УДК 577.217:577.2:58 https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1390

САМОФАЛОВА Д. О.[1]✉, РАЄВСЬКИЙ О. В.[1], ОЖЕРЄДОВ С. П.[1], СПІВАК С. І.[1], СТИХИЛЯС М. М.[2], ОЖЕРЄДОВ Д. С.[2], КАРПОВ П. А.[1]

[1] Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Україна, 04123, м. Київ, Осиповського, 2А

[2] Інститут високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна,03022, м. Київ, просп. Глушкова, 4-г

✉ *samofalova.dariya@gmail.com, (066) 037-19-32*

АНАЛІЗ МЕХАНІЗМІВ ВЗАЄМОДІЇ ОСНОВНИХ МІШЕНЕЙ ТАРГЕТНОЇ ТЕРАПІЇ ТУБЕРКУЛЬОЗУ З ЇХ СЕЛЕКТИВНИМИ ІНГІБІТОРАМИ

Мета. Ефективність боротьби проти туберкульозу залежить від нових стратегій лікування. Одним із найбільш потенційно важливих напрямків є розробка і пошук принципово нових класів речовин. Пошук нових інгібіторів мітотичного апарату мікобактерії та ряду мішеней ензиматичної природи. ***Методи.*** Реконструкцію й оптимізацію геометрії 3D-моделей ключових мішеней та аналіз біологічно активних конформацій інгібіторів виконували згідно з раніше розробленою методикою. ***Результати.*** Проведена ревізія інгібіторів мікобактерій, які проявляють антимікробну дію проти представників роду *Mycobacterium*, що дозволило створити відповідну референтну бібліотеку сполук. Реконструйовано та верифіковано повну просторову структуру ряду основних мішеней таргетної терапії туберкульозу та встановлено особливості їх взаємодії із селективними інгібіторами. Виконано хемогеномне профілювання, що дозволило зробити висновки стосовно унікальності досліджених сайтів і потенційної токсичності споріднених з цими сайтами сполук для людини. ***Висновки.*** Відпрацьований алгоритм пошуку відомих інгібіторів білків із *M. tuberculosis* дозволяє подальше дослідження особливостей їх взаємодії з відповідними гомологами *M. bovis* та розробки нових, більш селективних сполук за допомогою методів молекулярної динаміки та докінгу.

Ключові слова: туберкульоз, структурно-біологічне дослідження *in silico*, препарати проти туберкульозу.

Туберкульоз – інфекційне захворювання, яке безупинно супроводжує людство з моменту його виникнення та протягом усієї еволюції суспільства [1]. Біологічною особливістю збудника цього захворювання є здатність до паразитування у багатьох видів ссавців, зокрема, збудник туберкульозу людини (*Mycobacterium tuberculosis*) входить до комплексу близькоспоріднених видів мікобактерій (т. з. «*Mycobacterium tuberculosis complex*»), до якого також належать: збудник туберкульозу великої рогатої худоби (*Mycobacterium bovis*), збудник туберкульозу мишей (*M. microti*) та *M. africanum*, який має проміжні властивості між *M. bovis* та *M. tuberculosis* [2]. Підтверджено, що *M. bovis* викликає майже 8 % випадків туберкульозу у людей, тоді як останні два види не мають епідемічного значення. Особливо небезпечний цей вид збудника у випадках вживання молока і молочних продуктів без попередньої термічної обробки від хворих на туберкульоз тварин. Також досить поширений аерогенний шлях передачі від тварини до людини. Хоча джерелами *Mycobacterium bovis* для людини можуть бути дикі ссавці: олені багатьох видів, борсуки, ондатри і т.д., збудник туберкульозу великої рогатої худоби має дещо нижчу вірулентність для людини, однак є патогенним і небезпечним.

