

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Утверждено
решением Ученого совета
ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России
«31» октября 2023 г. (протокол №6)

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**по экспертной оценке лекарственных средств, являющихся субстратами
почечных транспортеров**

Москва 2023

Содержание

УВЕДОМЛЕНИЕ.....	4
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.....	4
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
1 Характеристика почечных транспортеров, важность их изучения для оценки нефротоксичности.....	10
2 Изучение нефротоксичности лекарственных средств <i>in vitro</i>	16
2.1 Клеточные системы для исследования нефротоксичности.....	16
2.2 Методы оценки нефротоксичности на клеточных моделях.....	20
3 Оценка нефротоксичности на модели клеточной линии RPTEC.....	23
3.1 Культивирование клеточной линии.....	23
3.2 Контроль монослоя клеточной линии по трансэпителиальному сопротивлению.....	24
3.3 Оценка нефротоксичности лекарственных средств по измерению трансэпителиального сопротивления	26
3.4 Оценка нефротоксичности лекарственных средств по измерению биомаркеров нефротоксичности.....	28
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	33
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 Алгоритм оценки нефротоксичности.....	35
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 Методика определения Кластерина.....	36
ПРИЛОЖЕНИЕ 3 Методика определения Цистатина С.....	38
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	40

Авторский коллектив

В.Г. Кукес главный научный сотрудник ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, академик РАН, д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ

В.А. Меркулов заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, д.м.н., профессор

А.Б. Прокофьев начальник научного отдела клинической фармакологии Института исследований и разработок ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, д.м.н., профессор

В.А. Евтеев старший аналитик научного отдела клинической фармакологии Института исследований и разработок ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Н.Д. Бунятян ведущий научный сотрудник научного отдела клинической фармакологии Института исследований и разработок ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, д.м.н., профессор

УВЕДОМЛЕНИЕ

Настоящие методические рекомендации не являются нормативным правовым актом.

Данный документ содержит научно-практические сведения по актуальным вопросам применения маркеров нефротоксичности в области использования антимикробных лекарственных средств, что соответствует действующим нормативно-правовым документам законодательства Российской Федерации в сфере обращения лекарственных средств.

Отклонение от положений методических рекомендаций при условии соблюдения законодательства Российской Федерации не влечет за собой наступления административной или иной ответственности.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Методические рекомендации «Экспертная оценка токсичности лекарственных средств, выводящихся почками *in vitro*» содержат сведения с учетом современных достижений науки и практики в области фармакологии, клинической фармакологии.

Даны современные представления о транспортерах лекарственных средств, выводящихся почками, их роли в обеспечении эффективности и безопасности применения ЛС. Проведен анализ методов оценки нефротоксичности *in vitro*, с описанием различных клеточных культур, применяемых для данной оценки. Описана методика изучения нефротоксичности лекарственных средств на модели клеточной линии RPTEC с представлением результатов собственных экспериментальных исследований, включая экспрессию транспортеров, оценку их функциональной активности, нефротоксичности по трансэпителиальному сопротивлению и по измерению биомаркеров нефротоксичности с представлением алгоритма определения нефротоксичности. Сформулированы рекомендации для производителей лекарств и для экспертов.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

В настоящих методических рекомендациях применяют следующие сокращения и обозначения:

АТФ	-	аденозинтрифосфат
ГГТ	-	гамма-глутамилтрансфераза
ГЭБ	-	гематоэнцефалический барьер
ИПП	-	ингибиторы протонной помпы
ЛДГ	-	лактатдегидрогеназа
ЛС	-	лекарственное средство
МЛВ	-	межлекарственное взаимодействие
НПВС	-	нестероидные противовоспалительные средства
ЛС	-	лекарственные средства
СКФ	-	скорость клубочковой фильтрации
УДФ-ГТ	-	УДФ-глюкуронилтрансфераза
1 MDR1	-	Multi-drug Resistance 1 protein
3R	-	Reduction, Refinement, Replacement, уменьшение (количества тестируемых животных), оптимизация (методик, направленная на минимизацию страдания и стресса животных), замена (тестов на животных на исследования на волонтерах и модели <i>in vitro</i> и <i>in silico</i>)
ABC	-	ATP-binding cassette transporters, АТФ-связывающие кассетные транспортеры
AQP1	-	аквапорин-1
B2M	-	urinary beta-2 microglobulin, бета-2 микроглобулин
BCRP	-	breast cancer resistance protein, белок резистентности рака молочной железы
ciPTEC	-	conditionally immortalized human proximal tubule cell, условно иммортализованные

		клетки проксимальных почечных канальцев человека
SLC	-	solute carrier
CLU	-	clusterin, кластерин
CYP	-	cytochrome P450, цитохром P450
CysC	-	cystatin C, цистатин C
EMA	-	European Medicines Agency, Европейское агентство по лекарственным средствам
FDA	-	Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
GST	-	Glutathione-S-transferase, глутатион-S-трансфераза
ITC	-	International Transporter Consortium
HEK293	-	Human Embryonic Kidney 293, почечные клетки эмбриона человека
HK-2	-	Human Kidney-2, клетки почки человека
HPTC	-	Human Proximal Tubular Cells, клетки проксимальных почечных канальцев человека
hTERT	-	Human Telomerase Reverse Transcriptase, человеческая обратная транскриптаза теломеразы
KIM	-	kidney injury molecule, молекула повреждения почек
MATE(s)	-	multidrug and toxin extrusion protein(s), белок экстррузии лекарственных препаратов и токсинов
MDR(s)	-	multidrug resistance protein(s), белок множественной лекарственной устойчивости

MRP(s)	-	multidrug resistance-associated protein(s), белок, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью
NGAL	-	neutrophil gelatinase-associated lipocalin, липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов
OAT(s)	-	organic anion transporter(s), транспортер(ы) органических анионов
OATP(s)	-	organic anion transporting polypeptide(s), полипептид(ы), транспортирующие органические анионы
OATP1B1/OATP1B3	-	Organic anion transporting polypeptide 1B1/1B3
OCT(s)	-	organic cation transporter(s), транспортер(ы) органических катионов
OCTN	-	organic cation transporter novel family member, транспортер органических катионов/карнитина
P-gp	-	P-glycoprotein, Р-гликопротеин
SLC	-	solute carrier transporters, транспортеры растворенных веществ
TFF	-	urinary trefoil factor, фактор трилистника
TIMP-1	-	tissue inhibitor of matrix metalloprotease, тканевый ингибитор матричной металлопротеиназы
uALB	-	urea albumin, альбумин мочи
VIM	-	vimentin, виментин

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных функций почек является выведение продуктов метаболизма, ксенобиотиков, в том числе и ЛС. Во время этого процесса почки могут быть уязвимы к токсичности [1]. Несколько эпидемиологических исследований показали строгую ассоциацию между использованием таких распространенных ЛС как противовирусные, противоопухолевые препараты, аминогликозидные, бета-лактамы антибиотики, и риском острого почечного повреждения [2]. Однако разработка ЛС, обладающих пониженной почечной токсичностью является сложной задачей, поскольку имеющиеся в настоящее время методы скрининга нефротоксических свойств ЛС *in vitro* обладают низкой предсказуемостью в клинических исследованиях. Кроме того, доклинические исследования часто не выявляют нефротоксических свойств у ЛС из-за видоспецифических отличий метаболического ответа на различные ЛС и экспрессии определенных генов [3].

Неспособность выявить нефротоксические свойства у ЛС на доклиническом этапе обусловлена сочетанием ряда факторов. Во-первых, вследствие отсутствия валидных экспериментальных клеточных моделей *in vitro*. Во-вторых, из-за недостатка надежных биомаркеров повреждения почек в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Также немаловажным является межлекарственное взаимодействие, при котором наблюдается конкуренция ЛС за связывание с транспортером или метаболизирующим ферментом, что еще больше усложняет скрининг и представляет трудности с точки зрения прогнозирования того, какие комбинации ЛС являются наиболее безопасными [4].

Современные экспериментальные модели для скрининга нефротоксических соединений фокусируются главным образом на клеточных линиях проксимальных почечных канальцев, поскольку именно в этом сегменте нефрона происходит захват из крови большинства ксенобиотиков и ЛС [5]. Транспорт ксенобиотиков клетками проксимальных почечных канальцев осуществляется за счет трансмембранных белков, расположенных на базолатеральной и апикальной мембранах клеток. На базолатеральной мембране расположены главным образом транспортеры подсемейства SLC22 (solute carrier), основными из которых являются транспортеры органических катионов (ОСТ) и анионов (ОАТ) [6]. На апикальной

мембране, кроме того, расположены транспортеры суперсемейств ABC (ATP-binding cassette) и MATE (multidrug and toxic compound extrusion) [7]. Функционирование транспортеров служит одной из причин накопления ксенобиотиков и ЛС в клетках проксимальных канальцев и связанной с этим нефротоксичности.

Согласно последним рекомендациям FDA и EMA, исследования ЛС, которые выводятся в основном через почки, следует проводить на клеточных линиях со стабильным уровнем экспрессии генов-транспортеров [8,9]. Так как часто собственный уровень экспрессии транспортеров в клеточных линиях находится на низком уровне или может снижаться при пассировании.

В связи с этим часто клеточные культуры модифицируют путем трансфекции – искусственного введения гена транспортера в клетку.

Транспортеры OAT являются белками, у которых единственная аминокислотная цепь разделена на 12 трансмембранных α -спиралей. В настоящее время для у человека описано 10 изоформ OAT. Наибольшее значение для транспорта ЛС имеют изоформы OAT1 и OAT3. Типичными субстратами OAT среди лекарственных препаратов являются антибиотики из семейства β -лактамов, НПВС, противовирусные, противоопухолевые ЛС [10].

Транспорт субстратов посредством OAT происходит по механизму антипорта, в обмен на анионы дикарбоновых кислот, в частности альфа-кетоглутарат, который потом частично транспортируется обратно в клетку, за счет специального переносчика, так как является важным компонентом катаболизма. Тем не менее, при интенсивном транспорте субстратов OAT клетки проксимальных канальцев находятся в гипоенергетическом состоянии, которое может привести к апоптозу [11].

Клеточные линии *RPTEC (Renal Proximal Tubule Epithelial Cells)* первичных или условно иммортализованных клеток эпителия проксимальных почечных канальцев в настоящее время представляют собой золотой стандарт в качестве экспериментальной модели *in vitro* для оценки нефротоксичности [12].

Разработка моделей *in vitro* для надежного прогнозирования нефротоксических свойств ЛС требует глубокого понимания специфических клеточных мишеней, а также надежных биомаркеров нефротоксичности [13].

Одним из ключевых показателей валидности подобных моделей является стабильный уровень функциональной активности почечных транспортеров, участвующих в выведении ЛС. Данные методические рекомендации позволят выявить возможные нефротоксические эффекты, наблюдающихся при транспорте отрицательно заряженных ЛС через почки, и, таким образом, повысить уровень экспертной оценки широкого спектра препаратов, являющихся субстратами ОАТ-транспортеров.

1 Характеристика почечных транспортеров, важность их изучения для оценки нефротоксичности

Мембранные белки-транспортеры аналогично изоэнзимам цитохрома Р450 участвуют в фармакокинетике и фармакодинамике ЛС.

Локализация транспортеров на границах разных сред определяет их участие в процессах всасывания, распределения и выведения различных ЛС, поэтому основное внимание уделяется исследованию транспортеров с экспрессией в эпителиальных клетках кишечника (кишечник-кровь), печени (гепатоцит-желчь) и почек (кровь-моча) и эндотелиальных клетках мозговых капилляров (гемато-энцефалический барьер).

Транспортеры ЛС относятся преимущественно к двум основным суперсемействам: 1) семейство транспортеров растворенных веществ (solute carrier, SLC) - транспортеры, осуществляющие захват молекул в клетку или инфлюксные транспортеры; 2) семейство АТФ-связывающих кассетных транспортеров (ATP binding cassette, ABC) - это транспортеры, осуществляющие выброс молекул из клетки или эффлюксные транспортеры. Все транспортеры обладают полиспецифичностью, что является предпосылкой к межлекарственному взаимодействию, а также к взаимодействию ЛС и некоторых эндогенных веществ. Например, субстратами субсемейства транспортеров органических анионов ОАТ (Organic anion transporters) являются некоторые простагландины, метаболиты нейротрансмиттеров (норадреналина, допамина, др), ингибиторы АПФ, БРАП, статины, петлевые и тиазидные диуретики, большинство бета-лактамовых антибиотиков, аминогликозиды и другие антибиотики, противовирусные препараты, антагонисты гистаминовых рецепторов, НПВС и другие вещества.

