиков препарата в составе ЭЛС содержится 62% фосфатидилхолина и до 2,5% специфических белков сурфактанта. Для экспериментов препарат разводили в 750 мкл среды RPMI-1640, экспериментальная концентрация составила 1 мг/мл.

Культивирование бактерий. *M. bovis* BCG, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок GFP (*M. bovis* BCG-GFP, Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза Туберкулеза), выращивали на среде Middlebrook 7H9 (BD Difco™, США) с добавлением 10% ростовой добавки Middlebrook OADC, глицерина 0,02% и 0,05% Tween 80 при 37°C.

Инфицирование макрофагов ТНР-1. ТНР-1 рассевали на покровные стекла в 24-луночные планшеты с плотностью 500 тыс. клеток в 1 мл на лунку, добавляли РМА в конечной концентрации 100 нМ на 2–4 ч, после чего проводили смену среды культивирования. Через 72 ч макрофагальной дифференцировки добавляли *M. bovis* BCG отдельно или совместно с ЭЛС на 1 ч для последующего анализа методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) или *M. bovis* BCG-GFP отдельно или совместно с ЭЛС на 3 ч для последующего анализа методом КЛСМ. Бактерии находились в экспоненциальной фазе роста, их дважды промывали в PBS (phosphate buffered saline, фосфатно-солевой буфер, pH 7,4) и ресуспендировали в RPMI-1640 без сыворотки. Инфицирование проводили в соотношении 10:1 бактерий на макрофаг. После инкубации клетки отмывали в бессывороточной культуральной среде (37°C, 5 мин), фиксировали 3,7%-ным параформальдегидом (MP Biochemical, Франция) на PBS (15 мин), отмывали в PBS (3 раза по 5 мин) и дополнительно окрашивали ядра DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол; Sigma-Aldrich, США), DAPI добавляли в PBS до конечной концентрации 100 нМ на 10 мин. Препараты заключали в мовеол (Hoechst, Германия).

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Фотосъемку клеток, инфицированных *M. bovis* BCG-GFP, проводили на микроскопе Leica

TCS SPE (Leica Microsystems, Германия) при длине волны лазера 488 нм. Ядра, окрашенные DAPI, анализировали при длине волны лазера 405 нм. Обработку изображений осуществляли с помощью программного пакета Leica LAS AF (Leica Microsystems, Германия). Анализ фагоцитарной активности клеток оценивали как процент клеток, вступивших в фагоцитоз, от общего числа клеток по результатам трех экспериментов. В каждом эксперименте $n = 5000$ клеток. Для анализа данных использовали программное обеспечение Statistica 10, параметрический t-критерий Стьюдента. Этот критерий был выбран, так как данные имели нормальное распределение, что было проверено для каждой выборки по критерию Шапиро-Уилкса. Выборка в 5000 клеток была выбрана заранее согласно расчету 95%-ного доверительного интервала (биномиальная формула Уилсона).

СЭМ. Клетки фиксировали 2,5%-ным глутаральдегидом на PBS (pH 7,4) в течение 30 мин при 25°C и обезжизивали по следующей схеме: 50°, 70°, 80° и 96° спирт, ацетон (в каждой смене два раза по 10 мин). Образцы высушивали в критической точке (для CO₂ 31°C, 73,8 бар). Напыление производили смесью металлов Au-Pd и исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6380 LA (Jeol, Токуо, Япония) при напряжении 20 кВ. Исследования методом СЭМ были проведены с использованием оборудования центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ имени М.В. Ломоносова (уникальная научная установка «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия»).

Результаты

Морфологическая характеристика клеточной поверхности инфицированных *M. bovis* BCG-макрофагов ТНР-1 без и в присутствии ЭЛС. Методом СЭМ изучена поверхность клеток ТНР-1 после инфицирования: на поверхности клеток преимущественно формируются округлые выросты размером до 0,2 мкм, складки, одиночные раффлы и филоподии размером до 1 мкм (рис. 1, А–В). Одиночные микобактерии палочковидной формы размером 1–2 мкм выявляются на поверхности клеток, где в области их контакта формируются выросты плазматической мембраны, захватывающие *M. bovis* BCG.