За офіційними даними, пролонгована епідемія туберкульозу в Україні триває з 1995 року (https://phc.org.ua/) [3]. Беззаперечним фактом є те, що за останні 26 років ситуація лише погіршилась і нині епідемія туберкульозу в Україні вийшла на нову гіпертрофовану стадію [4]. Покращити ефективність боротьби проти цієї недуги можна за допомогою багатьох напрямів [5]. Нова стратегія лікування туберкульозу передбачає відмову від старих методів і корекцію базових протоколів [6]. Однією з найбільш ефективних точок концентрації зусиль є розробка і пошук принципово нових діючих речовин [7–10].

Водночас одним із вирішальних об’єктивних факторів низької ефективності лікування туберкульозу є резистентність мікобактерій до протитуберкульозних препаратів. У таких випадках виникає необхідність більш дорогого, тривалого лікування, де шанси на одужання хворого від мультирезистентного туберкульозу мінімальні. Згідно з індикатором ВООЗ,

ефективність лікування туберкульозу повинна складати 85 % і більше, тоді як в Україні цей показник менший від 80 %. Також важливим фактором є те, що Україна не має вітчизняних препаратів від мультирезистентних штамів *Mycobacterium*, внаслідок чого ціна курсу лікування складає декілька тисяч (у випадку окремих препаратів – десятки тисяч) доларів США на одного пацієнта. Імовірно, мультидисциплінарний підхід та специфіка спектра запланованих молекулярних мішеней дозволять сподіватися на можливість подолання наявної проблеми мультирезистентності *M. tuberculosis* і *M. bovis* [9].

Водночас в останні кілька десятиліть стратегія лікування активного типу туберкульозу залишалася незмінною: стандартна схема прийому препаратів рифампіцину, ізоніазиду, піразінаміду та етамбутолу протягом перших 2 місяців, із заміною на ізоніазид та рифампіцин в наступні 4 місяці [11]. При цьому токсичність лікарських засобів призводить до численних побічних ефектів, зокрема таких, як шкірний висип, непереносимість у шлунково-кишковому тракті, нефропатія, артралгія, підвищення рівня печінкових ферментів, гепатит, імунна тромбоцитопенія, агранулоцитоз, гемоліз, ниркова недостатність, оптичний неврит та ототоксичність, що у 90 % випадків нівелює результат лікування [12]. У зв''язку з цим із 2019 року ВООЗ почала змінювати протоколи лікування хвороби [13].

Враховуючи всі недоліки чинного лікування, розробка нових ефективних ліків проти туберкульозу є нагальною потребою міжнародного рівня. З молекулярно-біологічної точки зору найбільш доцільною є стратегія ідентифікації і використання у клінічній практиці нових лікарських засобів, які скеровані на унікальні білки представників *Mycobacterium*. Головна увага буде надана сполукам, спрямованим на білкові мішені, які через участь у найбільш фундаментальних процесах життєдіяльності мікобактерії зберігають максимальну консервативність і водночас не мають очевидних гомологів у людини і тварин. Останнє є не менш важливим фактором, оскільки побічний токсичний вплив на організм пацієнта є характерною рисою майже усіх наявних препаратів проти туберкульозу.

Саме тому загальною метою нашого дослідження є розробка принципово нового підходу як до методології пошуку хімічних сполук, так і до відбору цільових білків *M. tuberculosis* і *M. bovis* із використанням *in silico, in vitro* та *in situ* підходів. Це створить передумови для подальшої імплементації цього аналітичного підходу для широкого використання у медицині; окрім того, виведе на новий рівень вивчення захворювань свійських тварин, особливо тих, що становлять загрозу для здоров'я людини (тоді як відступ від молекулярних мішеней, яким притаманна міжвидова консервативність, дає нам можливість сподіватися, що знайдені сполуки будуть характеризуватися більш низькими діючими концентраціями та будуть здатні долати мультирезистентність, що в сукупності дозволить послабити токсикологічний тиск на пацієнта). Припускаємо, що запропонована комбінація обчислювальних і лабораторних досліджень дозволяє скоротити матеріальні і часові витрати, потрібні для розробки і пошуку нових препаратів. Завданням цього дослідження було визначення ключових білкових мішеней представників *Mycobacterium* та встановлення структурних особливостей їх взаємодії з відомими сполуками для подальшої розробки нових лікарських препаратів проти туберкульозу.