На основании клинических данных были определены транспортеры, играющие клинически значимую роль в фармакокинетике и/или развитии побочных эффектов ЛС: из огромного количества известных транспортеров (около 400) при исследовании лекарственных средств используют достаточно ограниченное количество транспортеров. Так, Международным консорциумом по транспортерам (International Transporter Consortium, ИТС) было выделено 8 транспортеров с возрастающей клинической значимостью (Emerging Clinical Importance), взаимодействие с которыми рекомендовано для оценки при разработке новых ЛС [14]:

- Р-гликопротеин, Р-гр, или белок множественной лекарственной резистентности 1 MDR1 (Multi-drug Resistance 1 protein); ген *ABCB1*. Участвует в кишечном всасывании и экскреции с желчью и мочой ЛС, а также в ограничении проникновения различных ЛС в ЦНС;
- Белок резистентности рака молочной железы BCRP (Breast cancer resistance protein); ген *ABCG2*. Участвует в экстрюзии порфиринов из гепатоцитов и гемопоэтических клеток, секреции витамина В2 в грудное молоко, ограничивает биодоступность и транспорт отдельных ЛС через ГЭБ, гемато-тестикулярный и плацентарный барьеры;
- Транспортные полипептиды органических анионов 1В1 и 1В3 - OATP1B1 и OATP1B3 (Organic anion transporting polypeptide 1B1/1B3); гены *SLCO1B1/SLCO1B3*. Участвуют в транспорте различных амфифильных органических веществ: желчных кислот, стероидных конъюгатов, гормонов щитовидной железы, метотрексата и статинов. Ингибирование транспортных полипептидов органических анионов может повлечь значимое повышение концентрации статинов в крови.
- Транспортные органических анионов 1/3 - OAT1/OAT3 (Organic anion transporter 1/3); гены *SLC22A6/SLC22A8*. Участвуют в почечной экскреции небольших (~500 Да) отрицательно заряженных молекул, межлекарственное взаимодействие на их уровне может повлиять на клиренс ЛС;
- Белки экстрюзии лекарственных средств и токсинов 1 и 2-К - MATE1/MATE2-K (Multidrug and toxin extrusion proteins 1/2-K); гены *SLC47A1/SLC47A2*. Участвуют в почечной экскреции органических анионов

и катионов, могут вызвать накопление ЛС в клетках почечных канальцев с развитием токсичности;

- Транспортёр органических катионов 2 - OCT2 (Organic cation transporter 2); ген *SLC22A2*. Участвует в почечной экскреции органических катионов, в частности метформина.

В таблице 1 представлена краткая характеристика некоторых транспортеров, принимающих участие в переносе ЛС, с указанием субстратов (адаптировано из [14]).

Таблица 1 – Некоторые субстраты и ингибиторы основных транспортеров, участвующих в метаболизме лекарственных средств

Транспортер (ген)	Субстраты	Ингибиторы	Экспрессия
P-gp (<i>MDR1</i>) (<i>ABCB1</i>)	Дигоксин*, лоперамид*, берберин, иринотекан, доксирубицин, винбластин, паклитаксел, фексофенадин, хинидин, талинолол	Циклоспорин*, хинидин*, верапамил	Люминальная мембрана тонкого кишечника и ГЭБ; апикальная мембрана гепатоцитов и эпителиальных клеток проксимальных почечных канальцев
BCRP (<i>ABCG2</i>)	Метотрексат, топотекан, иматиниб, иринотекан, статины*, сульфасалазин, порфирины, эстрон-3-сульфат, празозин	Ритонавир, саквинавир, новобиоцин, гефитиниб	Энтероциты, гепатоциты, проксимальные почечные канальцы, эндотелий головного мозга, плацента, стволовые клетки, молочные железы
Транспортер (ген)	Субстраты	Ингибиторы	Экспрессия
OATP1B1 (<i>SLCO1B1</i>)	Бромосульфоталеин, эстрон-3-сульфат, статины*, правастатин, розувастатин, телмисартан, репаглинид*, валсартан, олмесартан*, билирубин, желчные кислоты	Саквинвир, ритонавир*, лопинавир*, рифампицин*, циклоспорин*	Гепатоциты (синусоидальные)

Продолжение таблицы 1

OATP1B3 (<i>SLCO1B3</i>)	Телмисартан*, репаглинид*, валсартан, бромосульфоталеин, статины*, дигоксин, фексофенадин, олмесартан, желчные кислоты	Рифампицин*, циклоспорин*, итонавир, лопинавир*	Гепатоциты (синусоидальные)
OAT1 (<i>SLC22A6</i>)	ПАГ, адефовир, цидофовир, зальцитабин*, тенофовир*, зидовудин*, ламивудин*, ацикловир*, метотрексат*, ципрофлоксацин*	Пробенецид*, новобиоцин	Проксимальные почечные канальцы, плацента
OAT3 (<i>SLC22A8</i>)	НПВС, цефаклор, цефтизоксим, фуросемид*, буметанид*, эстрон-3-сульфат	пробенецид*, новобиоцин	Проксимальные почечные канальцы, ГЭБ, хориоидное сплетение
MATE1 (<i>SLC47A1</i>)	Метформин, N-метилпиридин, тетраэтиламмоний, цефалексин, цефрадин, фексофенадин, ципрофлоксацин, левофлоксацин	Хинидин, циметидин, прокаинамид, пириметамин	проксимальные почечные канальцы; надпочечники, печень (каналикулярная мембрана); скелетные мышцы
MATE2-K	Креатинин, гуанидин, прокаинамид, тиамин, топотекан, эстрон сульфат, ацикловир, ганцикловир, оксалиплатин	Циметидин, пириметамин	Эпителиальные клетки почечных канальцев
OCT2 (<i>SLC22A2</i>)	N-метилпиридин, тетраэтиламмоний, метформин*, пиндолол, прокаинамид, ранитидин, амантадин, амилорид, оксалиплатин	Циметидин*, цетризин*, тестостерон, хинидин	Проксимальные почечные канальцы, нейроны

* Потенциально возможно применение для клинических исследований *in vivo*.

Наиболее клинически важным аспектом при изучении межлекарственного взаимодействия на уровне транспортеров, который может оказать влияние на

эффективность и безопасность ЛС, является возможность ингибирования одним ЛС другого.

Ингибирование может быть неконкурентным - в случае, если вещество меняет способность транспортера связываться с субстратом, и конкурентным - в случае, если сродство к транспортеру у одного из субстратов выше. При межлекарственном взаимодействии чаще встречается конкурентное ингибирование. Для оценки ингибирования транспортеров используются те же показатели, что и для оценки ингибирования ферментов: константа Михаэлиса (K_m), константа ингибирования (K_i), концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}). Чем ниже значение K_i или IC_{50} , тем больше сродство вещества к транспортеру, и тем значительней его ингибирующий потенциал. Значение IC_{50} зависит от используемого субстрата. K_i представляет собой постоянную величину — константу ингибирования биологически активного вещества.

Таким образом, одно и то же вещество в различных комбинациях может выступать и как субстрат, и как ингибитор транспортера. Для определения вероятности ингибирования на уровне транспортеров по рекомендациям Европейского агентства лекарственных средств (European Medicines Agency, EMA) [15] и Американского управления по контролю за пищевыми и лекарственными продуктами (U.S. Food and Drug Administration, FDA) [16, 17] при разработке новых ЛС рекомендовано проведение исследований *in vitro* для определения, является ли ЛС субстратом или ингибитором конкретного транспортера. Также рекомендуются по результатам исследований *in vitro* проводить исследования по межлекарственному взаимодействию *in vivo*. Для этого испытуемым одновременно с исследуемым ЛС назначают средства, которые являются известными субстратами транспортеров и оценивают изменения их фармакокинетики. Поскольку в естественных условиях ЛС часто является субстратом не одного транспортера, существует метод комплексной оценки взаимодействия с несколькими транспортерами с использованием так называемых коктейлей, которые состоят из нескольких субстратов к различным транспортерам. Основными требованиями к таким субстратам является их специфичность к определенному транспортеру и отсутствие взаимодействия с другими одновременно принимаемыми субстратами.

Клинические последствия межлекарственного взаимодействия на уровне транспортеров обусловлены локализацией и функцией этих транспортеров. Так, транспортеры OAT осуществляют захват субстратов - органических анионов из крови в эпителиальные клетки проксимальных почечных канальцев, а транспортеры MATE1 и MATE2-K - из клеток в просвет канальца. В соответствии с рекомендациями FDA [16], если данные фармакокинетики исследуемого ЛС указывают, что почечная секреция ЛС значительна (т.е. активное выведение исходного ЛС почками $\geq 25\%$ от общего клиренса), при разработке нового ЛС следует провести исследования ЛС *in vitro* на предмет, является ли оно субстратом OAT1/3, а также OCT2 и MATE1 и MATE2-K. Исследуемое вещество является *in vitro* субстратом указанных почечных транспортеров, если: (1) отношение захвата исследуемого ЛС клетками с экспрессией транспортеров к захвату контрольными клетками (или клетками с пустым вектором) составляет ≥ 2 ; и (2) известный ингибитор транспортера снижает захват ЛС до $\leq 50\%$ при менее чем 10-кратной концентрации K_i или IC_{50} .

Таким образом, мембранные белки-транспортеры играют значимую роль в фармакокинетике лекарственных средств, включая такие аспекты как межлекарственное взаимодействие, эффективность и безопасность; изучение транспорта лекарственных средств на стадии разработки позволяет прогнозировать межлекарственное взаимодействие и предупредить развитие нежелательных реакций; возможно целенаправленное использование взаимодействия лекарственных средств с транспортерами для оптимизации лечения и предупреждения развития нежелательных явлений.

2 Изучение нефротоксичности ЛС *in vitro*

При выборе/разработке клеточных моделей для исследования нефротоксичности *in vitro* следует решить несколько вопросов:

- Выбор клеточных линий и валидация их органоспецифичных свойств;
- Выбор методик исследования с учетом предполагаемого механизма токсического действия;
- Выбор релевантных конечных точек оценки нефротоксичности.

2.1 Клеточные системы для исследования нефротоксичности

Определение прямого токсического действия на клетки, выращенные на плашках, для исследования органоспецифической токсичности малоинформативно. Lin Z. с соавт. (2011 г.) провели масштабное исследование цитотоксичности с применением 273 гепатотоксичных, 191 кардиотоксичного и 85 нефротоксичных веществ на линиях клеток, относящихся к разным тканям: HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома), H9c2 (миокард эмбриона) и NRK-52E (проксимальный почечный каналец). Исследование показало, что абсолютное большинство веществ оказывало сходное действие независимо от типа клеток, таким образом, прямое токсическое воздействие на клетки само по себе не может оцениваться как органоспецифическое [18].

Клеточные линии, не являющиеся исходно видо- и органоспецифичными, могут использоваться для определения взаимодействия с транспортерами с целью определения, является ли исследуемое ЛС субстратом и/или ингибитором транспортера. В соответствии с рекомендациями FDA и EMA, если выведение почками ЛС составляет $\geq 25\%$ от общего клиренса, при разработке нового ЛС следует провести исследования ЛС *in vitro* на предмет, является ли оно субстратом OAT1/3, OCT2 и MATE1 и MATE2-K. Для таких исследований можно использовать любые линии бессмертных клеток, основное условие - экспрессия транспортеров, с которыми предполагается взаимодействие ЛС *in vivo* [19]. Экспрессия транспортеров достигается различными способами трансфекции. Более высокое сродство ЛС к транспортеру может привести к ингибированию ЛС-субстрата с меньшим сродством и вызвать токсическое накопление вещества в интерстиции или в клетке [20, 21]. В таких случаях оценивается не нефротоксичность как таковая, а возможность МЛВ на уровне транспортеров.