При культивировании клеток в присутствии *M. bovis* BCG и ЭЛС регистрируется значительная активация клеточной поверхности с формированием многочисленных филоподий, раффлов, округлых выростов, складок и фагоцитарных чаш (рис. 1, Д–Ж). Следует отметить, что при введении ЭЛС не только становится более выраженным формирование структур плазматической мембраны, характерных для инфицированных макрофа-

гов ТНР-1, но и появляются новые варианты: выросты округлой формы размером 0,5–1 мкм, филоподии размером 2–4 мкм и фагоцитарные чаши (таблица). В таких клетках достоверная идентификация *M. bovis* BCG среди клеточных выростов затруднена.

Фагоцитарный индекс инфицированных *M. bovis* макрофагов ТНР-1 без и в присутствии ЭЛС. Подсчеты фагоцитарного индекса показали, что в присутствии ЭЛС макрофаги ТНР-1 активно захватывают или поглощают *M. bovis* BCG-GFP, внутриклеточная локализация которых показана при помощи метода КЛСМ (рис. 1, Г–З). Фагоцитарный индекс через 3 ч инкубации в присутствии ЭЛС составляет $14,35 \pm 1,24$ против $8,28 \pm 0,9$ (даны средние значения $\pm$ стандартное отклонение по результатам 3 экспериментов) в контроле, т.е. возрастает в 1,7 раза ($p = 0,012$).

Таким образом, ЭЛС является эффективным активатором клеточной поверхности и поглощения *M. bovis* BCG-GFP в клетках ТНР-1, характеризующихся высокой функциональной активностью Р-гр. При этом важно отметить, что реакция клеточной поверхности макрофагов ТНР-1 в присутствии ЭЛС является более активной и выраженной, чем только в присутствии *M. bovis* BCG. Это демонстрирует, что ЭЛС является эффективным активатором фагоцитоза.

Активация клеточной поверхности K562 и K562/i-S9 при инкубации с ЭЛС. Родительские клетки K562 имеют округлую форму и гладкую поверхность, на которой идентифицируются отдельные раффлы (рис. 2, А, Б). Клетки K562/i-S9 также имеют преимущественно округлую форму, и на их поверхности формируются многочисленные складки (рис. 2, В, Г).

