научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

ОТЧЕТ
по этапу № 1 «Анализ современного состояния оценки органотоксичности лекарственных веществ, элиминация которых определяется транспортерами органических анионов» (2018 год)

НИР «Разработка методов определения и критериев оценки активности экспрессии генов-транспортеров лекарственных веществ»

Москва 2018

Рекомендации EMA, FDA, MHLW для производителей ЛС*

- Согласно рекомендациям FDA, если почечный клиренс изучаемого ЛС составляет не менее 25%, следует проверить ЛС на предмет сродства к транспортерам органических анионов. Аналогичного подхода придерживается Министерство здравоохранения, труда и благосостояния Японии.** Европейское медицинское агенство оставляет решение о величине почечного клиренса на усмотрение каждой отдельной страны.***
- EMA, FDA, MHLW производят обязательную проверку возможного ингибирования транспортеров изучаемым ЛС на моделях клеточных культур, с повышенной экспрессией транспортеров.
- Рекомендованные клеточные линии: HEK293, MDCK.

*In Vitro Metabolism and Transporter Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industy. U.S. Department of Health and Human Service Food and Drug Administration.(Oct 2017)
**Ministry of Health, Labour and Welfare. 2014. Japan
***EMA Guideline on Investigation of Drug Interactions, July 2012

ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ за 2018 год

Цель исследования: анализ современного состояния оценки органотоксичности лекарственных веществ, элиминация которых определяется транспортерами органических анионов.

Задачи:

- проведение анализа литературных данных о наиболее значимых транспортерах ЛС, а также лекарств, в транспорте которых они принимают участие

- выбор и апробация метода и модели для исследования экспрессии генов транспортеров ЛС на моделях клеточных культур

Сравнительная характеристика транспортеров органических анионов

транспортер / параметры	**OAT1**	**OAT2**	**OAT3**
Локализация	Почки, физиологические барьеры	Печень, почки	Почки, физиологические барьеры
Основные ЛП-субстраты	метотрексат, ацикловир,	ганцикловир, НПВС, β-лактамы,	Циметидин, правастатин, β-лактамы,
ингибиторы	Пробенецид	Пробенецид	Циклофосфамид

Методы изучения транспортеров

метод / характеристики	ОТ-ПЦР	Иммуноблоттинг, иммуногистохимия	Изучение функциональной активности
Суть метода	Изменение количества мРНК транспортера, по результатам ПЦР	Качественное и количественное измерение белка, основанное на реакции «антиген-анитело»	Оценка функционирования транспортера по измерению транспорта маркерных субстратов
Преимущества	Высокая точность и чувствительность. Хорошая воспроизводимость	Позволяет судить о состоянии белка, а также о его положении к клетке	Оценивает непосредственно активность транспортера
Недостатки	Нельзя судить о состоянии собственно белка транспортера	Трудоемкость, высокая стоимость анализа	Трудоемкость, плохая воспроизводимость

Оценка генетического профиля клеточных линий HepG2 и HEK293

Метод анализа: STR-профилирование

Исследование проводилось с помощью тест-системы COrDIS Plus (ООО «ГОРДИЗ», Регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ФСР2012/13548 от 23.01.2017)

Для полученных генотипов проводился поиск по референсной базе клеточных линий ATCC

Результаты анализа

	HepG2		HEK293	
маркеры	**ATCC**	**образец**	**ATCC**	**образец**
D5S818	11,12	11,12	8,9	8,9
D13S317	9,13	9,13	12,14	12,14
D7S820	8,10	10,10	11,12	11,12
D16S539	12,13	12,13	9,9	9,9
vWA	17,17	17,17	16,19	16,19
TH01	9,9	9,9	7,9,3	7,9.3
AMEL	X,Y	X,Y	X,X	X,X
TPOX	8,9	8,9	11,11	11,11
CSF1PO	10,11	10,11	11,12	11,12
Совпадение	94%			100%

