



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

ОТЧЕТ

по этапу № 2 «Теоретические и экспериментальные исследования по разработке методических подходов к измерению функциональной активности транспортеров органических анионов с использованием метода ЯМР-спектроскопии» НИР «Разработка научно-методических подходов к оценке безопасности лекарственных средств на основе создания экспериментальной модели нефротоксичности»

**Прокофьев А.Б., начальник НОКФ.
27.12.2022**

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации



Цель. Теоретические и экспериментальные исследования по разработке методических подходов к измерению функциональной активности транспортеров органических анионов с использованием метода ЯМР-спектроскопии

Задачи.

1. Сравнительная характеристика и обоснование выбора клеточной линии, используемой в экспериментальных моделях по изучению нефротоксичности лекарственных препаратов.
2. Выбор и отработка методики оценки функциональной активности почечных транспортеров лекарственных средств.



Рекомендации FDA* (2020) по исследованию транспортеров *in vitro* при разработке новых ЛС

«Если данные фармакокинетики исследуемого ЛС указывают, что почечная секреция ЛС значительна (т.е. активное выведение исходного ЛС почками $\geq 25\%$ от общего клиренса), заявитель должен провести исследования ЛС *in vitro* на предмет, является ли оно субстратом OAT1/3, OCT2 и MATE1 и MATE2-K».

«Заявитель должен провести исследование *in vitro* для оценки, является ли исследуемое ЛС ингибитором транспортеров P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OCT2, MATEs (MATE-1, MATE-2K), OAT1 и OAT3»

«Заявитель должен провести исследования по определению ингибирующей мощности (т.е. IC₅₀ или K_i) исследуемого ЛС на захвате известного субстрата почечными транспортерами (OAT1, OAT3, OCT2, MATE1 и MATE2K) на клетках с избыточной экспрессией этих транспортеров».

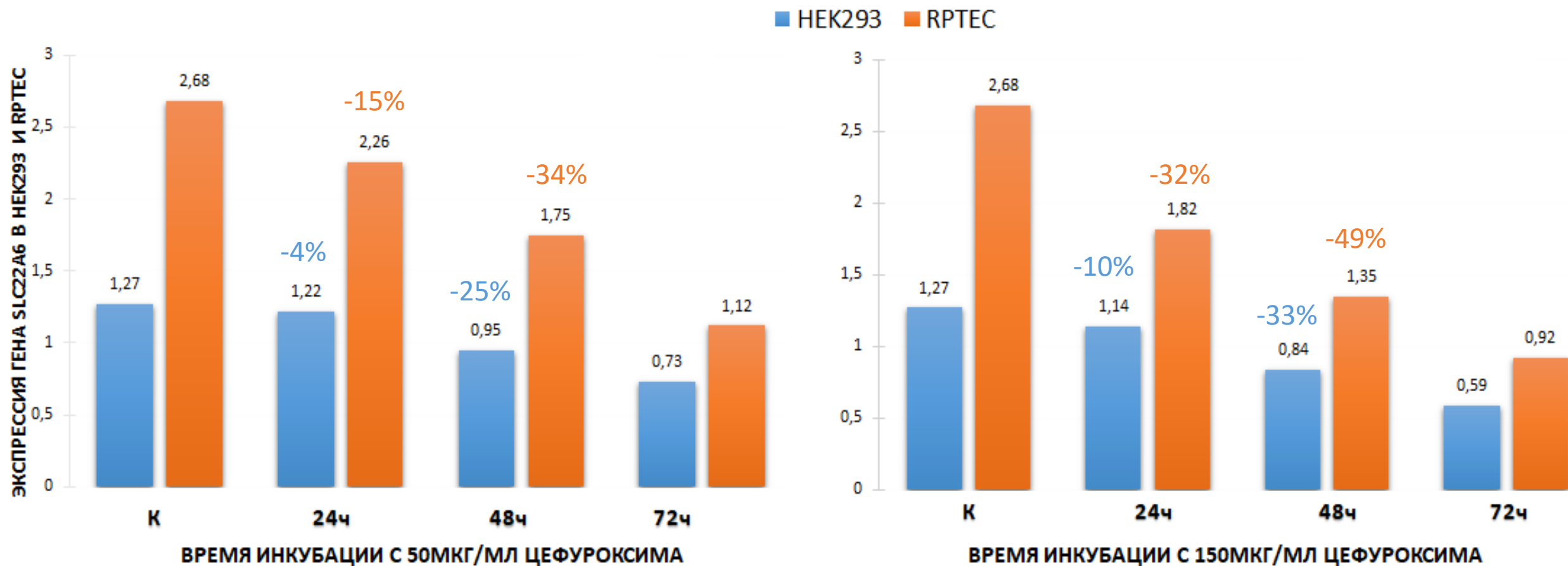
*<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>



Проводили сравнительный анализ влияния цефалоспоринов-субстратов ОАТ на уровень экспрессии транспортеров ОАТ и токсические эффекты на модели клеточных линии RPTES и HEK293