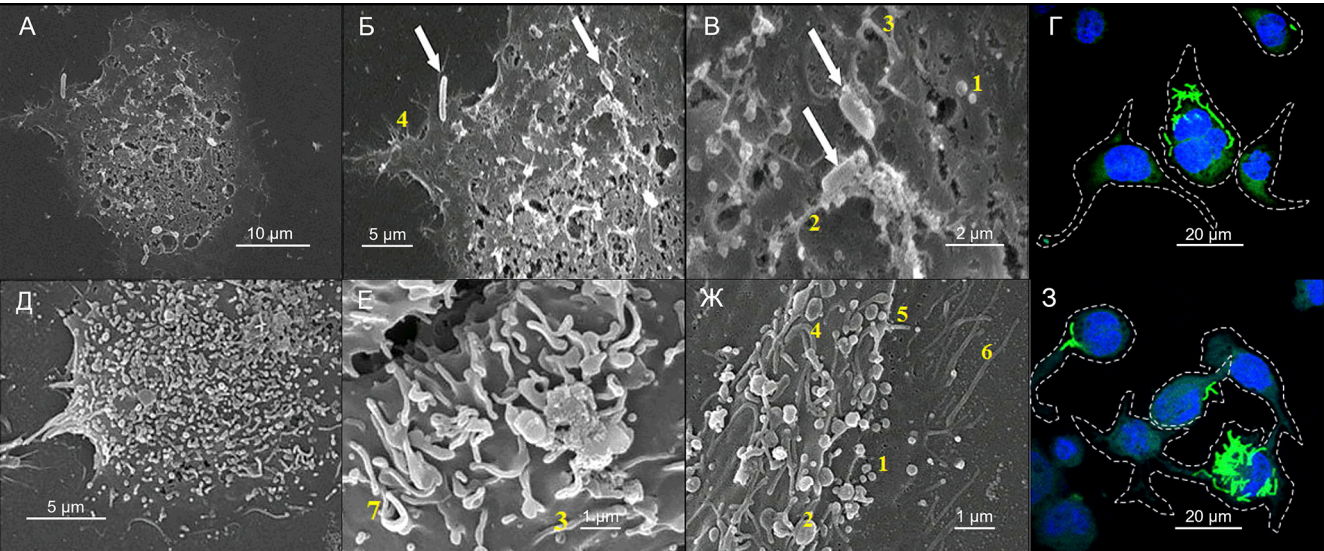


Рис. 1. Фагоцитарная активность инфицированных штаммом *M. bovis* BCG макрофагов ТНР-1 в присутствии ЭЛС. А–В – макрофаги ТНР-1, инфицированные штаммом *M. bovis* BCG. Стрелки указывают на *M. bovis* BCG на поверхности клеток. Д–Ж – макрофаги ТНР-1, инфицированные штаммом *M. bovis* BCG, в присутствии 1 мг/мл ЭЛС. 1 – выросты округлой формы размером до 0,2 мкм; 2 – выросты округлой формы размером 0,5–1 мкм; 3 – складки; 4 – раффлы; 5 – филоподии размером до 2 мкм; 6 – филоподии размером 2–4 мкм; 7 – фагоцитарная чаша. СЭМ. Г – ТНР-1, инфицированные *M. bovis* BCG-GFP. 3 – ТНР-1, инфицированные *M. bovis* BCG-GFP, 1 мг/мл ЭЛС. Зеленый цвет – *M. bovis* BCG-GFP, синий цвет – DAPI. Пунктирной линией показаны границы клеток, нанесенные на основе изображений микроскопии дифференциально-интерференционного контраста; КЛСМ

Таблица

Анализ структур поверхности клеток экспериментальных моделей при воздействии ЭЛС

	ЭЛС 1 мг/мл	Структуры плазматической мембраны						
		Складки	Раффлы	Филоподии 0,2–1 мкм	Филоподии 2–4 мкм	Округлые выросты 0,1–0,2 мкм	Округлые выросты 0,5–1 мкм	Фагоцитарные чаши
ТНР-1 + <i>M. bovis</i> BCG	–	+++	+	+	–	+	–	–
	+	+++	++++	+++	+++++	++++	+++++	+
K562	–	+		+	+	–	–	–
	+	++	+	+	++	+	++	–
K562/i-S9	–	++	–	–	+	–	–	–
	+	+	+++	+++++	++++	++++	++++	+

Примечание: количество «+» отражает выраженность плазматической мембраны на основе проведенных подсчетов с фото поверхности 30 клеток в каждом варианте