Матеріали і методи

Дослідження було спрямовано на вивчення таких перспективних мішеней *Mycobacterium*, які не мають явних гомологів у людини, зокрема АМФ лігази (PMID: 22283817), сульфгідрилази (PMID: 17567578), серин-треонін та тирозин протеїнкінази (PMID: 25429354), фруктоза-бісфосфат альдолази (PMID: 24325645), пантотонат-синтези (PMID: 18821554), амінотрансферази (PMID: 26068403), редуктази (PMID: 25383419), тощо.

За основу дослідження було взято протокол, розроблений у ВО CSLabGrid [14,15], проте до нього було додано нові модулі: супровід *in vitro* і / або *in situ* верифікації результатів та ІТ-підтримку. Як референсні структури білків були використані експериментальні структури мішеней із різних штамів Mycobacterium (більш ніж 50 якісних структур, за даними RCSB Protein Data Bank, x-Ray<2,0 Å), що дозволило виконати аналіз рівня подібності сайтів зв'язування лігандів, водночас у якості референсних структур для потенційних інгібіторів були використані хімічні речовини проти цільових сполук (зокрема, більш ніж 4400 унікальних ефекторів проти *M. tuberculosis,* за даними BindingDB). Було відібрано нові мішені без встановлених сайтів зв'язування, які потребують пошуку но-

вих методів розробки лікарських препаратів, зокрема створення комбінаторних бібліотек.

Шаблонні структури для подальшого аналізу були обрані на основі методів BLAST (https://www.uniprot.org/blast/), тоді як більш дистанційно віддалені послідовності обираються за допомогою методу PSI-BLAST з бази даних RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org). Тривимірні моделі досліджуваних білків були побудовані на основі їх первинних послідовностей за допомогою онлайн сервісів SwissModel Workspace (https://swissmodel.expasy.org/interactive) та I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/). Вибір матриць для побудови білків було проведено у ручному режимі на обох ресурсах. Хемо- та біоінформатичний аналіз цільових мішеней, їх сайтів зв'язування і референтних сполук було проведено з використанням програм відкритого коду (UCSF DOCK та ін.) завдяки потужностям Грід-системи і кластера ДУ ІХБГ НАНУ.

Результати та обговорення

За останніми даними МОЗ, туберкульоз залишається однією з 10 найбільших причин смертності у всьому світі, тоді як лікування його є тривалим процесом, що має багато побічних ефектів. Саме розробка нових ефективних препаратів проти туберкульозу, які спрямовані на нові біохімічні шляхи та лікують лікарськостійкі форми захворювання, є нагальною потребою. Попередньо вважалося, що саме пошук нових альтернативних мішеней блокування мітотичного циклу може бути перспективним підґрунтям до розробки нових лікарських препаратів проти туберкульозу, проте додатковий аналіз дозволив сформувати ряд мішеней, які також перспективні для пошуку нових інгібіторів. Відібрані мішені впливають на фундаментальні процеси в клітинах представників *Mycobacterium*, зокрема формування Z-кільця чи опосередковано через асоційовані молекулярні мішені, які не мають явних гомологів у людини. У дослідження первинною вибіркою увійшли такі класи ферментів: рецепторна протеїнкіназа PknB і ключова протеїнкіназа шикіматного шляху – AroK, ацил-АМФ-лігаза (FAAL), що активує жирні кислоти, О-ацетилсерин сульфгідрилази CysK1, фруктозо1,6-біфосфат альдолаза другого класу FBA, пантотенат синтаза тощо (рис.).