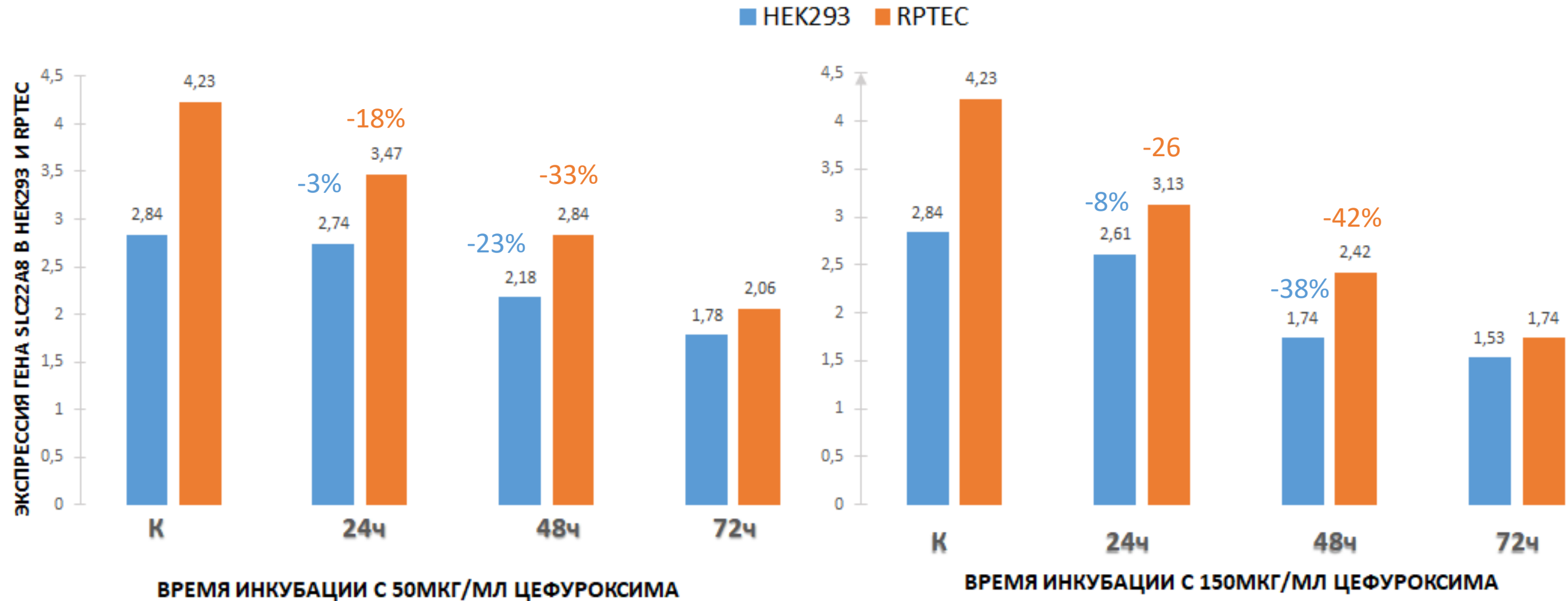


Экспрессия **OAT₁** в HEK293 и RPTEC при инкубации с цефуроксимом



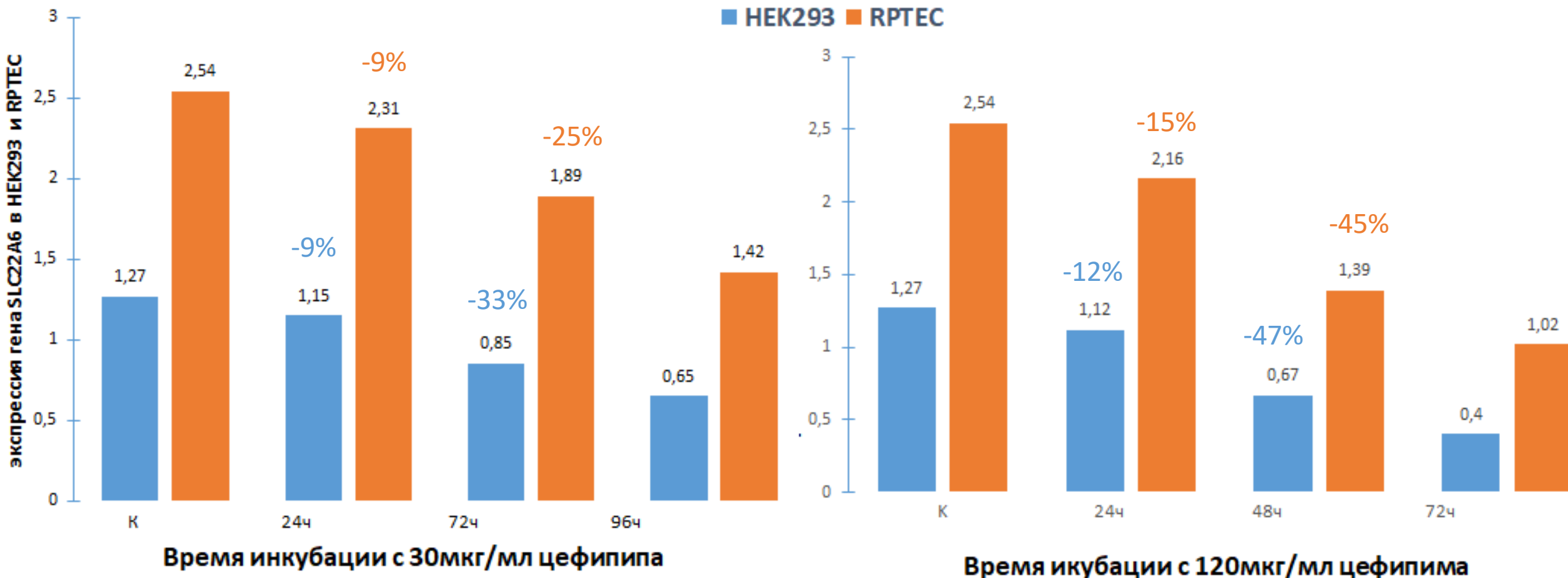


Экспрессия гена **OAT3** в HEK293 и RPTEC при инкубации с цефуроксимом



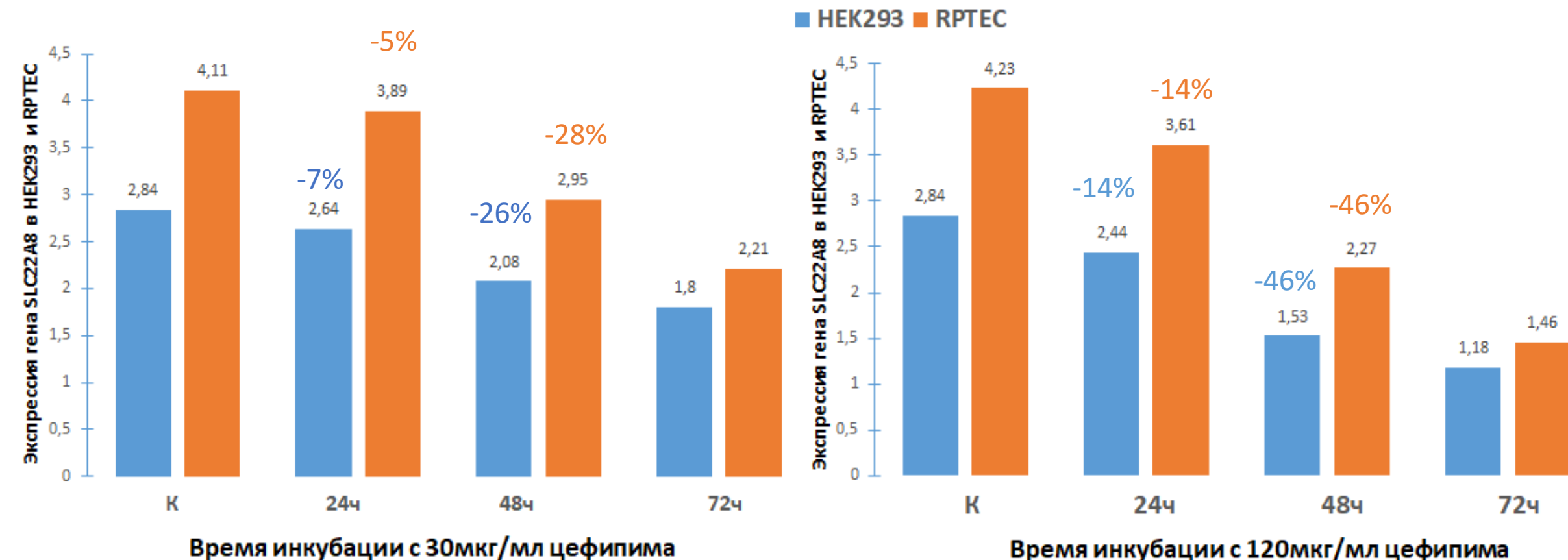


Экспрессия **OAT1** в HEK293 и RPTEC при инкубации с цефипимом





Экспрессия **OAT3** в HEK293 и RPTEC при инкубации с цефепимом





Влияние концентраций и времени воздействия цефуроксима цефепима на активность каспаз 3/7 в клеточной линиях HEK293 и RPTEC

Концентрация цефуроксима		50мкг/мл			150мкг/мл		
		24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
Активность каспаз 3/7	HEK293	-	-	-	+	+	+
	RPTEC	-	-	+	+	+	+

Концентрация цефепима		30мкг/мл			120мкг/мл		
		24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
Активность каспаз 3/7	HEK293	-	-	-	-	+	н.д.
	RPTEC			+	+	+	+