Нормативные требования ATCC (American Type Cell Culture)

100% - образец идентичен референсному

>80% - образец считается родственным референсному (произошел от общей линии-предшественника)

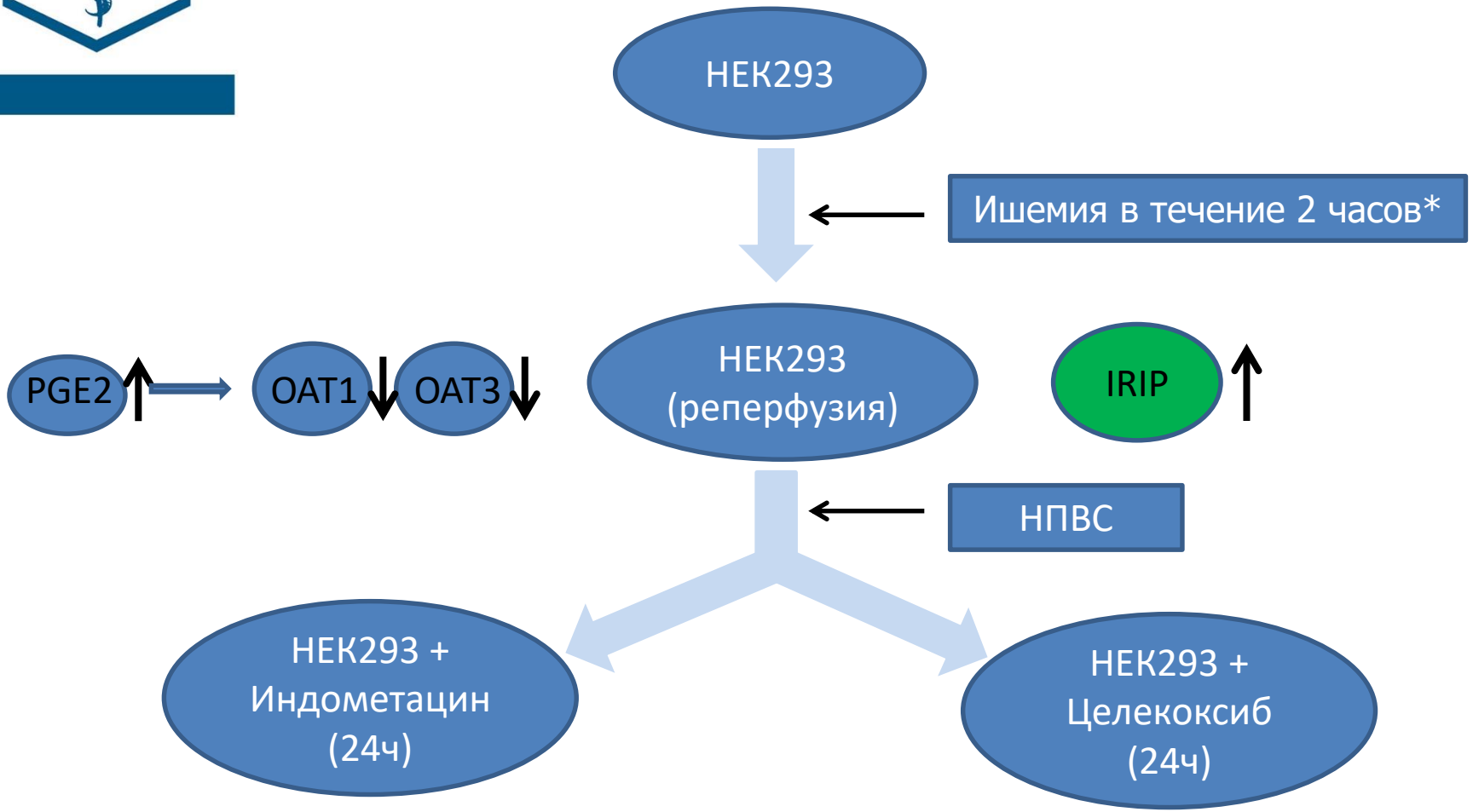
<80% - образец не может достоверно считаться родственным