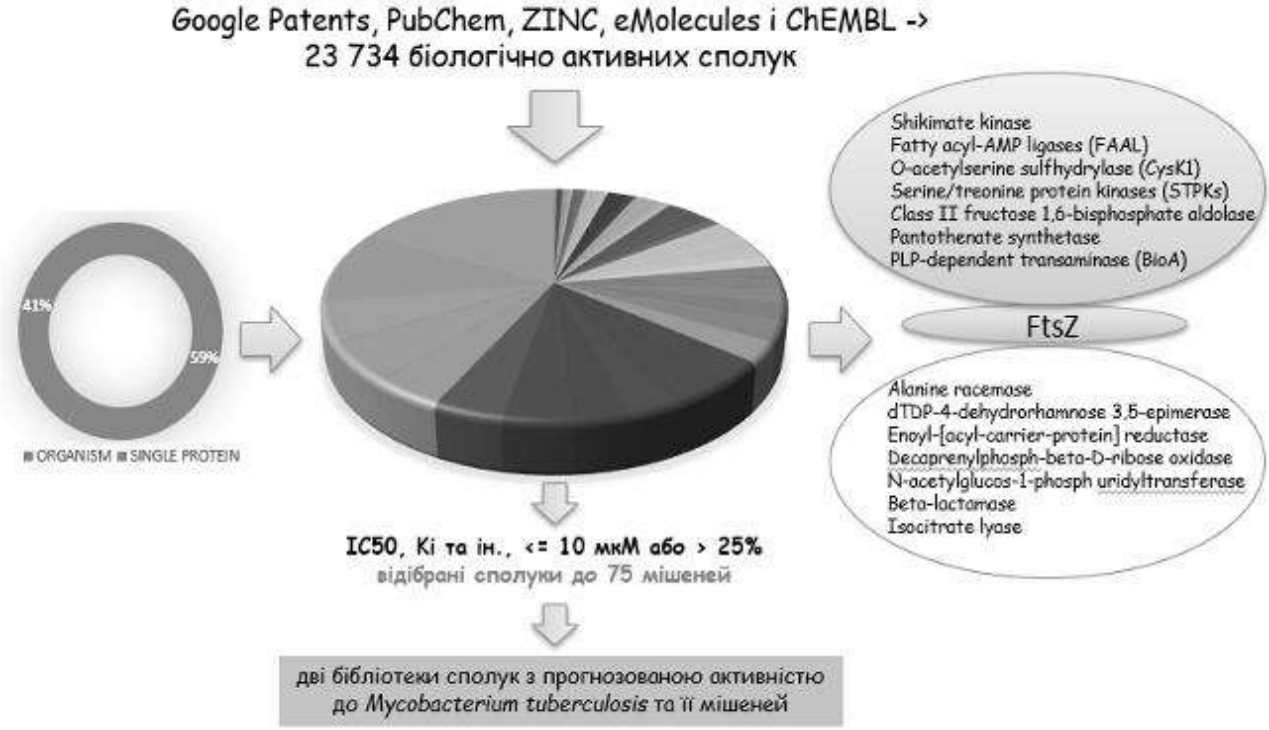

Рис. Алгоритм визначення пріоритетних молекулярних мішеней.

За результатами проведеного пошуку в базах даних Google Patents, PubChem, ZINC, eMolecules і ChEMBL було здійснено аналіз відомих інгібіторів *M. tuberculosis* та відібрано 23734 (IC50, Ki та ін., менш ніж 10 мкМ, інгібування > 25 %) депонованих біологічно-активних речовини із селективною дією щодо мікобактерій як організму та їх цільових білків. Зведену групу потенційних інгібіторів було перевірено згідно з правилами конструювання лікарських засобів (drug design rules), а також на наявність певних фрагментів – характерних фармакофорів. Застосовуючи метод пошуку за гомологією (2Д-фінгерпринти, алгоритм Tanimoto та Tversky із порогом подібності до 85 %) до отриманого набору сполук із баз даних, нами було розроблено дві бібліотеки низькомолекулярних сполук із прогнозованою активністю як до бактерії *M. tuberculosis*, так і для відповідних білкових мішеней. Незважаючи на співвідношення сполук, націлених на організм мікобактерій, та одиничні білки-мішені в підготовлених референтних сетах, де переважають неспецифічні до відібраних ферментів інгібітори, було відібрано групи унікальних сполук та їх аналогів до кожної цільової мішені.