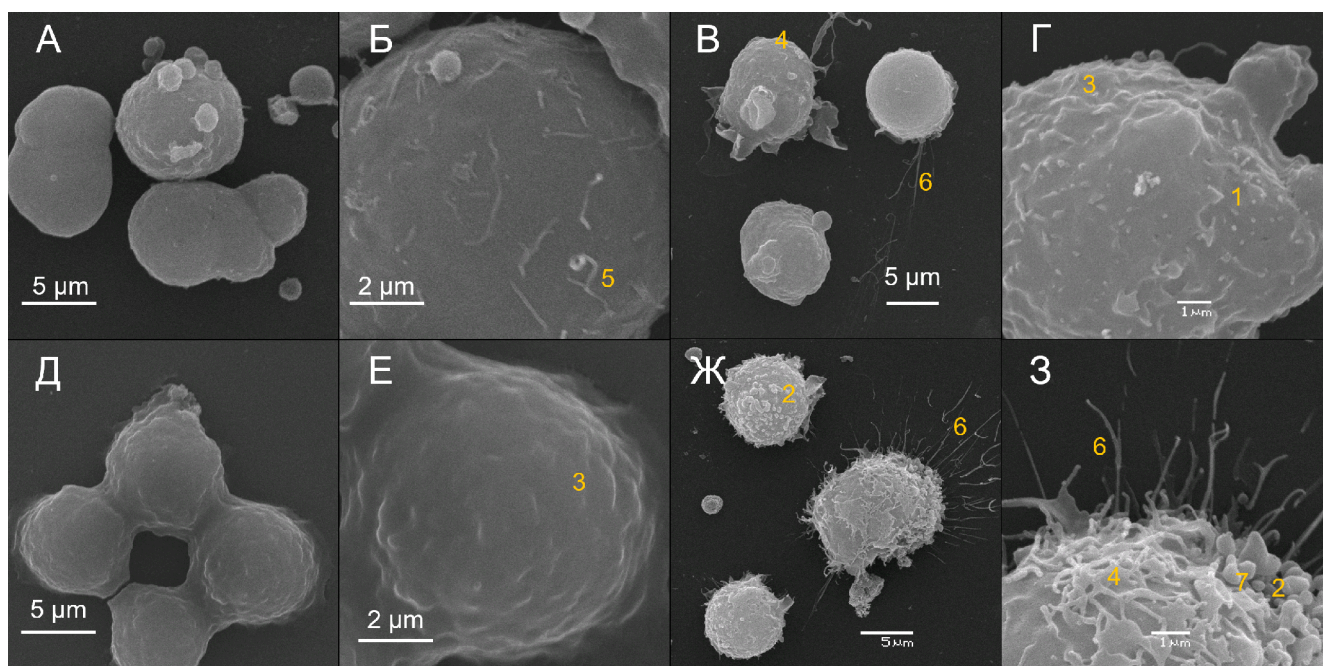


Рис. 2. Клеточная поверхность K562 и K562/i-S9, нативная и активированная ЭЛС. А, Б – контрольные клетки K562; В, Г – K562 в присутствии 1 мг/мл ЭЛС; Д, Е – контрольные клетки K562/i-S9; Ж, З – K562/i-S9 в присутствии 1 мг/мл ЭЛС. 1 – выросты округлой формы размером до 0,2 мкм; 2 – выросты округлой формы размером 0,5–1 мкм; 3 – складки; 4 – раффлы; 5 – филоподии размером до 2 мкм; 6 – филоподии размером 2–4 мкм; 7 – фагоцитарная чаша; СЭМ

Под действием ЭЛС на поверхности клеток K562 образуются отдельные филоподии длиной 1 мкм, раффлы и складки (рис. 2, Д, Е). Клетки линии K562/i-S9 в присутствии ЭЛС формируют на всей поверхности многочисленные филоподии, длина которых достигает 10 мкм, а также многочисленные складки и раффлы (рис. 2, Ж, З). Характеристика вариантов структур плазматической мембраны приведена в таблице.

Таким образом, наши данные напрямую демонстрируют зависимость активации клеточной поверхности миелоидных клеток K562 и K562/i-S9 от присутствия функционально-активного P-gr при действии ЭЛС.

Обсуждение

В данной работе продемонстрировано, что: (1) ЭЛС является эффективным активатором фагоцитоза при инфицировании макрофагов P-gr⁺ в модели *in vitro*; (2) выраженность эффекта ЭЛС как активатора фагоцитоза связана с присутствием P-gr, что доказано с использованием двух вариантов линии K562. Клетки K562/i-S9 отличаются от родительской линии K562 трансфекцией гена *ABCB1* и экспрессией P-gr и именно в них ЭЛС индуцирует массовое формирование различных выростов плазматической мембраны.