Для максимально достоверного прогноза нефротоксичности в клинических условиях клетки должны обладать функциональными качествами, максимально приближенными к таковым *in vivo*: обладать экспрессией транспортеров и ферментов, взаимодействующих с исследуемым ЛС. Валидность клеточных систем определяется по нескольким направлениям [22]:

- определение морфологических показателей: при выращивании на полупроницаемых мембранах в виде клеточного монослоя (2.5D) добиваются

плотных межклеточных связей, поляризации клеток на базо-латеральную и апикальную поверхность с наличием ресничек;

- определение функциональных свойств: учитывая, что транспортеры, рецепторы и ферменты функционируют в комплексе, прогностическая ценность систем тем выше, чем шире в ней диапазон функционирующих единиц. Экспрессия транспортеров на транскриптомном и белковом уровне определяется количественной ПЦР и иммуногистохимическим исследованием, функцию транспортеров и рецепторов эндоцитоза мегалин-кубилиновой системы определяют с использованием флуоресцентных субстратов и ингибиторов транспортеров. Определяют активность метаболических энзимов: гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), глутатион-s-трансферазы (GST), УДФ-глюкуронилтрансфераз (УДФ-ГТ), цитохромов (СYP), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), а также аденинтрифосфат (АТФ) и продукцию цитокинов;

- при выращивании почечных клеток из стволовых определяют маркеры, характеризующие зрелость клеток и их принадлежность к почечному эпителию. К ним относится уровень экспрессии белка аквапорина-1 (*AQP1*), транспортеров *BCRP*, *MRPs*, *MDR1* и *MATE* на апикальной поверхности эпителиальных клеток проксимальных канальцев и другие [23-25].

Существенную роль в улучшении функциональных свойств клеток играют способы и условия их культивирования. Культивирование в виде клеточного монослоя на полупроницаемых мембранах (2.5D) позволило более точно оценить взаимодействие инфлюксных и эффлюксных транспортеров при транспорте ксенобиотиков. Для приближения условий к физиологическим дополнительно проводят симуляцию напряжения сдвига потока (*fluid shear stress*), которое испытывают клетки со стороны потока жидкости в канальце в физиологических условиях. Осуществляется подобная симуляция различными способами, например, с помощью насоса или ротации системы. Была показана связь напряжения сдвига потока с формированием ресничек, уровнем экспрессии некоторых транспортеров, усилением транспорта альбуминов мегалин/кубилиновой системой, реорганизацией актина и клеточного скелета [26].

Перспективное направление - выращивание 3-мерных культур (3D) в специальных средах. Secker P.F. с соавт. (2018 г.) показали, что при выращивании

клеток *RPTEC/TERT1* в специальной среде (matrigel) формируются высоко дифференцированные стабильные трубочки, в которых степень экспрессии транспортеров превосходила экспрессию в 2D культуре [27]. Также получила развитие концепция микрофизиологических систем, т.н. почка-на-чипе (*kidney-on-a-chip*) - это комбинация клеточной модели, в идеале 3D, с воссозданием микроокружения или микроструктуры *in vivo*. В частности, в модели проксимального канальца Jansen J. с соавт. (2016 г.), созданной с использованием полых волокон с высевными на внутреннюю поверхность клетками почечного эпителия, демонстрировалась секреция связанных с белками уремических токсинов и реабсорбция альбумина [28]. Для создания "подложки" для выращивания клеток почечного эпителия используют экстрацеллюлярный матрикс [29], а также биопечать [30]. Основным недостатком культур 3D и почка-на-чипе является их малая воспроизводимость и сложность стандартизации оценки.

Для исследования нефротоксичности используют следующие клеточные линии человека.

Линии бессмертных рекомбинантных клеток *HEK293*. Из бессмертных клеточных рекомбинантных линий человека широкое распространение получили почечные клетки эмбриона человека *HEK293* (*human embryonic kidney 293*). Они широко использовались для оценки взаимодействия ЛС с транспортерами, однако, поскольку в клетках *HEK293* содержатся нейрональные маркеры, предполагается, что данные клетки не являются клетками почечного эпителия и, следовательно, не подходят под категорию органоспецифичных клеток для исследования нефротоксичности [31].

Клетки *HK-2* (*human kidney-2*) были получены путем иммортализации с помощью генов вируса папилломы человека, при росте они демонстрируют специфические маркеры эпителиальных клеток проксимальных почечных канальцев, однако для экспрессии некоторых транспортеров (например, OAT и OCT) требуется их дополнительная трансфекция [32,33]. Также была показана слабая экспрессия в этом типе клеток мегалина, – рецептора, который участвует в обратном захвате путем эндоцитоза, например, аминокликозидов, в результате чего клетки *HK-2* оказались нечувствительны к токсическому действию гентамицина [34].

Первичные клетки проксимальных почечных канальцев человека *HPTC* (*Human Proximal Tubular Cells*). Первичные клетки проксимальных почечных канальцев человека получают непосредственно от доноров. В работе Li Y. с соавт. (2013 г.) было показано преимущество клеток *HPTC* по сравнению с *HK-2*. В исследовании 41 нефротоксичных ЛС модель с *HPTC* показала прогностическую ценность на уровне 76-85% [35]. У *HPTC* определяется экспрессия ОАТ, транспортера органических катионов/карнитина (organic cation transporter novel family member) *OCTN-2*, *MRP*, Р-гликопротеина, *BCRP* и различных метаболических ферментов: гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), гамма-глутамилцистеин синтетазы, глутатион-S-трансферазы и других [36]. К недостаткам первичных донорских клеток относится большая межиндивидуальная вариабельность, ограниченная способность к размножению и склонность к потере дифференцировки и экспрессии транспортеров при пассажах.

Клетки, подобные эпителиальным клеткам проксимального почечного канальца, полученные из стволовых клеток эмбриона человека *HPTC-like cells*. Была разработана методика выращивания из эмбриональных клеток человека функционирующих клеток, подобных клеткам проксимального почечного канальца [25], с которыми было проведено аналогичное предыдущему исследованию токсичности 41 ЛС. При сравнении была отмечена более низкая чувствительность клеток, полученных из стволовых, по сравнению с *HPTC*, однако, сохранялось преимущество по сравнению с линией *HK-2*. К недостаткам относится низкая экспрессия мегалина у клеток, выращенных из стволовых, и, вследствие этого, ложноотрицательный результат на нефротоксичность с гентамицином. К достоинствам эпителиальных клеток, выращенных из стволовых клеток, можно отнести их большую доступность и сохранение функциональных свойств при пассажах [37].

Клетки проксимального канальца человека, иммортализованные с помощью человеческой обратной транскриптазы теломеразы *RPTEC/TERT1* (*human telomerase reverse transcriptase, hTERT*). *RPTEC/TERT1* были получены Wieser M. с соавт. в 2008 г. и обладают морфологическими и функциональными характеристиками эпителиальных клеток проксимального канальца человека: наличием микроворсинок, плотных контактов, активности ГГТ, эндоцитоза,

функционирующих транспортеров [38]. *RPTEC/TERT1* могут прожить не менее 90 удвоений популяции.

Условно immortalized эпителиальные клетки проксимальных почечных канальцев *ciPTEC (conditionally immortalized human proximal tubule cells)* – клетки, полученные из мочи добровольцев с трансфекцией *hTERT* и чувствительного к температуре антигена *SV40T*, благодаря которому клетки размножаются при 33°C и созревают при 37°C [39]. Эти клетки также обладают морфологическими и функциональными характеристиками эпителиальных клеток проксимального почечного канальца, однако из-за быстрого снижения экспрессии OAT1 и OAT3 была предложена их дополнительная трансфекция [40].

Псевдо-immortalized первичные клетки эпителия проксимальных почечных канальцев человека *SA7K* были получены из первичных клеток эпителия проксимальных почечных канальцев человека путем трансфекции фактора, выключившего белок клеточного цикла (*cell cycle protein*), в результате чего данные клетки получили пролонгированную способность к размножению. Было показано, что клетки *SA7K* характеризуются экспрессией основных транспортеров, сопоставимой с таковой у первичных эпителиальных клеток почечных канальцев при ранних пассажах, а также чувствительностью к некоторым известным нефротоксикантам. Данная линия предлагается также для исследования нефротоксичности при многократном лекарственном воздействии [41].

2.2 Методы оценки нефротоксичности на клеточных моделях

Результат исследований на клеточных культурах во многом зависит от информативности используемых конечных точек, поэтому методы исследования играют не меньшую роль, чем культуры, на которых эти исследования проводятся. Для оценки токсического действия *in vitro* важно знать не только последствия в виде морфологических и функциональных изменений клетки, но и механизм токсического действия, поскольку он может быть неодинаковым у различных веществ.

Развитие и освоение новых методик оценки изменений, происходящих под действием нефротоксикантов, тесно связаны с развитием и возможностями современных технологий. Наряду с простыми методиками ручного подсчета живых

и мертвых клеток используют различные способы визуализации высокого разрешения, ядерно-магнитный резонанс, иммуноферментный анализ, гистохимические исследования и др.

Ниже представлены наиболее широко используемые критерии оценки цитотоксичности в клеточных системах.

Оценка жизнеспособности клеток

Оценка жизнеспособности заключается в подсчете живых и мертвых клеток и вычислении % живых к общему количеству клеток. Наиболее распространены методы, основанные на проникновении красителей в клетку при нарушении целостности мембраны (накопление трипанового синего), либо при изменении метаболической активности клеток (самый известный метаболический краситель – МТТ, *dimethylthiazol-2-yl*)-2,5-*diphenyltetrazolium bromide*), также используют флуоресцентные метаболические красители. Преимущество флуоресцентных красителей – возможность оценки с помощью флуориметрии [42].

Оценка апоптоза

Для оценки апоптоза определяются связанные с ним морфологические изменения клеток (фазово-контрастная микроскопия): сжатие клетки, конденсация хроматина, формирование полостей в цитоплазме и формирование апоптотических телец; активность каспаз, количественная оценка нуклеосом (иммуноферментный анализ); регистрация апоптоза методом двойного окрашивания аннексин/V-ФИТЦ (флуоресцеин изотиоцианат) [43].

Оценка изменения электрофизиологических показателей

Изменения электрофизиологических показателей, происходящие при нарушении целостности клеточного монослоя, определяются измерением трансэпителиального электрического сопротивления *TEER* (*Trans epithelial electrical resistance*) [44], либо электрического импеданса [45] и характеризуют жизнеспособность клеток. Также определяется митохондриальный мембранный потенциал - количественная оценка мембранного потенциала митохондрий с использованием флуоресценции для оценки нарушений целостности мембраны, - это нарушение может быть результатом токсического воздействия [46, 47].

Оценка метаболических изменений

Для оценки метаболических изменений определяют активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глутатион-S-трансферазы (GST), остаточный лактат, и др. [48]. Также оценивается оксидативный стресс определением активных форм кислорода [49].

Исследование транскриптома

Исследование транскриптома - оценка изменения генной регуляции при воздействии токсических факторов. Aschauer L. с соавт. (2015 г.) на клетках *RPTEC/TERT1* при изучении транскриптомных профилей клеток при повторяющемся воздействии известных нефротоксических веществ и гипоксии показали, что изменения транскриптома в ответ на воздействие некоторых нефротоксикантов является специфичным показателем [50].

Определение биомаркеров острого повреждения почек

Биомаркеры ОПП - достаточно перспективное направление в ранней клинической диагностике ОПП. Консорциумом по тестовому прогнозированию безопасности (*PSTC Predictive Safety Testing Consortium*) в 2009 г. названы маркеры ОПП: молекула почечного повреждения (*kidney injury molecule*) KIM-1, фактор трилистника (*urinary trefoil factor*) TFF-3, бета-2 микроглобулин (*urinary beta-2 microglobulin*) B2M, цистатин С (*CysC*), альбумин мочи (uALB), общий белок мочи (uTP) и кластерин (*CLU*), которые были квалифицированы как маркеры первостепенной важности для исследования почечного повреждения на крысах [51]. В исследовании нефротоксичности на первичных эпителиальных клетках проксимальных почечных канальцев клетках Li Y. с соавт. (2013 г.) отмечали исходно повышенную экспрессию мезенхимального маркера виментина *VIM* (*mesenchymal marker vimentin*), *KIM-1* и липокалина, ассоциированного с желатиназой нейтрофилов (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) *NGAL*. Максимальную чувствительность к токсическому воздействию продемонстрировало повышение экспрессии провоспалительных цитокинов интерлейкина-6 и интерлейкина-8 [35]. В недавнем исследовании нефротоксичности Qiu X. с соавт. (2020 г.) на клетках *RPTEC/TERT1* изучались 18 биомаркеров почечного повреждения, и было показано повышение регуляции кластерина, цистатина С, *GSTπ* и тканевого ингибитора матричной металлопротеиназы (*tissue inhibitor of matrix metalloprotease*) *TIMP-1* в ответ на

воздействие цисплатином, циклоспорином, аристоксоловой кислотой и гентамицином [52].