Определяли кинетические параметры транспортеров органических анионов на модели клеточной линии RPTES на основе транспорта ЛС-субстратов



Кинетические параметры транспорта

1. Клиренс субстрата:

$$CL_s = \frac{C_{t_2} - C_{t_1}}{(t_2 - t_1) \cdot C_m}$$

C_{t_1, t_2} – концентрации субстрата при времени t_1 и t_2 , C_m – нормализующий параметр транспорта (количество клеток, общий белок или площадь мембраны)

2. Коэффициент проницаемости:

$$P = \frac{Vr}{C_0 \cdot S} \cdot \frac{dc}{dt}$$

Vr – объем апикальной области, cm^3 ; C_0 – начальная концентрация ЛС, mM ; S – площадь поверхности мембраны, cm^2 ; dC/dt – изменение концентрации ЛС за время t .

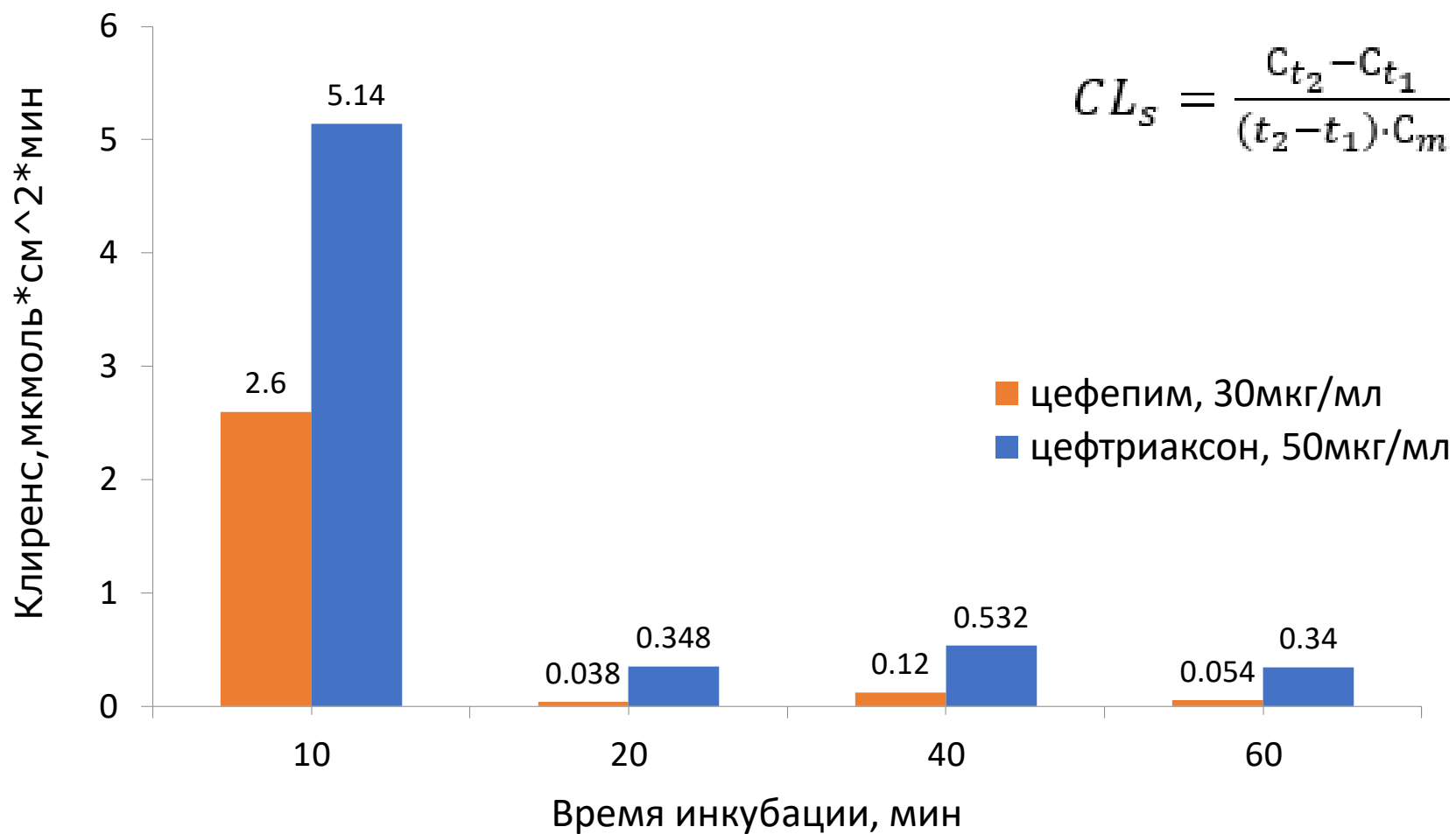


ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

	1	2	3	4
А	ЦЕФЕПИМ 30МКГ/МЛ 10мин	ЦЕФЕПИМ 30МКГ/МЛ 20мин	ЦЕФЕПИМ 30МКГ/МЛ 40мин	ЦЕФЕПИМ 30МКГ/МЛ 60мин
В	ЦЕФТРИАКСОН 50МКГ/МЛ 10мин	ЦЕФТРИАКСОН 50МКГ/МЛ 20мин	ЦЕФТРИАКСОН 50МКГ/МЛ 40мин	ЦЕФТРИАКСОН 50МКГ/МЛ 60мин
С				