Выявленные морфологические изменения клеток в присутствии ЭЛС согласуются с данными, полученными для клеточной линии моноцитарной лейкемии мыши P388. Методом СЭМ продемонстрировано, что при действии адриамицина

для клеток P388/AdR (P-gr⁺) характерно образование длинных ворсинчатых выростов и складок, в то время как клетки P388/0 (P-gr⁻) формируют только короткие выросты [16].

Образование выростов плазматической мембраны сопровождается соответствующими изменениями цитоскелета, которые могут быть вызваны взаимодействием между P-gr и актином. В пользу этого предположения говорят данные, что фибробласты сирийского хомячка, отобранные по признаку высокой экспрессии P-gr с помощью селекции колхицином, характеризуются реорганизацией актинового цитоскелета и высокой метастатической активностью [17]. Наличие связи между P-gr, актиновыми филаментами и развитием лекарственной устойчивости клеток предполагается и в других работах [18]. Так, например, цитохалазин, нарушающий сборку микрофиламентов, усиливает внутриклеточное накопление лекарственных агентов в лейкозных клетках, экспрессирующих P-gr [19]. А нарушение структуры актинового цитоскелета увеличивает внутриклеточное накопление лекарственных средств и их цитотоксический эффект в клетках остеосаркомы, которые также экспрессируют P-gr [20].

Изучив ранее опубликованные работы, мы предположили, что взаимодействие P-gr и актинового цитоскелета опосредовано белками семейства ERM, в которое входят эзрин (Ezrin), радиксин (Radixin) и моэзин (Moesin). Эти белки действуют как связующие звенья между актиновым цитоскелетом и различными белками плазматической

мембраны, включая P-gp, MRP2 и HER2 [21]. ERM играют критическую роль в поддержании транспортной функции P-gp и его локализации на плазматической мембране, а также колокализуются с P-gp [22]. Принимая во внимание имеющиеся взаимодействия между P-gp, белками ERM и активными филаментами, можно предположить, что клетки P-gp⁺ более склонны к активации клеточной поверхности и фагоцитозу, чем клетки P-gp⁻. При этом важно изучить роль P-gp не только при активации фагоцитоза, но и других вариантов эндоцитоза [23]. Это может быть актуально для повышения эффективности доставки лекарств в очаг туберкулезного воспаления.

Заключение

Нам представляется перспективным направлением разработка и применение противотуберкулезных препаратов – активаторов фагоцитоза. Для макрофагов реализация фагоцитарной активности является их фундаментальным свойством, позволяющим им бороться с возбудителем ТЛ. Анализ особенностей реализации фагоцитоза может в дальнейшем способствовать выявлению перспективных мишеней для разработки новых терапевтических и фармакологических подходов, повышающих эффективность противотуберкулезной терапии – в частности, в рамках развития тера-

пии, направленной на пациента (host directed therapy). Как показывают наши данные, P-gp влияет на активность фагоцитарного процесса: выявлена взаимосвязь между присутствием функционально активного P-gp на плазматической мембране и активацией поверхности миелоидных клеток под действием ЭЛС. Требуется дальнейшее уточнение роли P-gp в данном процессе, в том числе с применением разных вариантов ингибирования P-gp. Это является важным не только для лучшего понимания данного феномена, но и для разработки новых подходов лечения ТЛ в рамках персонализированной медицины.