3 Оценка нефротоксичности на модели клеточной линии *RPTEC*

В настоящее время клеточные линии эпителия проксимальных почечных канальцев являются широко используются в качестве экспериментальной модели для исследования нефротоксических свойств не только при разработке новых лекарственных препаратов, но также для коррекции фармакотерапии использующихся ЛС в клинической практике [53].

3.1 Культивирование клеточной линии *RPTEC*

Клеточная линия проксимальных почечных канальцев человека *RPTEC/TERT* была получена из банка культур клеток ATCC (код: CRL-4031).

Восстановление клеточной линии производилось по следующей методике: Культуральный флакон 25см², содержащий 10мл среды DMEM F12 (с добавлением следующих веществ: рекомбинантный человеческий фактор роста EGF – 10нг/мл, трансферрин – 5мкг/мл, инсулин – 5мкг/мл, гидрокортизон – 25нг/мл, селенит натрия - 8,65нг/мл.) помещали в инкубатор на 15-20 мин для достижения нормального рН (7.0-7.6), а также предотвращения защелачивания среды в процессе восстановления клеток. Пробирку с клетками размораживают на водяной бане в течение 2 минут при температуре 37°С. После размораживания, флакон обрабатывают 70% этанолом и далее все действия проводятся в асептических условиях. Переносят содержимое пробирки центрифужную пробирку, содержащую 9,0мл культуральной среды и центрифугируют при 250g 5-7минут. Супернатант удаляют и ресуспендируют клетки в свежей среде. Полученную суспензию переносят в культуральный флакон. Условия культивирования стандартные: 37°С и 5% CO₂. В эксперименте использовались клетки 14го пассажа

Культивирование

Клетки *RPTEC* (12й пассаж) культивировали в 24ти луночных плашках Costar "Transwell" с мембранными вставками с диаметром пор 0,4μm (рисунок Б.1). Посевная концентрация 45*10³кл/см². Количество клеток в каждой лунке составляло примерно 0,2*10⁶. В качестве культуральной среды использовали DMEM/F12 («Gibco», США), 50 ед./мл гентамицина и 0,1 мг/мл пирувата натрия

(«Santa Cruz», США) при 37°C, 5% CO₂ и относительной влажности 80–85%. В среду были добавлены: инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин – 5 мкг/мл, селенит натрия – 5 мкг/мл, hEGF – 10 нг/мл, гидрокортизон – 25 нг/мл. Замена среды производилась через каждые 2-3 дня. Объем культуральной среды для апикального отдела – 0,1 мл, для базолатерального – 0,6 мл соответственно.

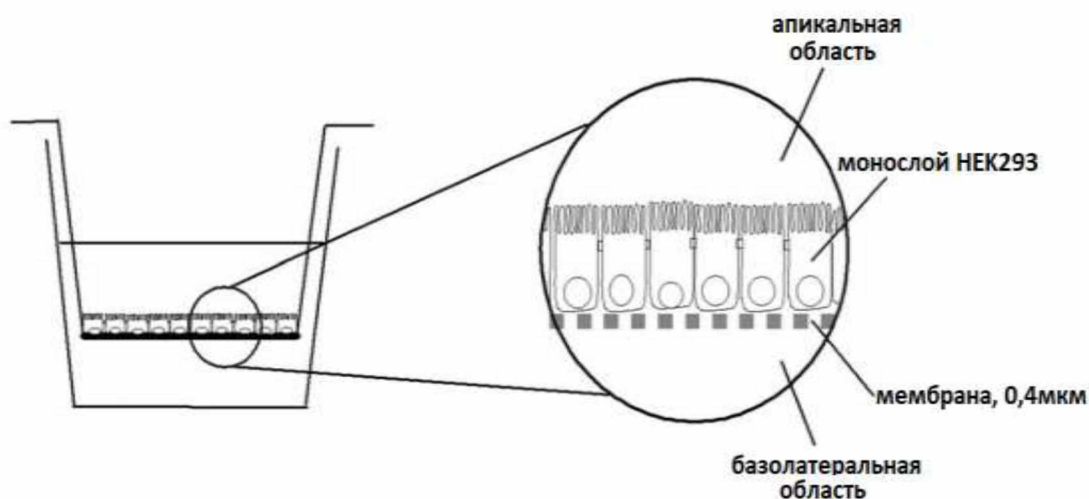


Рисунок Б.1 – Строение лунки планшета с мембранной вставкой

3.2 Контроль монослоя клеточной культуры по трансэпителиальному сопротивлению (*TEER*)

Одним из ключевых показателей валидности экспериментальной модели клеток эпителия является плотность образуемого ими монослоя. Особенная важность плотности монослоя имеет место при использовании почечного эпителия проксимальных канальцев, основная функция которого заключается в транспорте широкого спектра эндогенных субстратов, а также ксенобиотиков, в том числе и ЛС. В связи этим контроль плотности монослоя является необходимым условием для получения экспериментальной модели клеточной линии эпителия проксимальных канальцев [54].

Основным методом количественной оценки плотности монослоя клеточных линий является измерение трансэпителиального сопротивления [55]. Измерение происходит в культуральной среде базальной и апикальной камеры лунки планшета с мембранной вставкой, на которой культивируются изучаемые клетки. Для измерений трансэпителиального сопротивления используют два электрода, один электрод помещают в апикальную камеру, а другой — в базальную, и электроды разделены клеточным монослоем [56]. Теоретически сопротивление можно определить по закону Ома, подав напряжение

постоянного тока на электроды и измерив результирующий ток. Однако постоянный ток может повредить как клетки, так и электроды. Чтобы преодолеть эту проблему, применяется сигнал напряжения переменного тока. В частности, в используемом нами приборе для измерения *TEER* (*EVOM 2, World Millipore.*) используется переменный ток с частотой 12,5Гц, чтобы избежать каких-либо эффектов зарядки электродов и клеточного монослоя. В данном приборе используются пара плоских электродов, каждый стержень которых (шириной 4 мм и толщиной 1 мм) содержит гранулу серебра/хлорида серебра для измерения напряжения и серебряный электрод для пропускания тока. Процедура измерения *TEER* включает измерение сопротивления «бланка» (R_{BL}) - только полупроницаемой мембраны (без клеток) и измерение сопротивления поперек слоя клеток на полупроницаемой мембране (R_{TL}). Расчет удельного сопротивления клеток R_T производится по формуле:

$$R_T = R_{TL} - R_{BL}$$

Так как полученное значение удельного сопротивления обратно пропорционально площади мембраны, на которой культивируются клетки, для получения итогового значения сопротивления, его умножают на площадь мембраны (в см^2).

Общая схема измерения трансэпителиального сопротивления показана на рисунке Б.2.

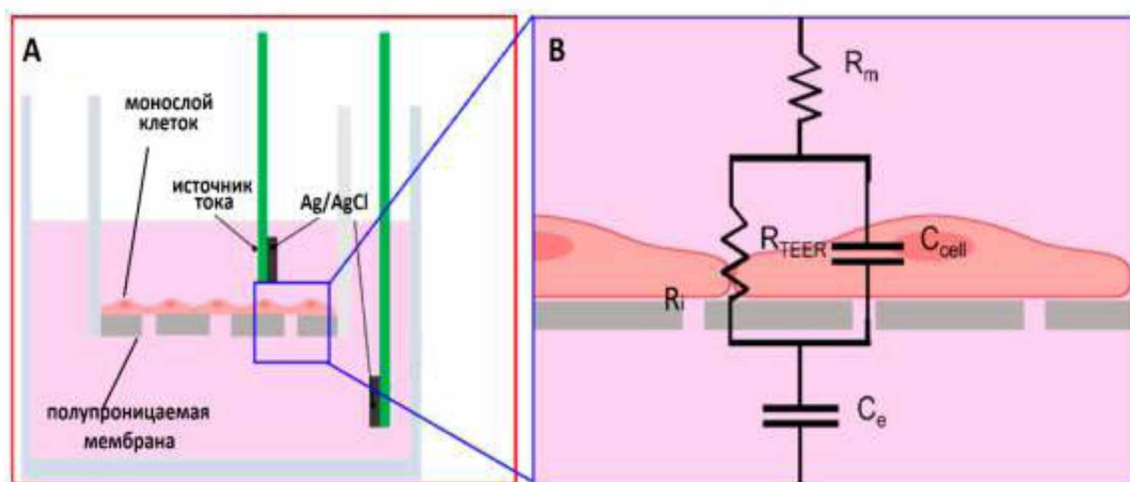


Рисунок Б.2 – Схема измерения трансэпителиального сопротивления. [A]. Расположение электродов в лунке культурального планшета. [B] схема измерения *TEER*: где R_m - сопротивления культуральной среды R_i – сопротивление мембраны. C_e - емкость электрода для измерения сопротивления, R_{TEER} – трансэпителиальное сопротивление

В данном эксперименте показатель трансэпителиального сопротивления клеточной линии *RPTEC* достигал пороговых значений за 2 недели после посева,

вне зависимости от типа планшета. Полученные значения *TEER* (280-320 Ом*см²) изучаемого клона *RPTEC* попадают в диапазон для данной клеточной линии (100-600 Ом*см²) [57].

3.3 Оценка нефротоксичности ЛС по измерению *TEER*

Нами было исследовано влияние нефротоксических ЛС на показатель *TEER* на модели клеточной линии эпителия проксимальных клеточных канальцев *RPTEC/TERT1*. В качестве ксенобиотиков использовались лекарственные препараты с доказанными нефротоксическими свойствами: ванкомицин и цисплатин [58]. Кроме того, использовались бета-лактамы антибиотики – цефепим [59] и дорипенем [60], для которых в некоторых исследованиях отмечены нефротоксические свойства.

Материалы и методы

Культивирование клеточной линии проксимальных почечных канальцев человека *RPTEC/TERT* из банка культур клеток ATCC (код: CRL-4031) проводилось как описано выше (раздел 3.1).

Измерение трансэпителиального сопротивления проводилось на приборе «*ERS-2*» («Millipore», США) с помощью электрода «*MERSSTX01*» («Millipore», США) на 5-й день после посева клеток в культуральный планшет один раз в сутки на протяжении 14 суток (кроме выходных дней). Расчет *TEER* проводился как описано в разделе 3.2 данных методических рекомендаций.

Лекарственные препараты

Для оценки влияния нефротоксических ЛС на показатель *TEER* в клеточной линии *RPTEC* использовались следующие препараты: цисплатин: 2,5мкг/мл; ванкомицин: 50мкг/мл; дорипенем – 20мкг/мл; цефепим – 150мкг/мл. Для каждой концентрации препарата в эксперименте выполнялось 4-5 повторов. Стоковый раствор препаратов (100:1) добавляли в базальную камеру 24-луночного планшета Corning Transwell. Измерения *TEER* проводились 4-5 раз для каждой лунки (рисунок Б.3).

Результаты

Изменение трансэпителиального сопротивления в монослое клеточной линии *RPTEC* при инкубации с ЛС показано на рисунке Б.4.