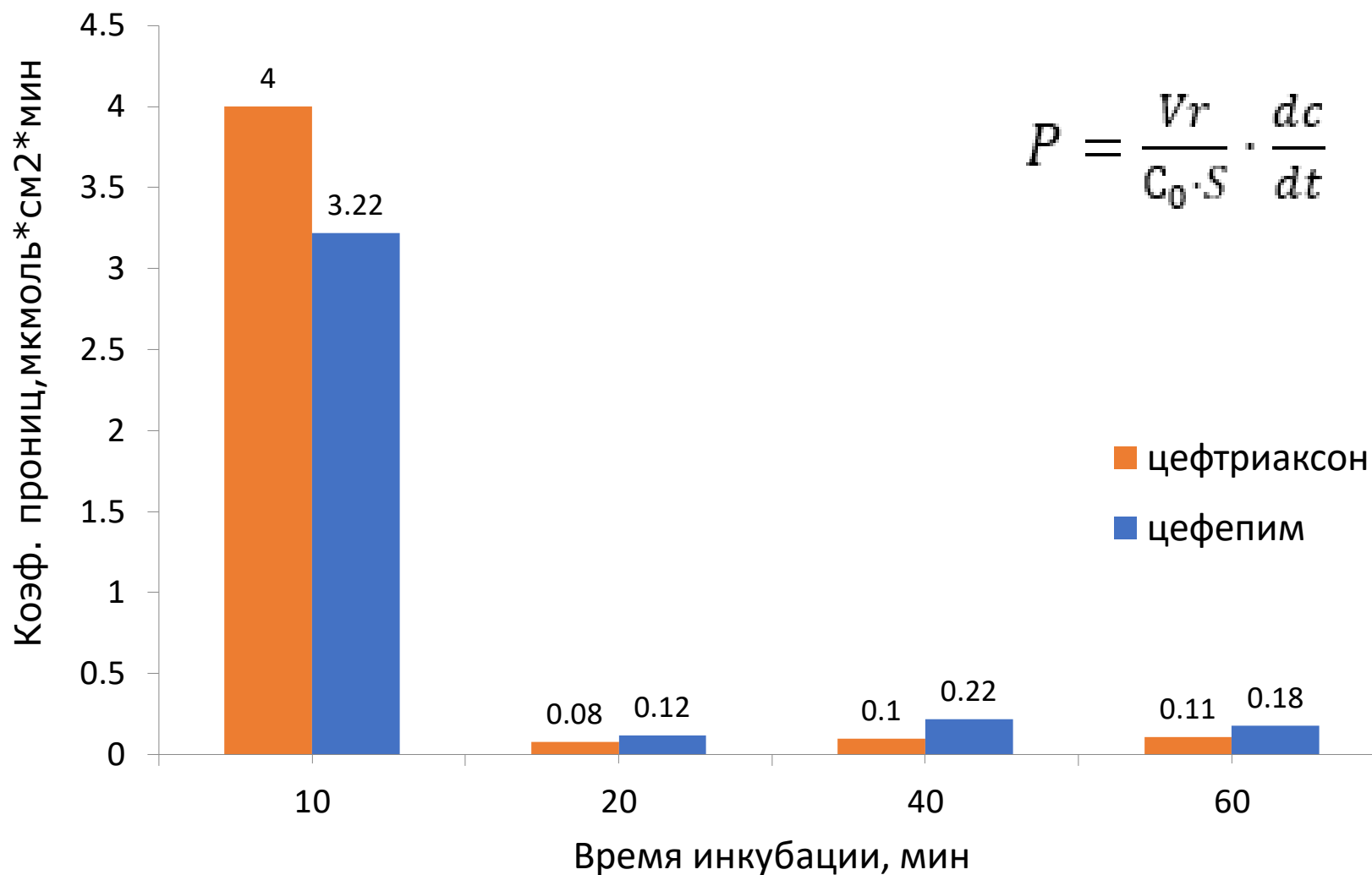


Транспорт цефалоспоринов в клеточной линии RPTEC





Коэффициент проницаемости мембраны РРТЕС



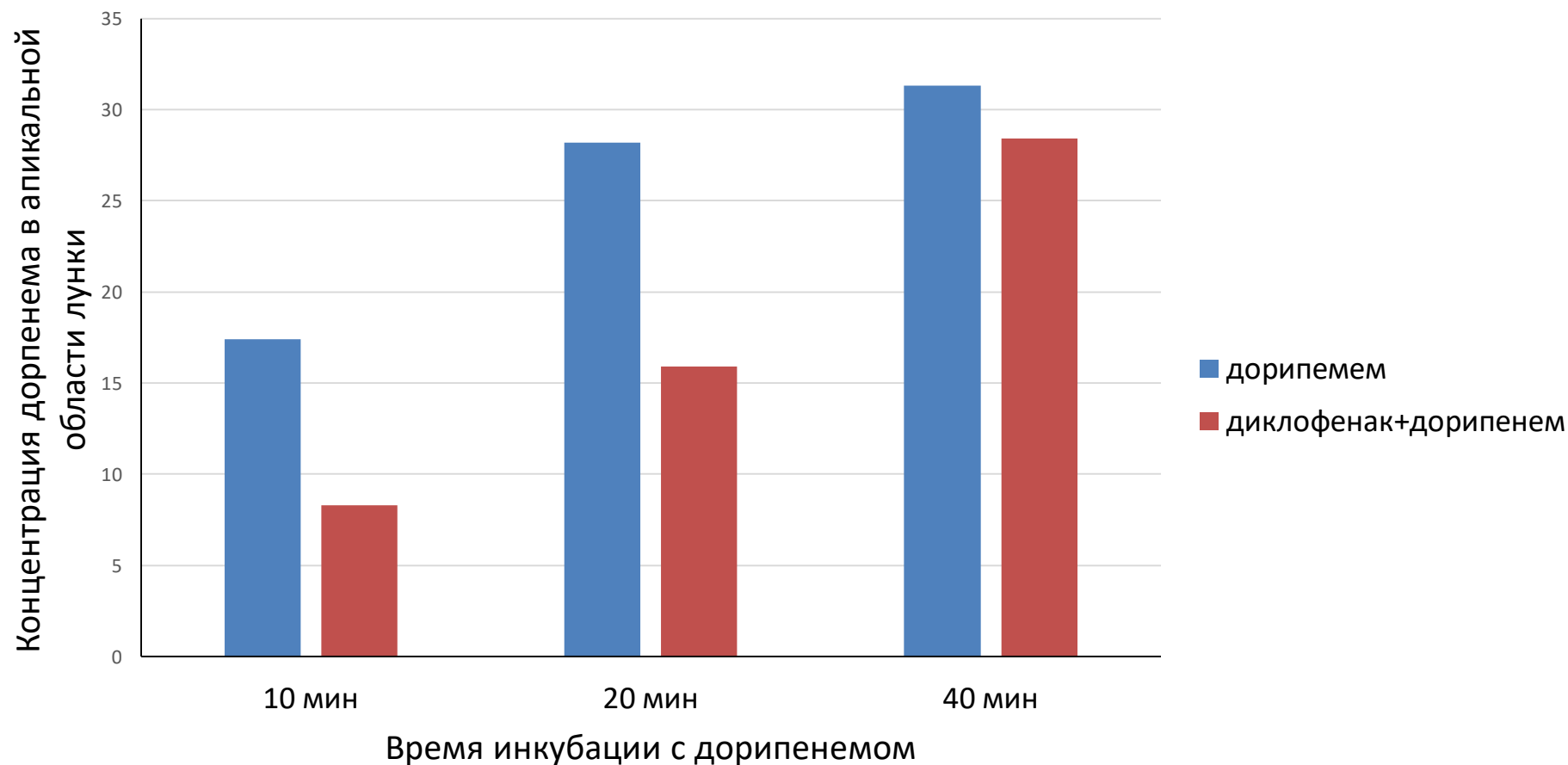


Дизайн эксперимента по ингибированию транспортеров ОАТ

	1	2	3	4
A	20мкМ диклофенак дорипенем 45 μМ, 10'	20мкМ диклофенак дорипенем 45μМ, 20'	20мкМ диклофенак дорипенем 45μМ, 40'	 дорипенем 45μМ, 40'