Проведений аналіз амінокислотних послідовностей цільових білків із *M. tuberculosis* та *M. bovis* дозволив встановити спільні та відмінні риси відібраних білків. Так, було встановлено, що, незважаючи на високий рівень ідентичності повних сиквенсів цільових мішеней мікобактерій від 95–100%, встановлені експериментально структури цільових білків із *M. tuberculosis* мають значну кількість прогалин поряд із сайтами зв'язування з інгібіторами та потребують реконструкції повної структури. Близькі гомологи досліджуваних ферментів із *M. bovis* були відсутні у базі даних RCSB Protein Data Bank і потребували подальшого аналізу та реконструкції їх просторової структури, у зв'язку з чим перед реконструкцією було використано метод передбачення вторинної структури SOPMA, що дозволило встановити з вірогідністю до 73 % основні елементи первинної компактизації поліпептидного ланцюга білкової молекули: α-спіралі, β-листи, β-поворот і ділянки з нерегулярною структурою, та уникнути проблем із подальшою реконструкцією просторової структури. Тож подальше моделювання досліджуваних ферментів було виконано за допомогою сервера I-TASSER за стандартних налаштувань, але за винятку матриць іншого типу, низької роздільної здатності чи низьких показників за SOPMA-аналізом. Підготовка відібраних структур *M. tuberculosis i*з RCSB PDB та реконструйованих за шаблонами гомологів із *M. bovis* була проведена за прийнятим алгоритмом; зокрема, оптимізація геометрії була проведена за допомогою силового поля OPLS3.

Подальший аналіз, який включав дослідження механізмів зв'язування відібраних інгібіторів з 6-ма цільовими ферментами, дозволив проаналізувати ключові амінокислотні залишки, що безпосередньо зв'язують ліганди, та встановити ключові особливості їх взаємодії. Варіабельні амінокислотні залишки сайтів, що відповідають за підтримку лігандів на поверхні ферментів, було встановлено на підставі аналізу результатів короткочасної молекулярної динаміки комплексів, використовуючи силові поля MM+ і CHARMM в програмі Gromacs. Зокрема, було встановлено, що інгібітори О-ацетилсерин сульфгідрилази CysK1 містять стабільний фрагмент карбонової кислоти; ця особливість характерна також для інгібіторів усього класу в інших бактерій (так само, як природні субстрати для CysK1 та CysK2, OAS та OPS містять фрагмент карбонової кислоти). Дослідження інгібіторів фруктозо1,6-біфосфат альдолази другого класу дозволило виявити гідроксаматну складову більшості інгібіторів та їх взаємодію з іоном цинку в активному центрі ферментів, тоді як інгібітори ацил-АМФ-лігази жирового шляху (FAAL) переважно розміщені у сайті зв'язування АТФ та мають більшу афінність за субстрат.

Також результати аналізу сайтів зв'язування інгібіторів із білками *M. tuberculosis* було використано для визначення можливого існування в *M. bovis* інших молекулярних мішеней, що мають подібні за складом сайти. Так, за допомогою SIB BLAST було виконано пошук найближчих гомологів і виконано порівняння їх сайтів за допомогою методу філогенетичного профілювання сайтів. Попередньо було встановлено групу потенційних мішеней для CysK1, FBA та PKNB у *M. bovis,* проте результати аналізу амінокислотних профілів інгібіторів АТФ-зв'язуючої кишені та їх кластеризації свідчать, що така взаємодія є малоймовірною, та потребують подальшого вивчення.