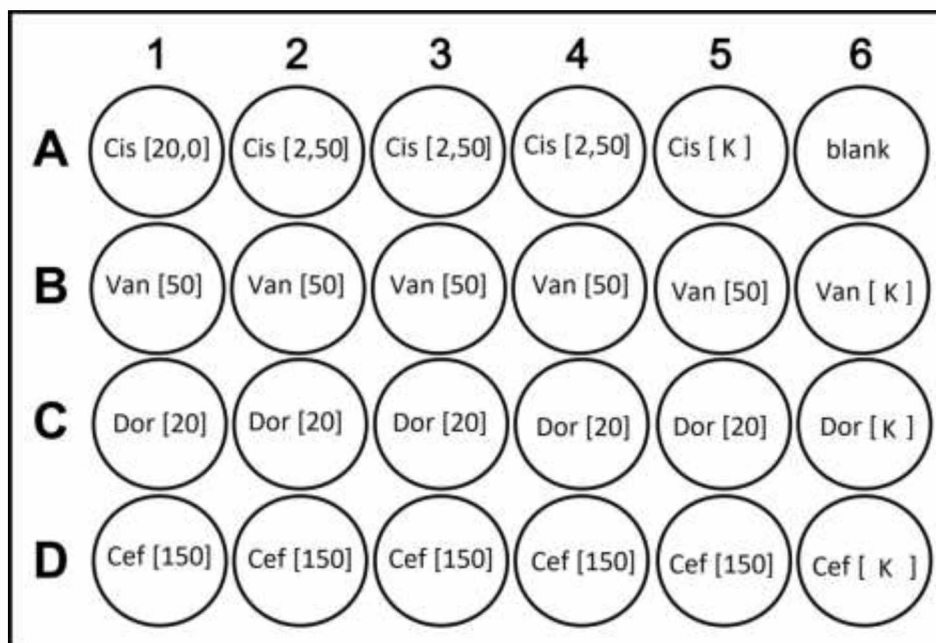


Рисунок Б.3 – Схема эксперимента по транспорту. *Cis* -цисплатин, *Dor* – дорипенем, *Cef* – цефепим; blank – лунка не содержащая клеток; К- отрицательный контроль. В квадратных скобках указаны конечные концентрации препаратов в культуральной среде в мкг/мл

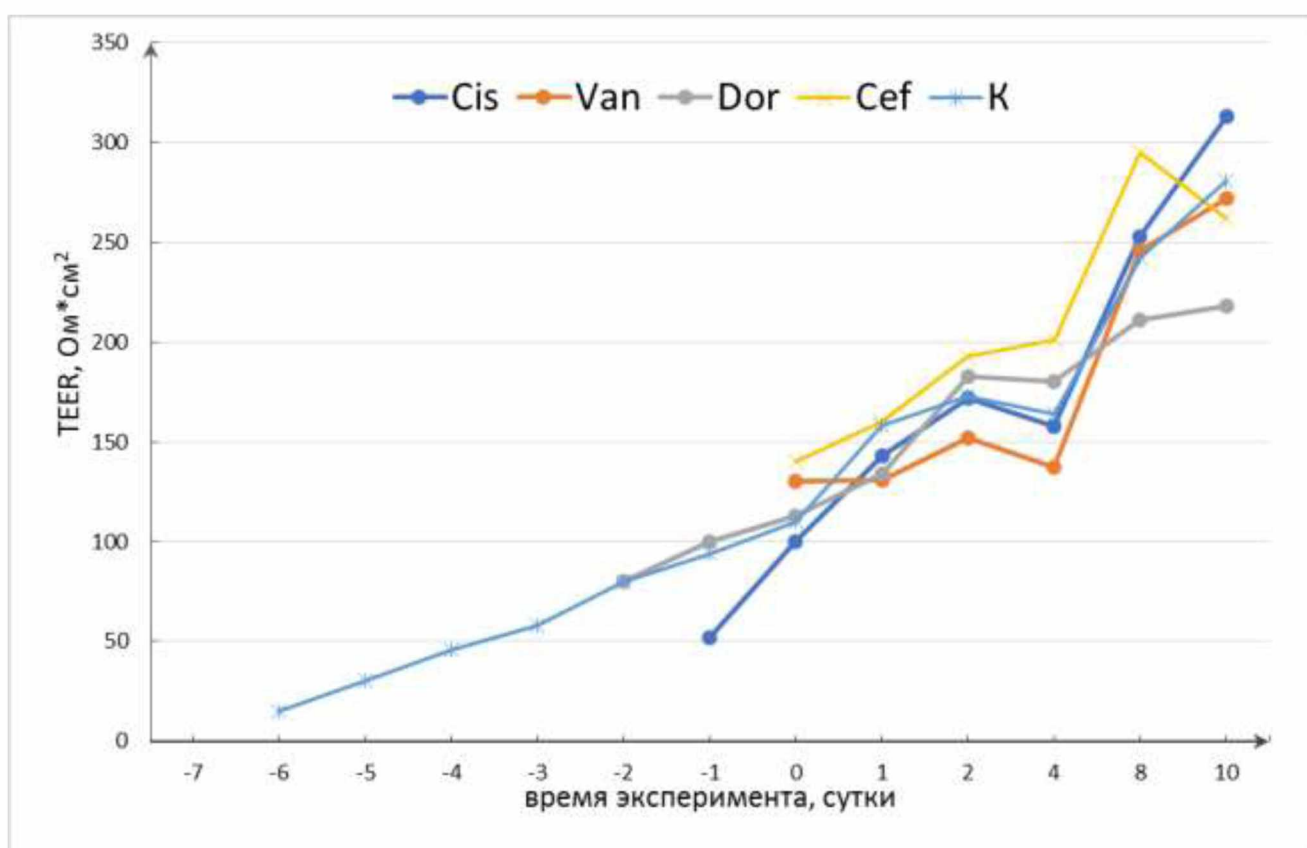


Рисунок Б.4 – Трансэпителиальное сопротивление клеточной линии *RPTEC* при инкубации с: *Cis* -цисплатин, *Dor* – дорипенем, *Cef* – цефепим; blank – лунка не содержащая клеток; К- отрицательный контроль

Как видно на рисунке Б.4, показатель трансэпителиального сопротивления клеточной линии *RPTEC* достигает пороговых значений (280-320 Ом*см²) за 2 недели после посева, вне зависимости от типа планшета. Цисплатин в концентрации 2,5 мкМ не оказывает существенного влияния на *TEER*. Ванкомицин (50 мкг/мл), дорипенем (20 мкг/мл), цефепим (150 мкг/мл) также не оказывают существенного влияния на *TEER* до достижения порогового значения.

Таким образом, результаты измерения значений *TEER* воспроизводимы со значениями, полученными в предыдущем эксперименте, и находятся в диапазоне, соответствующем данной клеточной линии, согласно литературным данным; нефротоксический эффект цисплатина на изучаемом клоне *RPTEC* проявляется при концентрациях, превышающих 5мкМ; ванкомицин хотя и понижает значение *TEER* в монослое *RPTEC*, тем не менее за 6 суток инкубации оно не достигает критических значений, соответствующих токсическому действию; цефепим и дорипенем в соответствующих среднетерапевтическим концентрациях 150 мкг/мл и 50 мкг/мл соответственно, не оказывают токсического влияния.

3.4 Оценка нефротоксичности ЛС по измерению биомаркеров нефротоксичности

Традиционные сывороточные биомаркеры повреждения почек, такие как креатинин или мочевины, являются нечувствительными маркерами острого почечного повреждения (ОПП). Новые биомаркеры играют важную роль в испытаниях лекарственных средств, позволяя более раннее выявление лекарственно-индуцированного поражения почек. Обнаружение почечной токсичности во время доклинических экспериментов позволяет либо изменить состав соединений, либо полный отказ от препаратов, вызывающих высокий уровень нефротоксичности. До сих пор считается, что только 40–60% данных, полученных на животных, позволяют предсказать токсичность для человека, что предполагает наличие возможностей для инноваций и улучшений в обнаружении почечной токсичности во время разработки лекарств [61]. В последние годы было проведено множество доклинических и клинических исследований, направленных на скрининг биомаркеров нефротоксичности. В 2008 и 2010 годах FDA и EMA одобрили использование нескольких биомаркеров, включая общий белок мочи,

молекулу повреждения почек-1 (*KIM-1*), кластерин, β 2-микроглобулин, цистатин С (*CysC*), трифоил-фактор-3 (*TFF-3*), почечный папиллярный антиген-1 и альбумин для прогнозирования острого почечного повреждения в экспериментах на животных [62]. Хотя о нефротоксических биомаркерах сообщалось в ряде доклинических и клинических исследований, они редко используются в высокопроизводительном скрининге *in vitro* на ранних этапах разработки лекарств. В связи с этим большой интерес вызывает оценка различных ксенобиотиков с использованием анализов *in vitro* или методов, альтернативных тестированию на животных [63]. Анализы *in vitro* представляют собой ценный подход для идентификации биомаркеров, поскольку они экономичны, удобны и экологичны. дружественный и позволяет проводить механистические исследования по сравнению с белками сыворотки или плазмы [64].

Материалы и методы

Культивирование клеточной линии проксимальных почечных канальцев человека *RPTEC/TERT* из банка культур клеток ATCC (код: CRL-4031) проводилось как описано выше (раздел 3.1).

Лекарственные препараты

В качестве нефротоксических агентов были выбраны цисплатин (цис- $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, фармакопейный стандартный образец), ванкомицин ($C_{66}H_{75}Cl_{12}N_9O_{24}$, порошок для приготовления раствора для инфузий, ООО «ТрайплФарм», Беларусь, серия №270922, годен до 09.25). Для приготовления стокового раствора ванкомицина использовали деионизированную воду. Из-за плохой растворимости цисплатина в воде, для приготовления его стокового раствора использовали ДМСО (Sigma-Aldrich). Перед использованием оба раствора фильтровали через бактерицидный фильтр «Millex GP» 0,22мкм (Millipore). Препараты добавляли в базальную камеру лунки; при этом конечные концентрации в культуральной среде цисплатина составили: 2,5 и 5мкМ, ванкомицина – 7 и 14 мкМ. Инкубацию клеточной линии *RPTEC/TERT1* с каждым препаратом проводили на 4, 8, 16, 24 и 48 часов. В качестве отрицательного контроля использовали деионизированную воду и ДМСО.

Иммуноферментный анализ

Для оценки чувствительности клеточной линии *RPTEC/TERT1* к нефротоксическому действию цисплатина и ванкомицина измеряли концентрацию специфических почечных биомаркеров: кластерина (*Clu*) и цистатина *C* (*CysC*) методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих наборов: «Human Clusterin ELISA Kit» ((ab174447), Abcam, Великобритания) и «Human Cystatin C ELISA Kit» ((ab119589), Abcam, Великобритания) соответственно. Измерения обоих биомаркеров проводили по протоколам, рекомендованными производителем. Измерения проводились в дублях.

Схема эксперимента представлена на рисунке Б.5.

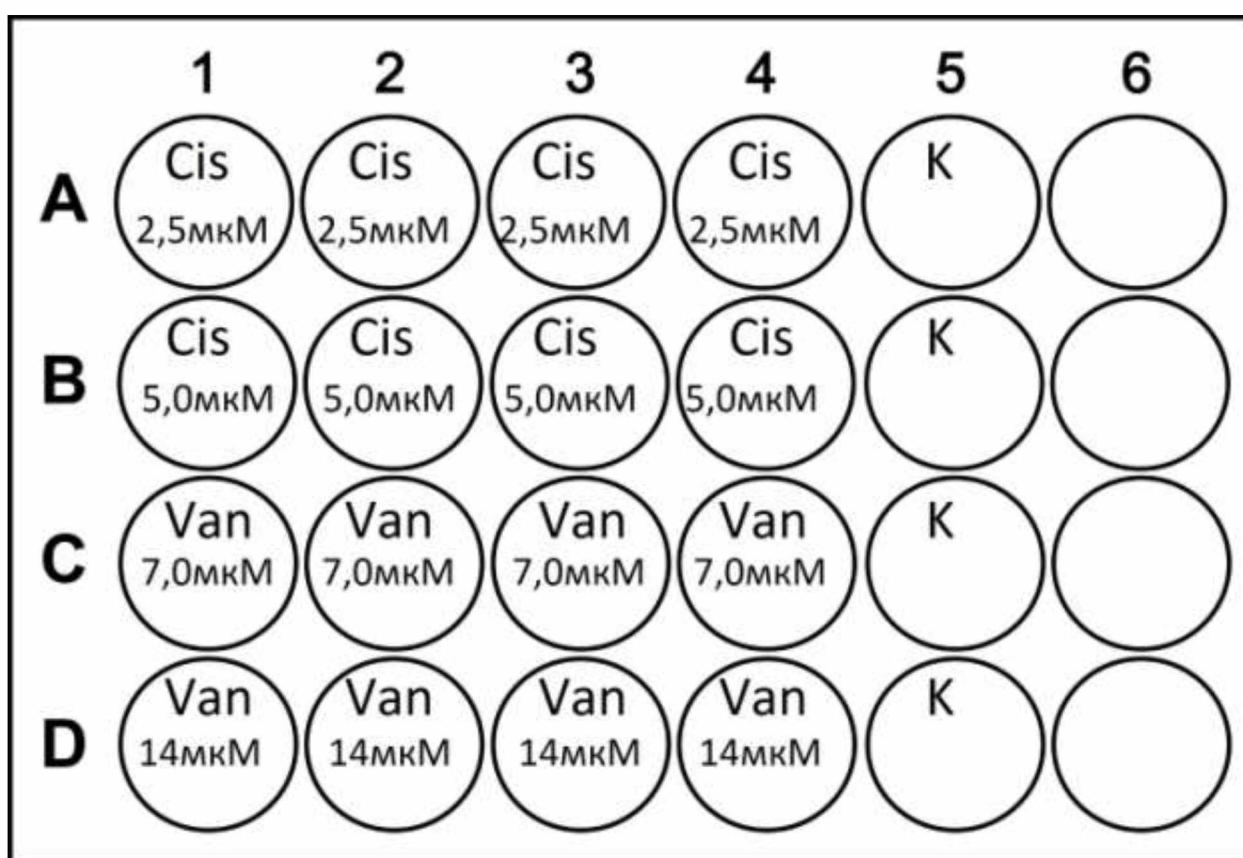


Рисунок Б.5 – Схема эксперимента по транспорту. *Cis* - цисплатин, *Van* - ванкомицин; в квадратных скобках указаны конечные концентрации препаратов в культуральной среде в мкмоль/л

Влияние цисплатина и ванкомицина на концентрацию кластерина в клеточной линии *RPTEC* показано на рисунке Б.6. Инкубация с ванкомицином вызывает повышение концентрации кластерина на 80%-100% по сравнению с контролем через 4 часа после инкубации, однако спустя 8 часов концентрация

кластерина возвращается к норме, что может говорить о его высокой чувствительности. Кластерин является более ранним биомаркером к токсическому действию ванкомицина, чем цистатин С, что может быть следствием разных механизмов активации данных биомаркеров. Влияние цисплатина и ванкомицина на концентрацию цистатина С в клеточной линии *RPTEC* показано на рисунке Б.7. Таким образом, кластерин при инкубации с ванкомицином является ранним маркером нефротоксичности, т.е. специфичным именно для данного ЛП; цистатин С не показал специфичность в зависимости от ЛП; концентрация цисплатина и ванкомицина не оказывает влияние на динамику изменения уровня цистатина С; изученные биомаркеры стабильно и однообразно повышаются на протяжении всего срока инкубации (48ч) цисплатина, что говорит о возможности применения любого из них для оценки нефротоксичности данного ЛП.