Выражаем благодарность заведующему отделом иммунологии Центрального научно-исследовательского института туберкулеза д.м.н., профессору В.В. Еремееву за предоставленные микобактерии *M. bovis* BCG-GFP. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного заказа Правительства Российской Федерации Центральному научно-исследовательскому институту туберкулеза и Московскому государственному университету имени М.В. Ломоносова. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Lepekha L.N., Alexandrova E.A., Erokhina M.V. *In vitro* effects of pulmonary surfactant on macrophage morphology and function. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012;152(4):489–493.
3. Gordon S. Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity*. 2016;44(3):463–475.
4. Mairinger S., Hernández-Lozano I., Filip T., Löbsch M., Stanek J., Zeitlinger M., Hacker M., Tournier N., Wanek T., Ehrhardt C., Langer O. Influence of P-glycoprotein on pulmonary disposition of the model substrate [11C] metoclopramide assessed by PET imaging in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2023;183:106404.
5. Pavlova E.N., Lepekha L.N., Rybalkina E.Yu., Tarasov R.V., Sychevskaya K.A., Voronezhskaya E.E., Masyutin A.G., Ergeshov A.E., Erokhina M.V. High and low levels of ABCB1 expression are associated with two distinct gene signatures in lung tissue of pulmonary TB patients with high inflammation activity. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(19):14839.
6. Wishart D.S., Knox C., Guo A.C., Shrivastava S., Hassanali M., Stothard P., Chang Z., Woolsey J. Drugbank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D668–D672.
7. Wu Q., Hossfeld A., Gerberick A., Saljoughian N., Tiwari C., Mehra S, et al. Effect of Mycobacterium tuberculosis enhancement of macrophage P-glycoprotein expression and activity on intracellular survival during antituberculosis drug treatment. *J. Infect. Dis.* 2019;220(12):1989–1998.
8. Juvalé I.I.A., Hamid A.A.A., Halim K.B.A., Has A.T.C. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. *Heliyon*. 2022;8(6):e09777.
9. Kobori T., Tameishi M., Tanaka C., Urashima Y., Obata T. Subcellular distribution of ezrin/radixin/moesin and their roles in the cell surface localization and transport function of P-glycoprotein in human colon adenocarcinoma LS180 cells. *PLoS One*. 2021;16(5):e0250889.
10. Mylvaganam S., Freeman S.A., Grinstein S. The cytoskeleton in phagocytosis and macropinocytosis. *Curr. Biol.* 2021;31(10):R619–R632.
11. Kurnina A.V., Erokhina M.V., Makarevich O.A., Sysoeva V.Yu., Lepekha L.N., Kuznetsov S.A., Onishchenko G.E. Plasticity of human THP–1 cell phagocytic activity during macrophagic differentiation. *Biochemistry (Mosc.)*. 2018;83(3):200–214.
12. Erokhina M.V., Pavlova E.N., Tarasova E.K., Kurnina A.V., Potashnikova D.M., Lepekha L.N., Ergeshov A.E., Onishchenko G.E. Nanoparticles of lactic acid polymer with rifampicin decrease the P-gp multidrug transporter activity in human macrophages. *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2022;77(3):152–158.
13. 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. *Antibiot Khimioter.* 2022;67(3–4):16–22.

14. Sadofsky L.R., Hayman Y.A., Vance J., Cervantes J.L., Fraser S.D., Wilkinson H.N., Williamson J.D., Hart S.P., Morice A.H. Characterisation of a new human alveolar macrophage-like cell line (DAiSy). *Lung*. 2019;197(6):687–698.
15. Mechetner E.B., Schott B., Morse B.S., Stein W.D., Druley T., Davis K.A., Tsuruo T., Roninson I.B. P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94(24):12908–12913.
16. Radel S., Fredericks W., Mayhew E., Baker R. P-glycoprotein expression and modulation of cell-membrane morphology in adriamycin-resistant P388 leukemia cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1990;25(4):241–246.
17. Erokhina M.V., Shtil A.A., Shushanov S.S., Sidorova T.A., Stavrovskaya A.A. Partial restoration of the actin cytoskeleton in transformed Syrian hamster fibroblasts selected for low levels of 'typical' multidrug resistance. *FEBS Lett.* 1994;341(2–3):295–298.
18. Su L., Fu L., Li Y., Yang F., Zhang M., Hu D. Disruption of the association between drug transporter and actin cytoskeleton abolishes drug resistance in hypertrophic scar. *Oncotarget*. 2016;8(2):2617–2627.
19. Tsuruo T., Iida H. Effects of cytochalasins and colchicine on the accumulation and retention of daunomycin and vincristine in drug resistant tumor cells. *Biochem. Pharmacol.* 1986;35(7):1087–1090.
20. Takeshita H., Kusuzaki K., Ashihara T., Gebhardt M.C., Mankin H.J., Hirasawa Y. Actin organization associated with the expression of multidrug resistant phenotype in osteosarcoma cells and the effect of actin depolymerization on drug resistance. *Cancer Lett.* 1998;126(1):75–81.
21. Ogihara T., Mizoi K., Kamioka H., Yano K. Physiological roles of ERM proteins and transcriptional regulators in supporting membrane expression of efflux transporters as factors of drug resistance in cancer. *Cancers*. 2020;12(11):3352.
22. Yano K., Okabe C., Fujii K., Kato Y., Ogihara T. Regulation of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein by ezrin, radixin and moesin in lung, intestinal and renal cancer cell lines. *J. Pharm. Pharmacol.* 2020;72(4):575–582.
23. Hirota K., Terada H. *Molecular Regulation of Endocytosis*. InTech; 2012. 414 pp.