B	20мкМ диклофенак меропенем 50μМ, 10'	20мкМ диклофенак меропенем 50μМ, 20'	20мкМ диклофенак меропенем 50μМ, 40'	 меропенем 50μМ, 40'
C	 дорипенем 45 μМ, 10'	 дорипенем 45μМ, 20'	 меропенем 50μМ, 10'	 меропенем 50μМ, 20'

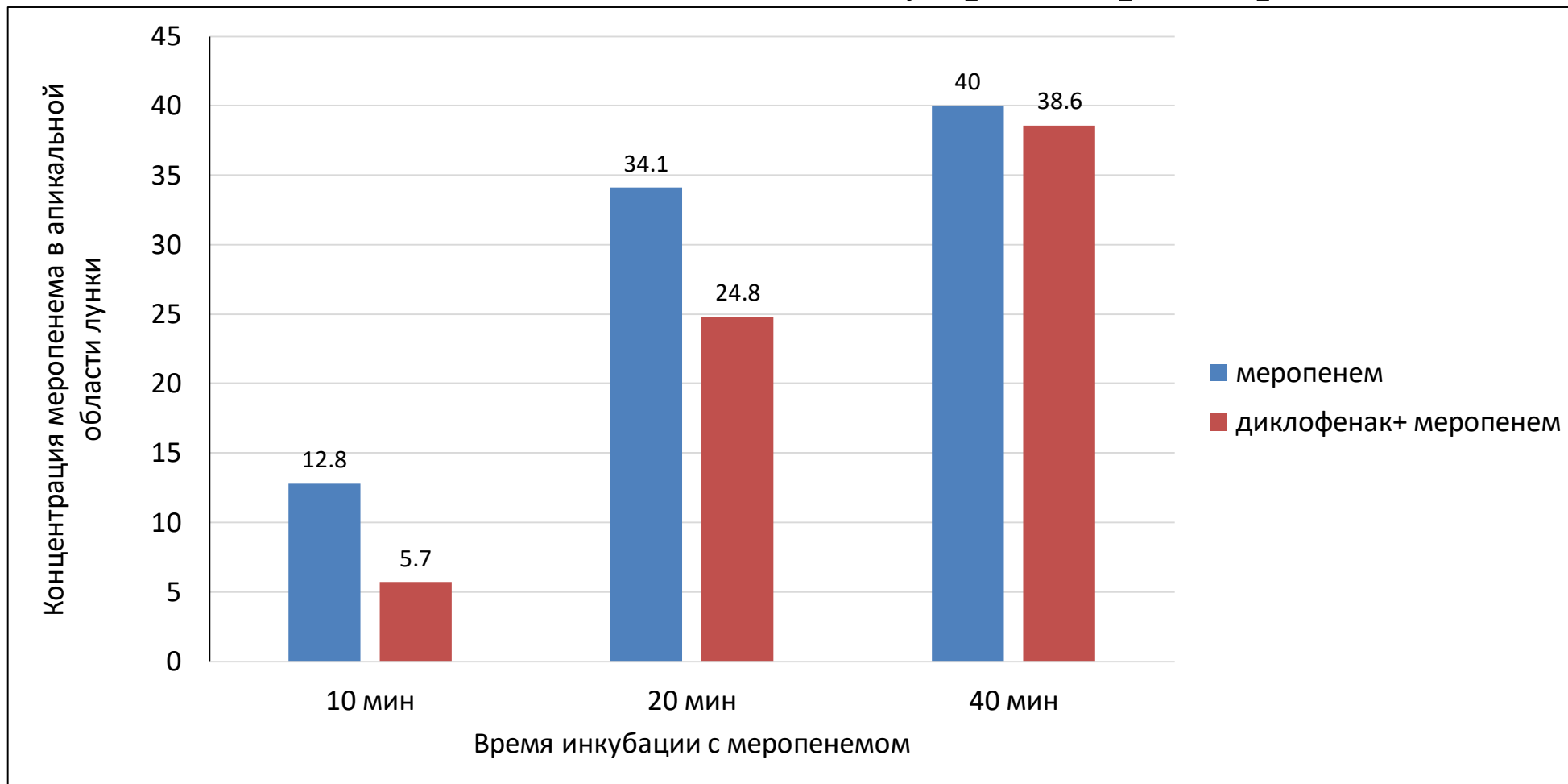


Влияние предварительной инкубации с диклофенаком клеточной линии RPTES на динамику транспорта дорипенема