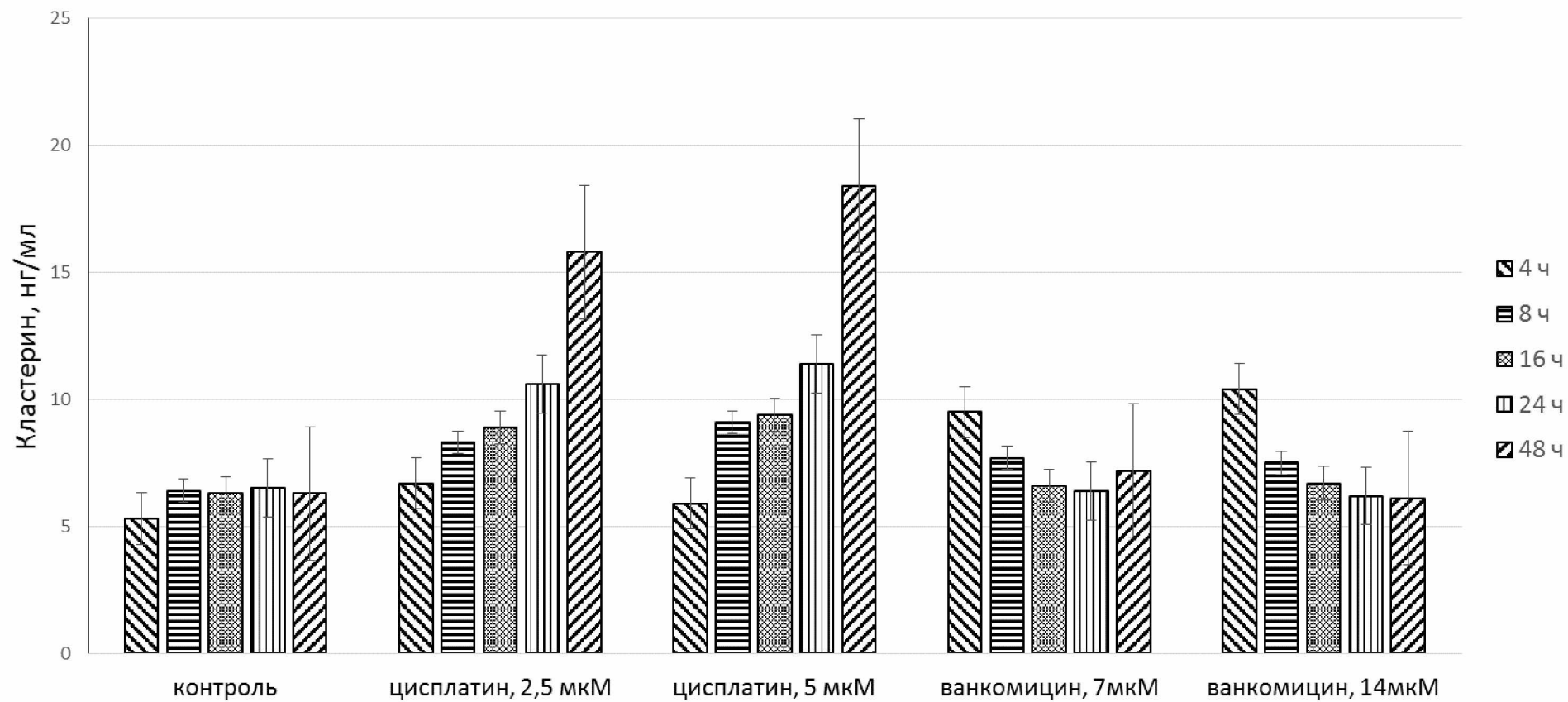


Рисунок Б.6 – Концентрация кластерина в клеточной линии *RPTEC* при инкубации с цисплатином и ванкомицином

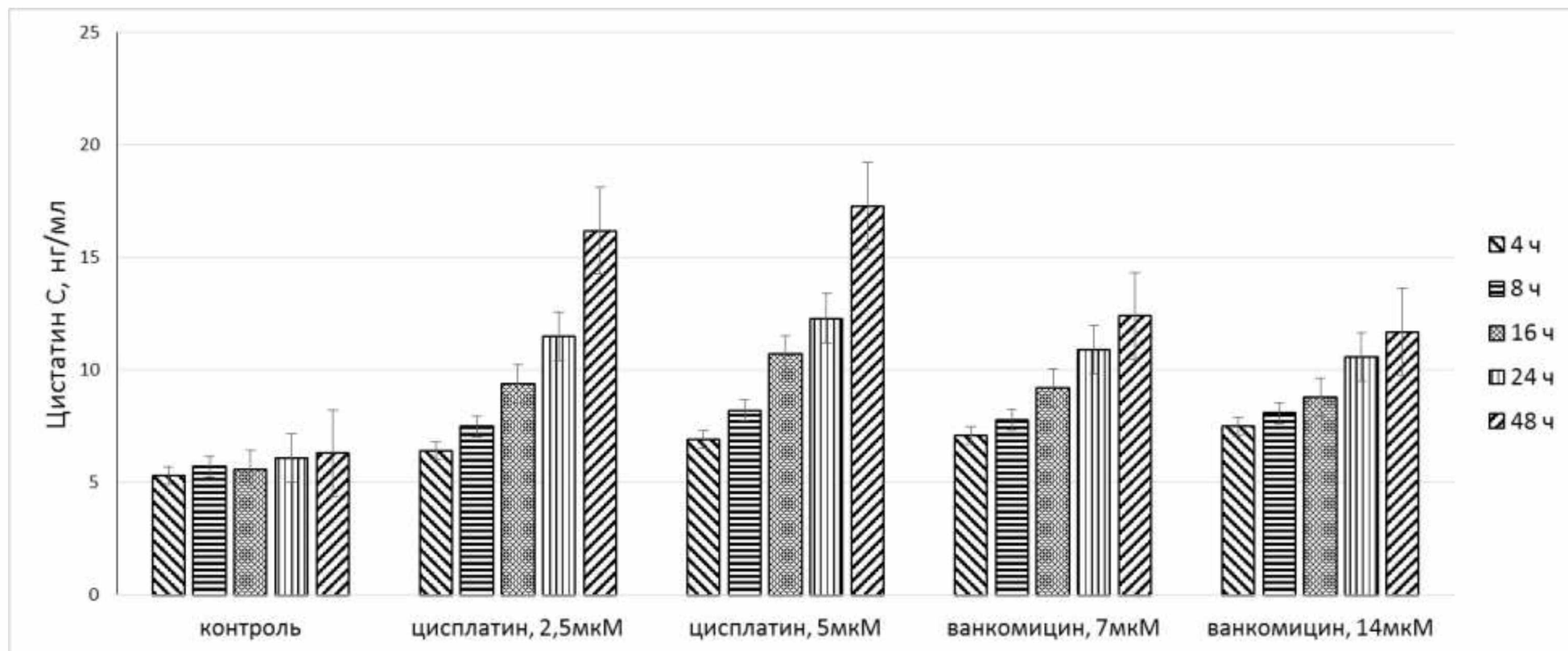


Рисунок Б.7 – Концентрация цистатина С в клеточной линии *RPTEC* при инкубации с цисплатином и ванкомицином

Цисплатин в концентрации 2,5μM, ванкомицин (50μг/мл), дорипенем (20μг/мл), цефепим (150μг/мл) не оказывают токсического действия на клеточную линию *RPTEC* по данным динамики *TEER*. 3. Цистатин С не показал специфичность в зависимости от ЛП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение нефротоксических свойств ЛС на доклиническом этапе не представляется возможным без использования соответствующей экспериментальной модели. До последнего времени результаты, получаемые при изучении нефротоксичности *in vitro*, имели низкий уровень корреляции с клиническими показателями. В связи с этим для большого числа ЛС их нефротоксические свойства обнаруживали только на стадии клинических исследований. Среди двух наиболее используемых типов экспериментальных моделей: лабораторные животные и клеточные линии, последние приобретают все большее значение в связи с более низкой стоимостью исследования, и хорошей воспроизводимостью результатов. Это связано, прежде всего, с различным уровнем экспрессии генов транспортеров и ферментов, участвующих в метаболизме ЛС, в экспериментальной модели клеточной линии по сравнению с таковым *in vivo*. Кроме того, должно наблюдаться морфологическое сходство с клетками эпителия проксимальных почечных канальцев, где происходит собственно транспорт большего числа ЛС. До последнего времени в качестве экспериментальной модели использовались классические лабораторные клеточные линии – *HEK293*, *HK-2*. Однако морфология, а вместе с ней уровень экспрессии и функциональной активности транспортеров ЛС и метаболических ферментов в этих клеточных линиях сильно отличался от их экспрессии в клетках эпителия почечных канальцев, в связи с чем приходилось использовать трансфекцию соответствующих генов. В связи с этим среди исследователей нефротоксичности в качестве экспериментальной модели в последнее время набирает популярность клеточная линия проксимальных почечных канальцев человека – *RPTEC* (*Renalproximaltubuleepithelialcells*). Её морфология наиболее приближена к эпителию проксимальных канальцев, и как показали недавние исследования, экспрессия генов транспортеров в этой клеточной линии находится на более высоком уровне по сравнению с *HEK293*, *CHO*, что подтвердили и наши исследования.

Разработанная нами модель предназначена для тестирования нефротоксичности ЛС *in vitro* как при разработки новых ЛС, так и для экспертизы уже существующих ЛС.