Висновки

У результаті дослідження проведена ревізія інгібіторів мікобактерій та відібрано сет біологічно активних речовин, які проявляють антимікробну дію проти представників роду *Mycobacterium*, що дозволило створити відповідну референтну бібліотеку сполук. Реконструйовано та верифіковано повну просторову структуру рецепторної протеїнкінази PknB і протеїнкінази шикіматного шляху – AroK, активатор жирних кислот, ацил-АМФ-лігаза (FAAL), О-ацетилсерин сульфгідрилаза CysK1, фруктозо1,6-біфосфат альдолаза другого класу FBA та пантотенат синтаза з *M. tuberculosis* та *M. bovis* відібрані як найбільш вагомі мішені таргетної терапії туберкульозу. Встановлено особливості їх взаємодії з селективними інгібіторами. З'ясовано, що ліганд-білкова взаємодія із сайтами зв'язування в більшості випадків відбувається за участі іонів металів та молекул води. Виконано хемогеномне профілювання, що дозволило зробити висновки стосовно унікальності досліджених сайтів і потенційної токсичності споріднених із цими сайтами сполук для людини. За результатами пошуку з використанням дескрипторів і аналізу можливих фармакофорів було створено бібліотеку моделей структур інгібіторів цільових ферментів, що пройшли етап релаксації методом молекулярної динаміки і підготовлені для подальшого молекулярного докінгу. Відпрацьований алгоритм пошуку відомих інгібіторів білків із *M. tuberculosis* дозволяє подальше дослідження особливостей їх взаємодії з відповідними гомологами *M. bovis* та розробки нових, більш селективних сполук за допомогою методів молекулярної динаміки та докінгу.

Робота була виконана за підтримки Національного фонду досліджень України (https://nrfu.org.ua/) під час виконання проекту № Держреєстрації 0120U104882 за темою «Створення нових ефективних інгібіторів формування Z-кільця з метою отримання протитуберкульозних препаратів антимітотичної дії» та з використанням потужностей Грід-кластера Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України та віртуальної організації CSLabGrid (http://ifbg.org.ua/uk/cslabgrid).

References

1. Cruz-Knight W., Blake-Gumbs L. Tuberculosis: an overview. *Prim Care.* 2013. Vol. 40 (3). P. 743–756. doi: 10.1016/j.pop.2013.06.003.
2. Riojas M.A., McGough K.J., Rider-Riojas C.J., Rastogi N., Hazbón M.H. Phylogenomic analysis of the species of the Mycobacterium tuberculosis complex demonstrates that Mycobacterium africanum, *Mycobacterium bovis, Mycobacterium caprae, Mycobacterium microti* and *Mycobacterium pinnipedii* are later heterotypic synonyms of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018. Vol. 68 (1). P. 324–332. doi: 10.1099/ijsem.0.002507.
3. Pai M., Behr M., Dowdy D. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016. Vol. 2. P. 16076. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76.
4. Фещенко Ю. І. Сучасні тенденції вивчення проблем туберкульозу. *Український пульмонологічний журнал*. 2019. № 1. С. 8–24.
5. Raviglione M., Uplekar M., Weil D., Kasaeva T. Tuberculosis makes it onto the international political agenda for health…finally. *Lancet Glob Health*. 2018. Vol. 6 (1). P. e20–e21. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30449-7.
6. Macalino S.J.Y., Billones J.B., Organo V.G., Carrillo M.C.O. *In silico* strategies in tuberculosis drug discovery. *Molecules.* 2020. Vol. 25 (3). P. 665. doi: 10.3390/molecules25030665.
7. Fofana M.O., Dowdy D.W. Reply to anthony protecting pyrazinamide, a priority for improving outcomes in multidrug-resistant tuberculosis treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017. Vol. 61 (6). P. e00427–17. doi: 10.1128/AAC.00427-17.
8. Falzon D., Jaramillo E., Gilpin C., Weyer K. The role of novel approaches and new findings in the pharmacology of tuberculosis medicines in improving treatment outcomes. *Clin Infect Dis*. 2018. Vol. 67 (suppl_3). P. S365–S367. doi: 10.1093/cid/ciy710.
9. Velásquez G.E., Becerra M.C., Gelmanova I.Y., Pasechnikov A.D., Yedilbayev A., Shin S.S., Andreev Y.G., Yanova G., Atwood S.S., Mitnick C.D., Franke M.F., Rich M.L., Keshavjee S. Improving outcomes for multidrug-resistant tuberculosis: aggressive regimens prevent treatment failure and death. *Clin Infect Dis*. 2014. Vol. 59 (1). P. 9–15. doi: 10.1093/cid/ciu209.
10. Zwolska Z. Improving treatment outcomes for tuberculosis. *J Bioequiv Availab*. 2017. Vol. 9 (4). P. 442–446. doi: 10.4172/jbb.1000341.
11. Conde M.B., Mello F.C., Duarte R.S. A phase 2 randomized trial of a rifapentine plus moxifloxacin-based regimen for treatment of pulmonary tuberculosis. *PLoS One*. 2016. Vol. 11 (5). P. e0154778. doi: 10.1371/journal.pone.0154778.
12. Saukkonen J.J., Cohn D.L., Jasmer R.M., Schenker S., Jereb J.A., Nolan C.M., Peloquin C.A., Gordin F.M., Nunes D., Strader D.B., Bernardo J., Venkataramanan R., Sterling T.R. ATS (American Thoracic Society) hepatotoxicity of antituberculosis therapy subcommittee. an official ats statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006. Vol. 174 (8). P. 935–952. doi: 10.1164/rccm.200510-1666ST.
13. World Health Organization (WHO) guidelines on the management of latent tuberculosis infection. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO), 2019.
14. Karpov P.A., Brytsun V.M., Raievskyi O.V., Demchuk O.M., Pydiura M.O., Ozheriedov S.P., Samofalova D.O., Spivak S.I., Yemets A.I., Kalchenko V.I., Blium Ya.B. Vysokopropusknyi skryninh rechovyn z antymitotychnoiu aktyvnistiu na bazi virtualnoi orhanizatsii CSLabGrid. *Nauka ta innovatsii*. 2015. T. 11 (1). S. 92–100.