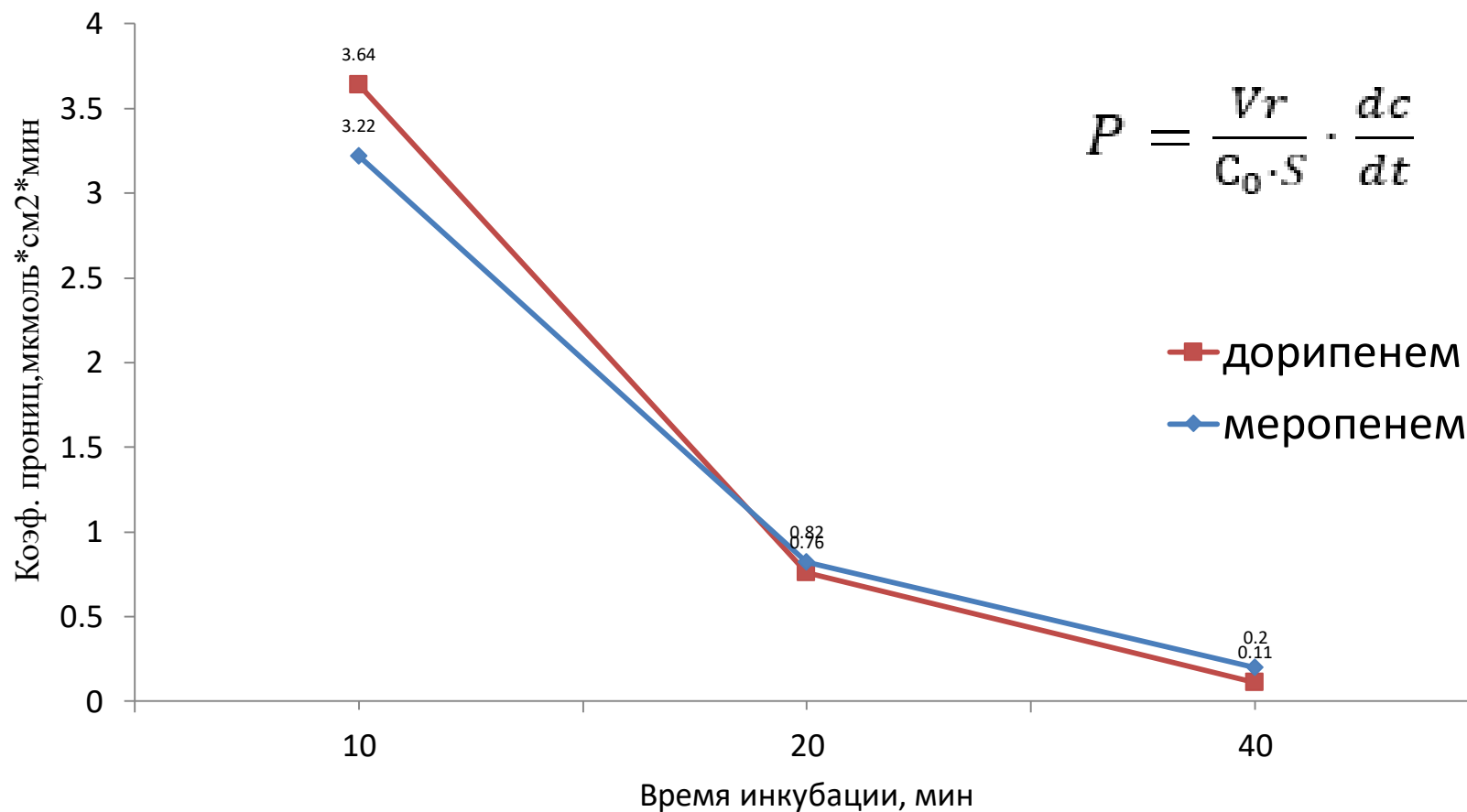


Влияние предварительной инкубации с диклофенаком клеточной линии RPTES на динамику транспорта меропенема