Изучение экспрессии генов транспортеров

Метод: Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Экспериментальная модель: клеточные линии HEK293 и HepG2

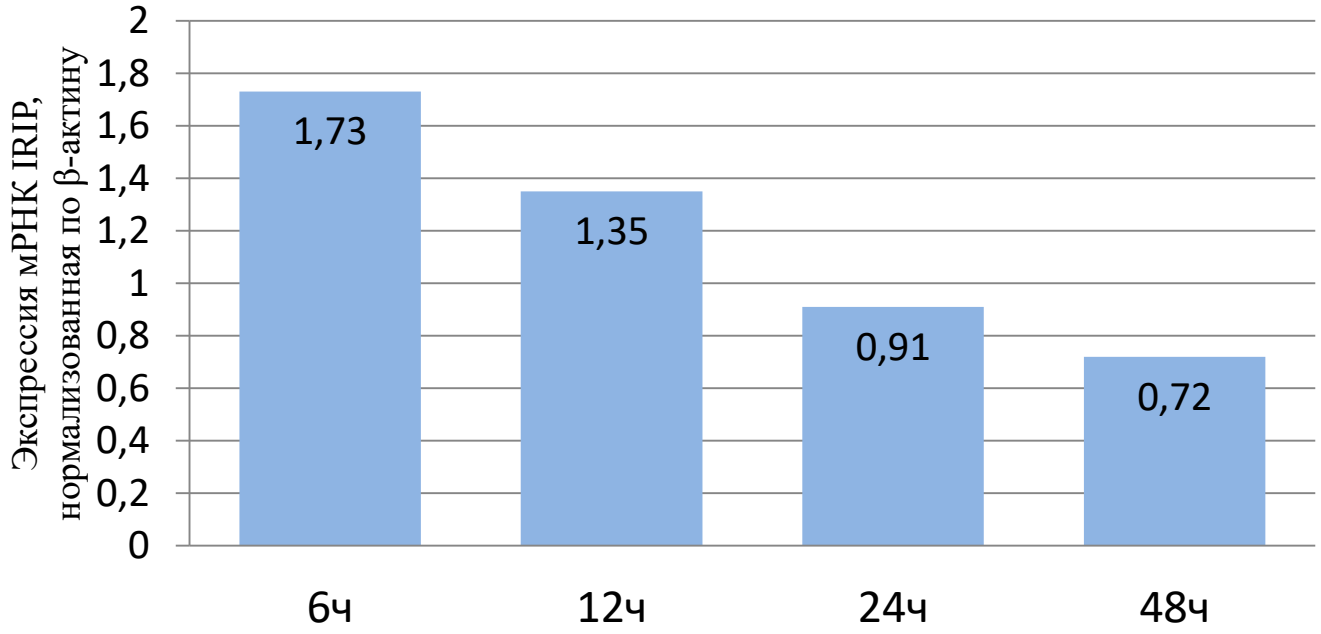
Дизайн эксперимента



* - Sauvant C et al. Implementation of an in vitro model system for investigation of reperfusion damage after renal ischemia. Cell Physiol Biochem 2009;24:567- 576.