Поступила в редакцию 05.02.2025

После доработки 06.06.2025

Принята в печать 09.10.2025

RESEARCH ARTICLE

The activity of the transporter protein P-gp in human macrophages enhances the effect of pulmonary surfactant

E.K. Tarasova¹ , L.N. Lepekha¹ , A.G. Masyutin^{1, 2} ,
E.A. Scherbakova¹ , M.V. Erokhina^{1, 2, *} 

¹Department of Pathomorphology, Cell Biology and Biochemistry, Central Tuberculosis Research Institute, 2 Yauzskaya Alleya, Moscow, 107564, Russia

²Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

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

Pulmonary surfactant is an essential component of the respiratory system for the implementation of phagocytosis by alveolar macrophages. Pulmonary tuberculosis is associated with the reduced pulmonary surfactant production and the phagocytic function of macrophages. The transporter protein P-gp (*ABCB1* gene) is overexpressed in lung cells and exports numerous substrates. The incorporation of P-gp into the plasma membrane alters its characteristics. The aim of this study was to analyze the relationship between P-gp and the phagocytic activity of macrophages under the influence of exogenous pulmonary surfactant. The study employed scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy methods, as well as two models of cultured human cells: (1) pro-inflammatory THP-1 macrophages (P-gp+), infected with *M. bovis* BCG (this model, when exposed to surfactant, is considered a model of alveolar-like macrophages); and (2) parental myeloblastic leukemia K562 cells (P-gp-) and K562/i-S9 cells (P-gp+) transfected with the *ABCB1* gene and induced to adhere. In model 1, it was found that the addition of 1 mg/ml of exogenous pulmonary surfactant for 1 h led to the formation of numerous long filopodia, ruffles, and phagocytic cups, as well as a 1.7-fold increase in the phagocytic index. This demonstrates that the surfactant is an effective activator of phagocytosis in infected macrophages. In model 2, it was shown that in the presence of P-gp, the surface activity of cells significantly increased under the influence of exogenous pulmonary surfactant compared to cells without P-gp. It is hypothesized that due to the interaction between P-gp, ERM complex proteins (ezrin, radixin, moesin) and actin filaments, P-gp+ cells are more potentiated for cell surface activation and phagocytosis than P-gp- cells. Further analysis of the features of infected macrophages' phagocytosis depending on P-gp activity may contribute to the development of new drugs aimed at regulating the phagocytic activity of macrophages.

Keywords: *tuberculosis, P-glycoprotein, pulmonary surfactant, macrophages, M. bovis BCG, scanning electron microscopy, confocal laser microscopy*

Funding: 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 and Lomonosov Moscow State University.

Сведения об авторах

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>

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>

Масютин Александр Георгиевич — ст. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ; ст. науч. сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-785-91-79; e-mail: squiggoth@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8067-4261>

Шербакова Екатерина Андреевна — мл. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии отдела патоморфологии, клеточной биологии и биохимии ЦНИИТ. Тел.: 8-499-785-91-79; e-mail: scherbakova_katya@yahoo.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-5651-1454>

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>