Коэффициент проницаемости мембраны RPTEC при транспорте дорипенема и меропенема

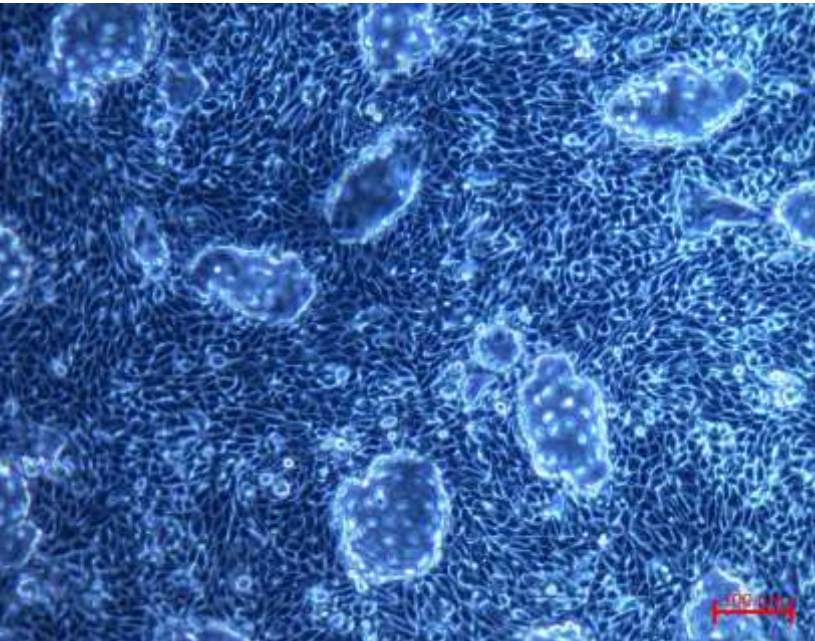




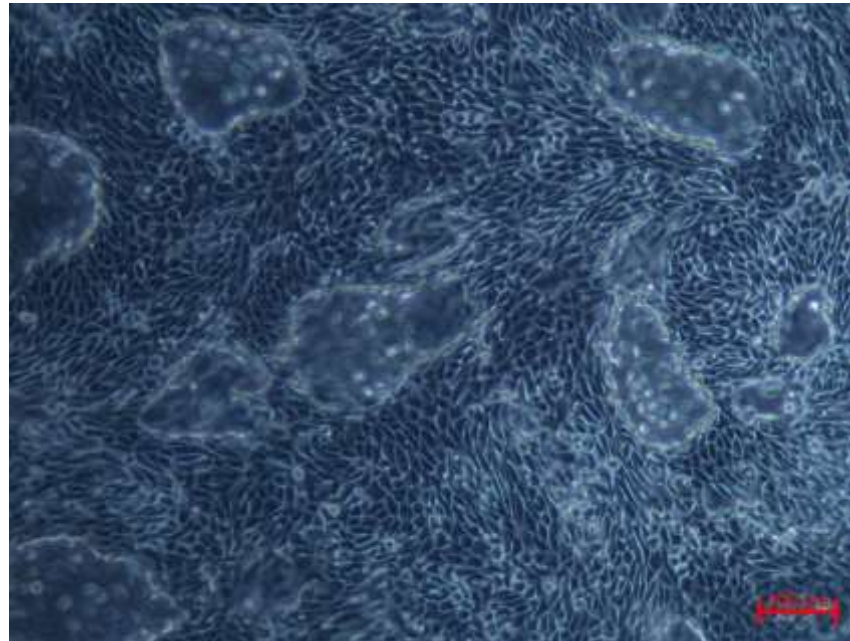
В эксперименте было изучены возможных нефротоксических свойств фавипиравира на модели клеточной линии RPTEC. Для этого проводили культивирование клеточной линии RPTEC в планшетах с мембранными вставками, измерение трансэпителиального сопротивления (TEER) для контроля плотности монослоя, оценку нефротоксического действия фавипиравира проводили по изменению TEER в клеточной линии RPTEC.



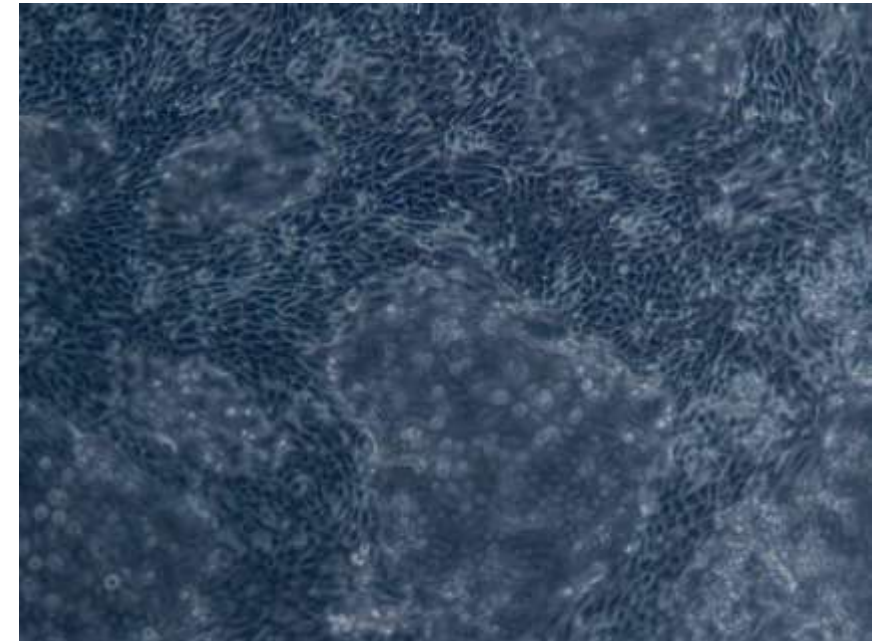
В опыте использовались субстанция фавипиравира (АО «Фармославль», РФ). Субстанцию фавипиравира растворяли в культуральной среде DMEM/F12 до следующих конечных концентраций: 5 и 10, что соответствует терапевтическим концентрациям фавипиравира в плазме крови пациентов, а также 15 мкг/мл, что превышает максимально терапевтическую концентрацию. Образовавшийся раствор добавляли в базальную камеру планшета Transwell после образования клетками RPTES плотного монослоя. Смена среды с фавипиравиром производилась один раз в 2 суток. Общее время эксперимента – 6 суток.



3 суток



8 суток



14 суток

При культивировании RPTEC с концентрацией фактора роста 20-60нг/мл образуются участки, где клетки наслаиваются друг на друга, образуя конгломераты, внутри которых вследствие активности соответствующих транспортеров образуются капли из воды. Наличие подобных включений затрудняет проведение экспериментов по транспорту, где необходим однородный плотный монослой клеток, контроля этого параметра используют измерение трансэпителиального сопротивления (TEER). Согласно литературным данным в норме у RPTEC значение TEER находится в диапазоне 140-180 Ом/см²



MERSSTX01
MERSSTX01
MILICELL® ERS (PROBES)
QTY. 1 EA Made in USA
EMD Millipore Corporation, Burlington, MA 01803 201796-01