15. Karpov P.A., Demchuk O.M., Britsun V.M., Lytvyn D.I., Pydiura M.O., Rayevsky O.V., Samofalova D.O., Spivak S.I., Volochnyuk D.M., Yemets A.I., Blume Ya.B. New imidazole inhibitors of Mycobacterial FtsZ: the way from high-throughput molecular screening in Grid up to in vitro verification. *Nauka innov*. 2016. Vol. 12 (3). P. 44–59.

SAMOFALOVA D.O.[1], RAEVSKY A.V.[1], OZHEREDOV S.P.[1], SPIVAK S.I.[1], STYKHYLIAS M.M.[2], OZHEREDOV D.S.[2], KARPOV P.A.[1]

[1] *Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Academy of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2a*

[2] *Institute of High Technologies of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 03022, Kyiv, Hlushkova Avenue, 4g, e-mail: samofalova.dariya@gmail.com*

ANALYSIS OF INTERACTION MECHANISMS BETWEEN MAIN OBJECTS OF TUBERCULOSIS-TARGET THERAPY AND CORRESPONDING SELECTIVE INHIBITORS

Aim. Search for new inhibitors of the mitotic apparatus of mycobacterium and a number of enzymatic targets. ***Methods.*** 3D models of key targets reconstruction and geometry optimization and analysis of biologically active conformations of inhibitors were performed according to a previously developed technique. ***Results.*** A revision of mycobacterial inhibitors, which exhibit antimicrobial action against representatives of the genus *Mycobacterium*, was carried out, which made it possible to create an appropriate reference library of compounds. The complete spatial structure of a number of the main targets of targeted therapy for tuberculosis was reconstructed and verified, and the features of their interaction with selective inhibitors were established. Chemogenomic profiling was performed, which made it possible to draw conclusions regarding the uniqueness of the studied sites and the potential toxicity of compounds related to these sites for humans. ***Conclusions.*** A well-developed search algorithm for known inhibitors of proteins with *M. tuberculosis* allows further study of the features of their interaction with the corresponding homologues of *M. bovis* and the development of new, more selective compounds using molecular dynamics and docking methods.

Keywords: tuberculosis, *in silico*, anti-tuberculosis drugs.