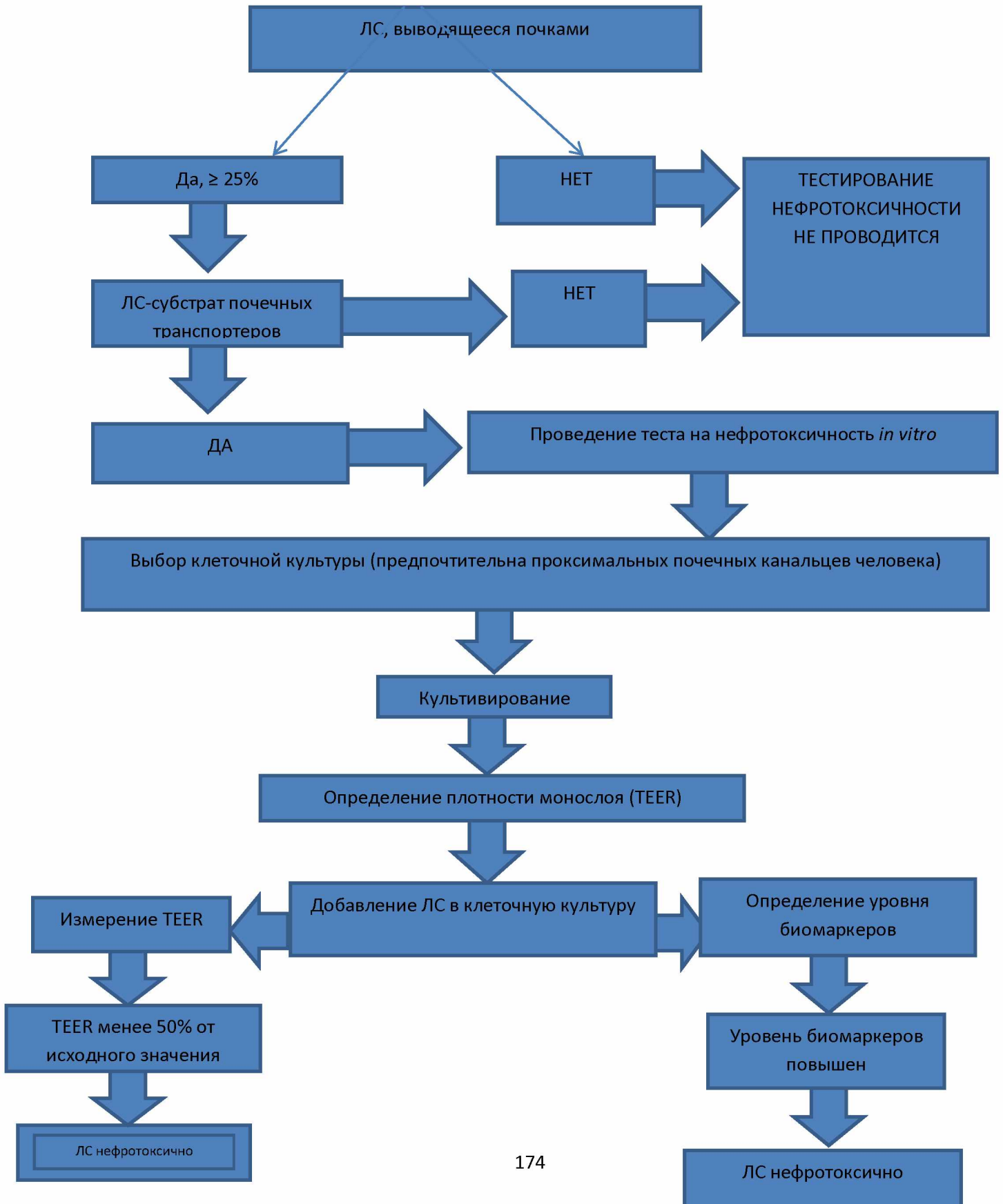
Таким образом, организациям-разработчикам ЛС рекомендовано следующее:

1. Для ЛС, выводящихся почками, рекомендовано проведение тестирования на нефротоксичность *in vitro* (Приложение Б.1).
2. Для проведения теста на нефротоксичность предпочтительно использовать клеточные линии проксимальных почечных канальцев человека.
3. Культивирование клеточной линии для проведения теста на нефротоксичность выполнять по протоколу (раздел 3.1 данных МР).
4. Плотность монослоя (конфлюэнт) культуры считать оптимальным при достижении стабильных, в течение не менее 3 суток, показателей *TEER* в диапазоне от 100 до 600 Ом*см²
5. Тестируемые ЛС в культуру добавлять в концентрациях, соответствующих максимальным концентрациям в плазме крови пациентов, достигаемым при применении ЛС в средне-терапевтических дозировках.
6. Оценку нефротоксичности проводить по измерению *TEER*. Считать проявлением нефротоксичности снижение данного показателя ниже 50% от значений, соответствующих конфлюэнту.
7. В качестве дополнительных критериев нефротоксичности использовать определение биомаркеров нефротоксичности Цистатин С и Кластерин, методиками описанными в Приложениях Б.2, Б.3.

Экспертам при проведении экспертизы безопасности ЛП рекомендовано:

- для ЛП, у которых выведение исходного ЛП почками $\geq 25\%$ от общего клиренса, рекомендовать заявителю провести исследования ЛП *in vitro* на предмет средства к транспортерам органических анионов, используя для этого клеточные линии с повышенной экспрессией транспортеров, например *RPTEC*.

АЛГОРИТМ ОЦЕНКИ НЕФРОТОКСИЧНОСТИ



Методика количественного определения Кластерина

Материал для анализа – адгерентная клеточная культура RPTEC

Протокол.

Все компоненты должны быть комнатной температуры

1. Подготовка реагентов

1.1. Буфер для выделения из клеток однократный. Приготовление: разводят буфер 5X PTR в пять раз. Для приготовления 10мл PTR-буфера необходимо взять 8мл деионизированной H₂O и 2мл 5X PTR – буфера.

1.2. Промывочный буфер (PT): растворяем в деионизированной воде в соотношении 1:10. Приготавливаем 50 мл буфера.

1.3. Антитела к кластерину: растворяют в соотношении 1:10 в растворителе 4BR.

1.4. Стандарт кластерина: растворяют путем прибавления 1мл буфера для разведения образцов (1X PTR-буфер). Не пипетировать! Дать постоять 10-15 ми до полного растворения. При этом получается раствор кластерина с концентрацией 100 000пг/мл. Далее проводим серию разведений стандарта: для этого приготавливаем 8 пробирок и нумеруем их 1, 2,...8. В первую добавляем 255мкл 1X PTR-буфера, а в остальные по 150мкл 1X PTR-буфера. Из стокового раствора кластерина добавляем 45мкл в пробирку 1, в результате получаем 300мкл раствора с концентрацией 15000пк/мл. Далее из пробирки один отбираем 150мкл раствора в пробирку 2, затем из пробирки 2 отбираем 150мкл раствора в пробирку 3 и так далее до пробирки 7, в пробирке 8 остается чистый буфер. Концентрации кластерина указаны в таблице 1.

1.5.

Таблица Б2.1 – Концентрации стандартного раствора кластерина для проведения количественного определения кластерина

N	1	2	3	4	5	6	7	8
Концентрация кластерина, пк/мл	15000	7500	3750	1875	937,5	468,8	234,4	0

1.6. Приготовление исследуемых образцов (адгерентные клетки).

- 1.6.1. Удалить культуральную среду и промыть клетки 2 раза раствором фосфатного буфера.
 - 1.6.2. Лизировать клетки добавляя охлажденный 1X PTR-буфер прямо в культуральный флакон из расчета 750-1500мл на чашку диаметром 15см.
 - 1.6.3. Соскоблить раствор лизатов клеток в центрифужную пробирку и оставить её на льду в течение 15 мин.
 - 1.6.4. Центрифугировать при 18000g и 4°C в течение 20 минут.
 - 1.6.5. Перенести супернатант в чистую пробирку, а осадок удалить.
2. Процедура анализа:
- 2.1. Взять необходимое количество стрипов для анализа
 - 2.2. Добавить по 50мкл стандартов и образцов нужные лунки
 - 2.3. Добавить по 50мкл раствора антител в каждую лунку
 - 2.4. Запечатать планшет пленкой и инкубировать 60мин при комнатной температуре в шейкере при 400 об/мин
 - 2.5. Промыть каждую лунку 3 раза по 350мкл промывочного буфера, промывание осуществляют путем аспирации или декантации. На каждой стадии промывки буфер находился в лунках не менее 30 сек, после последней промывки удалять остатки буфера постукиванием по чистой фильтровальной бумаге для удаления остатков буфера.
 - 2.6. В каждую лунку добавить 100мкл проявляющего раствора (ТМВ) и инкубировать 10мин в шейкере при 400об/мин в темноте.
 - 2.7. В каждую лунку добавить 100мкл стоп-раствора и встряхивать на шейкере 1мин
 - 2.8. Поместить планшет в ридер «Biotek» и проводить измерение оптической плотности при длине волны 450 нм в режиме считывания endpoint.
- Нормальные значения Кластерина в клеточном лизате: 1:12 супернатант клеточной линии (HepG2) - 4,324пг/мл.

Методика количественного определения Цистатин С

Материал для анализа – адгерентная клеточная культура RPTEC

Протокол.

Все компоненты должны быть комнатной температуры

1. Подготовка реагентов

- 1.1. Буфер для выделения из клеток однократный. Приготовление: разводят буфер 5X PTR в пять раз. Для приготовления 10мл PTR-буфера необходимо взять 8мл деионизированной H₂O и 2мл 5X PTR – буфера.
- 1.2. Промывочный буфер (PT): растворяем в деионизированной воде в соотношении 1:10. Приготавливаем 50 мл буфера.
- 1.3. Антитела к цистатину С: растворяют в соотношении 1:10 в растворителе 4BR.
- 1.4. Стандарт цистатина С: растворяют путем прибавления 1мл буфера для разведения образцов (1X PTR-буфер). Не пипетировать! Дать постоять 10-15 ми до полного растворения. При этом получается раствор цистатина С с концентрацией 100 000пг/мл. Далее проводим серию разведений стандарта: для этого приготавливаем 8 пробирок и нумеруем их 1, 2,...8. В первую добавить 255мкл 1X PTR-буфера, а в остальные по 150мкл 1X PTR-буфера. Из стокового раствора цистатина С добавить 45мкл в пробирку 1, в результате получаем 300мкл раствора с концентрацией 15000пк/мл. Далее из пробирки один отбираем 150мкл раствора в пробирку 2, затем из пробирки 2 отбираем 150мкл раствора в пробирку 3 и так далее до пробирки 7, в пробирке 8 остается чистый буфер. Концентрации цистатина С указаны в таблице1.

Таблица Б.3.1– Концентрации стандартного раствора цистатина С для проведения количественного определения цистатина С

N	1	2	3	4	5	6	7	8
Концентрация цистатина С, пк/мл	15000	7500	3750	1875	937,5	468,8	234,4	0

1.5. Приготовление исследуемых образцов (адгерентные клетки).

1.5.1. Удалить культуральную среду и промыть клетки 2 раза раствором фосфатного буфера.

1.5.2. Лизировать клетки добавляя охлажденный 1X PTR-буфер прямо в культуральный флакон из расчета 750-1500мл на чашку диаметром 15см.

1.5.3. Соскоблить раствор лизатов клеток в центрифужную пробирку и оставить её на льду в течение 15 мин.

1.5.4. Центрифугировать при 18000g и 4°C в течение 20 мин.

1.5.5. Перенести супернатант в чистую пробирку, а осадок удалить.

2. Протокол анализа

2.1 Отобрать необходимое количество стрипов для анализа.

2.2 Добавить в лунки по 100 мкл стандартных образцов и исследуемых образцов.

2.3 Запечатать лунки пленкой и инкубировать 90мин при 37°C.

2.4 Убрать пленку, удалить содержимое из лунок, затем в каждую лунку добавить по 100мкл раствора антител к цистатину С, запечатать новой пленкой и инкубировать 60мин при 37°C.

2.5 Удалить пленку и промыть три раза по 300мкл dPBS-буфером, каждый раз оставлять буфер в лунке не менее 1 минуты, удалять остатки буфера после каждого этапа промывки постукиванием о фильтровальную бумагу.

2.6 Добавить в каждую лунку по 100 мкл авидин-биотин-пероксидазного комплекса, запечатывать новой пленкой и инкубировать 30мин при 37°C.

2.7 Промывать лунки dPBS-буфером 5 раз по 300мкл, после промывки остатки буфера удалять постукиванием по фильтровальной бумаге.

1.5 Добавлять в каждую лунку по 90мкл ТМВ-буфера и инкубировать 15-20мин при 37°C. Должно быть видно на глаз посинение раствора в лунках стандартных растворов.

1.6 Добавлять в каждую лунку по 100мкл стоп-раствора. Цвет сразу же должен меняться на желтый.

Измерять оптическую плотность на спектрофотометрическом ридере «Biotek» при длине волны 450 нм спустя 20-30мин после добавления стоп-раствора.