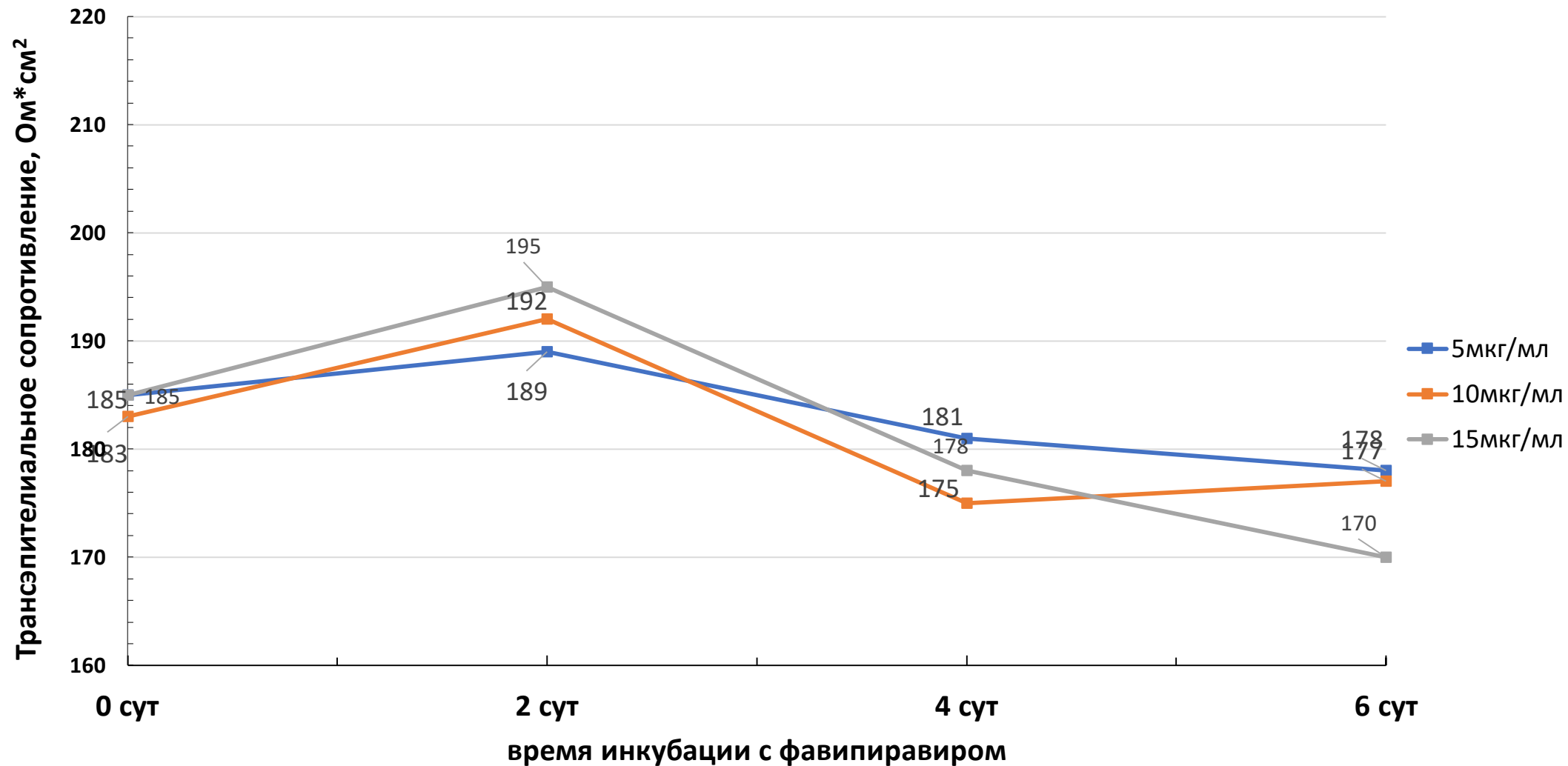
HANDLE
with care

FRAGILE
handle

CE



Изменение трансэпителиального сопротивления в монослое клеточной линии RPTES при инкубации с фавипиравиром





1. Клеточная линия RPTEC более чувствительная к токсическому действию цефалоспоринов по сравнению с HEK293.
2. Отработана методика количественного определения субстратов OAT (цефалоспоринов и карбапенемов) в культуральной среде методом ^1H ЯМР.
3. Предварительная инкубация клеточной линии RPTEC диклофенаком, (ингибитор OAT), вызывала снижение уровня транспорта карбапенемов, что является следствием пониженной функциональной активности OAT.



4. Отработана методика измерения трансэпителиального сопротивления (TEER) в клеточной линии RPTEC.
5. Полученные значения TEER (140-150 Ом/см²) в монослое RPTEC соотносятся с данными литературы и свидетельствуют об образовании плотных межклеточных контактов в монослое.
6. Динамика снижения трансэпителиального сопротивления при инкубации фавипиравира с клеточной линией RPTEC в течение 6 суток зависит от концентрации препарата, показатели TEER монослоя RPTEC (140-180 Ом/см²) спустя 6 суток инкубации с фавипиравиром находятся в пределах нормы, что свидетельствует об отсутствии выраженного нефротоксического действия за данный промежуток времени.



НТП по теме в 2022 году

1. Прокофьев А.Б., Белков С.А., Казаков Р.Е., Бердникова Н.Г., с соавт. – Опыт использования терапевтического лекарственного мониторинга для контроля безопасности назначения ванкомицина у пациентов с сепсисом в условиях реанимационных отделений. Безопасность и риск фармакотерапии. 2022; 10(2):139–150. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2022-10-2-139-150>
2. Казаков Р.Е., Городецкая Г.И., Арчвадзе Р.В., Завтоньев А.В. с соавт – Особенности развития токсической нефропатии при проведении антибиотикотерапии. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2022;. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2022-392>
3. В. А. Евтеев, А. Б. Прокофьев, Р. Е. Казаков, И.А. Мазеркина, О.В. Муслимова, Е.Ю. Демченкова, С.Ю. Сереброва, Н.Д. Бунятян – Способ оценки транспорта отрицательно заряженных лекарственных средств на экспериментальной модели клеточной линии НЕК293, Пат. RU 2762265 С1, 17.12.2021



РИД по теме в 2022 году

1. Патент на изобретение № 2762265 «Способ оценки транспорта отрицательно заряженных лекарственных средств на экспериментальной модели клеточной линии НЕК293»
2. Заявка на изобретение «Клеточная линия со стабильной экспрессией почечных транспортеров» 12.2022



НТП по теме в 2022 году

1. Обучающая лекция «Некоторые аспекты нефротоксического действия ЛС при антивирусной терапии»
2. Доклады на конференциях: 1. XVII Международный конгресс «Рациональная фармакотерапия «Золотая осень», 13-15 октября 2022 года, Санкт-Петербург. «Изучение возможных токсических эффектов β -лактамных антибиотиков группы цефалоспоринов *in vitro*». 2. V Международной научно-практической конференции «Фармакология разных стран», 18-19 октября 2022 г., г. Курск: «Изучение возможных нефротоксических эффектов β -лактамных антибиотиков группы карбапенемов на модели клеточной культуры НЕК293»

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



научный центр
экспертизы средств
медицинского применения