Нормальные значения Цистатина С в клеточном лизате: 20-50 нг/мг общего белка.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Paueksakon P, Fogo AB. Drug-induced nephropathies // *Histopathology*. 2017; 70:94–108.
2. Rewa O, Bagshaw SM. Acute kidney injury — epidemiology, outcomes and economics // *Nat Rev Nephrol*. - 2014; 10:193–207.
3. Tiong HY, et al. Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical in vitro models // *Mol Pharm*. - 2014; 11:1933–1948.
4. Yin j, Wang j. Renal drug transporters and their significance in drug-drug interactions // *Acta Pharm Sin B*. - 2016; 6: 363-373.
5. Nieskens TTG, et al. A human renal proximal tubule cell line with stable organic anion transporter 1 and 3 expression predictive for antiviral-induced toxicity // *AAPS J*. - 2016; 18:465–475.
6. Wang L, Sweet DH. Renal organic anion transporters (SLC22 family): expression, regulation, roles in toxicity, and impact on injury and disease // *AAPS J*. - 2013; 15: 53-69.
7. Motohashi H, Inui K. Multidrug and toxin extrusion family SLC47: Physiological, pharmacokinetic and toxicokinetic importance of MATE1 and MATE2-K // *Mol Aspects Med*. - 2013; 34:661–668.
8. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM292362.pdf>
9. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/includes/document/document_detail.jsp?webContentId=WC500090112&murl=menus/document_library/document_library.jsp&mid=WC0b01ac058009a3dc&jsenabled=true
10. Volk C. OCTs, OATs, and OCTNs: structure and function of the polyspecific organic ion transporters of the SLC22family // *WIREs Membr Transp Signal* 2014; 3: 1-13.
11. Xiao, Z.; Shan, J.; Li, C.; Luo, L.; Lu, J.; Li, S.; Long, D.; Li, Y. Mechanisms of cyclosporine-induced renal cell apoptosis: a systematic review // *Am. J. Nephrol*. - 2013, 37 (1), 30–40.

12. Fisel P, Renner O, Nies AT, Schwab M, Schaeffeler E. Solute carrier transporter and drug-related nephrotoxicity: the impact of proximal tubule cell models for preclinical research // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* - 2014; 10:395–408.
13. Huang JX, et al. Evaluation of biomarkers for in vitro prediction of drug-induced nephrotoxicity: comparison of HK-2, immortalized human proximal tubule epithelial, and primary cultures of human proximal tubular cells // *Pharmacol Res Perspect.* - 2015; 3:e00148.
14. The International Transporter Consortium: Summarizing advances in the role of transporters in drug development // K. M. Giacomini¹, A. Galetin, S. M. Huang//*Clin Pharmacol Ther.* 2018 Nov. Vol. 104. No5. P. 766-771.
15. EMA/2012. Guideline on The Investigation of Drug Interactions. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC50012960_6.pdf.
16. FDA-2017-D-5961 Jan 2020. In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. URL: <https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugs>
17. FDA-2017-D-5961 Clinical Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. Jan 2020. URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/clinical-drug-interaction-studies-cytochrome-p450-enzyme-and-transporter-mediated-drug-interactions>
18. Lin Z., Will Y. Evaluation of drugs with specific organ toxicities in organ-specific cell lines // *Toxicol Sci.* 2012. Vol. 126. No 1. P. 114-127.
19. Guideline on the investigation of drug interactions CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions-revision-1_en.pdf
20. Li Q., Guo D., Dong Z. et al. Ondansetron can enhance cisplatin-induced nephrotoxicity via inhibition of multiple toxin and extrusion proteins (MATEs) // *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013. Vol. 273. No. 1. P. 100-9.
21. Adefovir accumulation and nephrotoxicity in renal interstitium: Role of organic anion transporters of kidney // *Life Sci.* 2019. Vol. 224. P. 41–50.

22. Bajaj P., Chowdhury S.K., Yucha R. et al. Emerging Kidney Models to Investigate Metabolism, Transport, and Toxicity of Drugs and Xenobiotics // *Drug Metab Dispos.* 2018. Vol. 46. No 11. P. 1692-1702.
23. Bajaj P., Chowdhury S.K., Yucha R. et al. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane // *Kidney Int.* 2008. Vol. 73. No 2. P. 220-225.
24. Motohashi H., Inui K. Multidrug and toxin extrusion family SLC47: physiological, pharmacokinetic and toxicokinetic importance of MATE1 and MATE2-K // *Mol Aspects Med.* 2013. Vol. 34. No 2-3. P. 661-668.
25. Narayanan K., Schumacher K.M., Tasnim F. et al. Human embryonic stem cells differentiate into functional renal proximal tubular-like cells // *Kidney Int.* 2013. Vol. 83. No 4. P. 593-603.
26. Birdsall H.H., Hammond T.G. Role of Shear Stress on Renal Proximal Tubular Cells for Nephrotoxicity Assays // *J Toxicol.* Vol. 2021. Article ID 6643324. 6 p. URL:<https://www.hindawi.com/journals/jt/2021/6643324/>
27. Secker P.F., Luks L., Schlichenmaier N. et al. RPTEC/TERT1 cells form highly differentiated tubules when cultured in a 3D matrix // *ALTEX.* - 2018. Vol. 35. No 2. P. 223-234.
28. Jansen J., Fedecostante M., Wilmer M.J. et al. Bioengineered kidney tubules efficiently excrete uremic toxins // *Sci Rep.* - 2016. Vol. 6. 26715. URL: <https://www.nature.com/articles/srep26715#citeas>.
29. Weber E.J., Chapron A., Chapron B.D. et al. Development of a microphysiological model of human kidney proximal tubule function // *Kidney Int.* - 2016. - Vol. 90. No 3. P. 627-637.
30. King S.M., Higgins J.W., Nino C.R. et al. 3D Proximal Tubule Tissues Recapitulate Key Aspects of Renal Physiology to Enable Nephrotoxicity Testing // *Front Physiol.* - 2017.- Vol. 8. P. 123.
31. Shaw G., Morse S., Ararat M. et al. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells // *FASEB J.* - 2002. Vol. 16. No 8. P. 869-871.

32. Ryan M. J., Johnson G., Kirk J. et al. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney // *Kidney Int.* - 1994. Vol. 45. No 1. P. 48–57.
33. Jenkinson S. E., Chung G. W., van Loon E. et al. The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule // *Pfluegers Arch.* - 2012. Vol. 464. No 6. P. 601–611.
34. Wu Y., Connors D., Barber L. et al. Multiplexed assay panel of cytotoxicity in HK-2 cells for detection of renal proximal tubule injury potential of compounds // *Toxicol. In Vitro.* - 2009. Vol. 23. No 6. P. 1170–1178.
35. Li Y., Oo Z.Y., Chang S. Y. et al. An in vitro method for the prediction of renal proximal tubular toxicity in humans // *Toxicology Research.* - 2013. Vol. 2. No 5. P. 352–365.
36. Lash L. H., Putt D. A., Cai H. Drug metabolism enzyme expression and activity in primary cultures of human proximal tubular cells // *Toxicology.* - 2008. - Vol. 244. No 1. P. 56–65.
37. Li Y., Kandasamy K., Chuah J.K. et al. Identification of nephrotoxic compounds with embryonic stem-cell-derived human renal proximal tubular-like cells // *Mol Pharm.* - 2014. Vol. 11. No 7. P. 1982-1990.
38. Wieser M., Stadler G., Jennings P. et al. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics // *Am J Physiol Renal Physiol.* - 2008. Vol. 295. No 5. P. 1365-1375.
39. Wilmer M.J., Saleem M.A., Masereeuw R. et al. Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters // *Cell Tissue Res.* - 2010. Vol. 339. No 2. P. 449-457.
40. Nieskens T.T., Peters J.G., Schreurs M.J. et al. A Human Renal Proximal Tubule Cell Line with Stable Organic Anion Transporter 1 and 3 Expression Predictive for Antiviral-Induced Toxicity // *AAPS J.* - 2016. Vol. 18. No 2. P. 465-475.
41. Li S., Zhao J., Huang R. et al. Development and Application of Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells for Assessment of Compound Toxicity // *Current Chemical Genomics and Translational Medicine.* - 2017. Vol. 11. P. 19-30.
42. Stoddart M.J. Cell viability assays: introduction // *Methods Mol Biol.* - 2011. Vol. 740. P. 1-6.

43. Camaño S., Lazaro A., Moreno-Gordaliza E. et al. Cilastatin attenuates cisplatin-induced proximal tubular cell damage // *J Pharmacol Exp Ther.* - 2010. Vol. 334. P. 419-429.
44. Chen S., Einspanier R., Schoen J. Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports // *Histochem Cell Biol.* - 2015. Vol. 144. No 5. P. 509–515.
45. Ke N., Wang X., Xu X. et al. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability // *Methods Mol Biol.* - 2011. Vol. 740. P. 33-43.
46. Attene-Ramos M.S., Huang R., Michael S. et al. Profiling of the Tox21 chemical collection for mitochondrial function to identify compounds that acutely decrease mitochondrial membrane potential // *Environ Health Perspect.* - 2015. Vol. 123. No 1. P. 49-56.
47. Sakamuru S., Attene-Ramos M.S., Xia M. Mitochondrial Membrane Potential Assay // *Methods Mol Biol.* - 2016. Vol. 1473. P. 17-22.
48. Limonciel A., Aschauer L., Wilmes A. et al. Lactate is an ideal non-invasive marker for evaluating temporal alterations in cell stress and toxicity in repeat dose testing regimes // *Toxicol In Vitro.* - 2011. Vol. 25. No 8. P. 1855-1862.
49. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents // *Nat Rev Mol Cell Biol.* - 2020. Vol. 21. No 7. P. 363-383.
50. Aschauer L., Limonciel A., Wilmes A. et al. Application of RPTEC/TERT1 cells for investigation of repeat dose nephrotoxicity: a transcriptomic study // *Toxicol In Vitro.* - 2015. Vol. 30. No 1 Pt A. p. 106–116.
51. Dieterle F., Sistare F., Goodsaid F. et al. Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMEA and Predictive Safety Testing Consortium // *Nat Biotechnol.* - 2010. Vol. 28. No 5. P. 455–462.
52. Qiu X., Miao Y., Geng X. et al. Evaluation of biomarkers for in vitro prediction of drug-induced nephrotoxicity in RPTEC/TERT1 cells // *Toxicol Res.* - 2020. Vol. 9. No 2. P. 91-100.
53. Wieser M, Stadler G, Jennings P, Streubel B, Pfaller W, Ambros P, Riedl C, Katinger H, Grillari J, Grillari-Voglauer R. hTERT alone immortalizes epithelial cells

of renal proximal tubules without changing their functional characteristics // *Am J Physiol Renal Physiol.* - 2008 Nov;295(5):F1365-75. doi: 10.1152/ajprenal.90405.2008.

54. Soo JY, Jansen J, Masereeuw R, Little MH. Advances in predictive in vitro models of drug-induced nephrotoxicity // *Nat Rev Nephrol.* - 2018 Jun;14(6):378-393. doi: 10.1038/s41581-018-0003-9.

55. Ghaffarian, R., Muro, S. Models and Methods to Evaluate Transport of Drug Delivery Systems Across Cellular Barriers // *J Vis Exp.* - 2013 Oct 17;(80):e50638. doi: 10.3791/50638.

56. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems // *J Lab Autom.* - 2015. 20(2):107–126.

57. Wilmer M, Chee N, Henriëtte L, Paul V, Laura S, Masereeuw R. Kidney-on-a-Chip Technology for Drug-Induced Nephrotoxicity Screening // *Trends in Biotechnology* Volume 34, Issue 2, February 2016, Pages 156-170.

58. Tiong HY, Huang P, Sijing X, Yao Li, et al. Drug-Induced Nephrotoxicity: Clinical Impact and Preclinical in Vitro Models // *Mol Pharm.* 2014 Jul 7;11(7):1933-48. doi: 10.1021/mp400720w.

59. Mac, K., Chavada, R., Paull, S. et al. Cefepime induced acute interstitial nephritis – a case report // *BMC Nephrol* 16, 15 (2015).

60. Chavers S, Magee G, Baumer D, Pai H. Use of doripenem and risk of seizure and renal impairment in US hospitalized patients: a retrospective cohort study // *Ther Adv Drug Saf.* - 2016 Apr;7(2):43-57.

61. Rached E, Hoffmann D, Blumbach K et al. Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to ochratoxin a in vivo and in vitro // *Toxicol Sci.* - 2008;103: 371–81.

62. Huang HF, Zhou JY, Chen JH. Biomarkers for early diagnosis of acute kidney injury: current progress and clinical prospects // *Curr Protein Pept Sci.* - 2017;18:1205–10.

63. Faria J, Ahmed S, Gerritsen K et al. Kidney-based in vitro models for drug-induced toxicity testing // *Arch Toxicol.* - 2019;93:3397–418

64. Soo JY, Jansen J, Masereeuw R et al. Advances in predictive in vitro models of drug-induced nephrotoxicity // *Nat Rev Nephrol.* - 2018;14:378–93.