Результаты

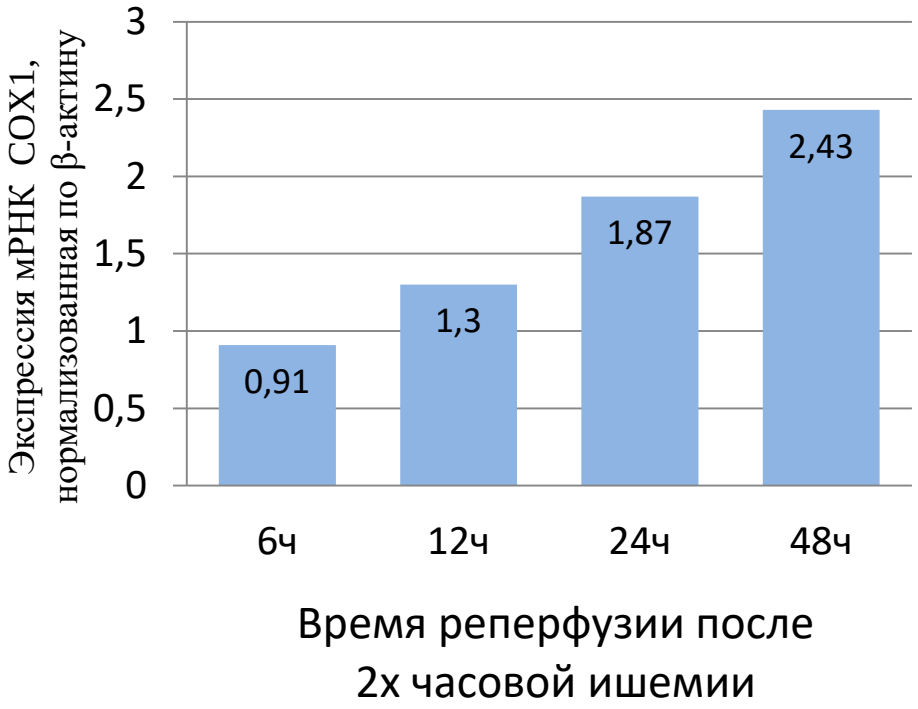
Подтверждение ишемических условий проводилось по изучению уровня экспрессии специфического маркера почечной ишемии IRIP (Ischemia Reperfusion Induced Protein). Уровень экспрессии IRIP в контроле условно принят за единицу.

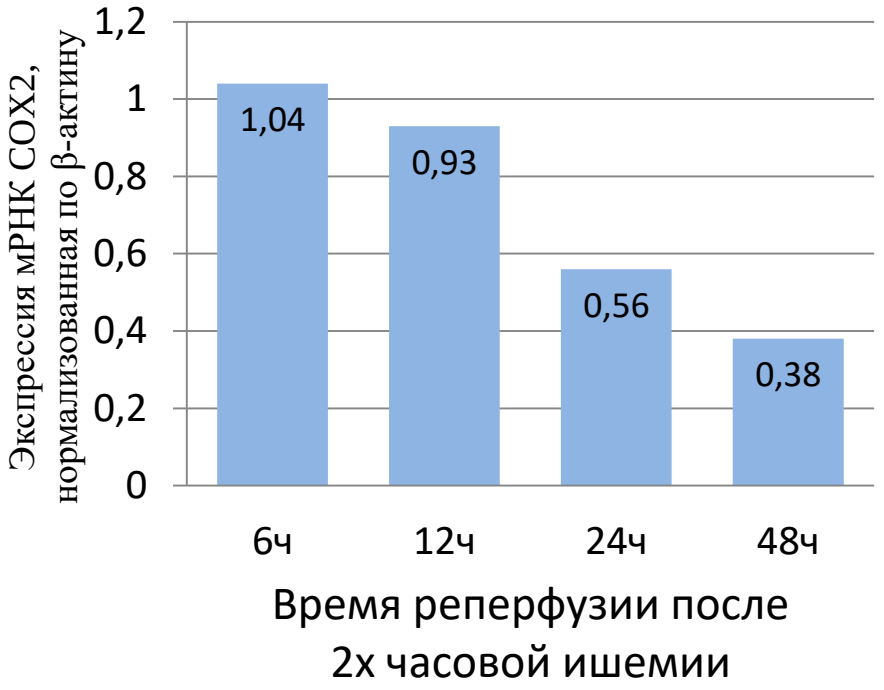


Время реперфузии после 2х часовой ишемии

Результаты

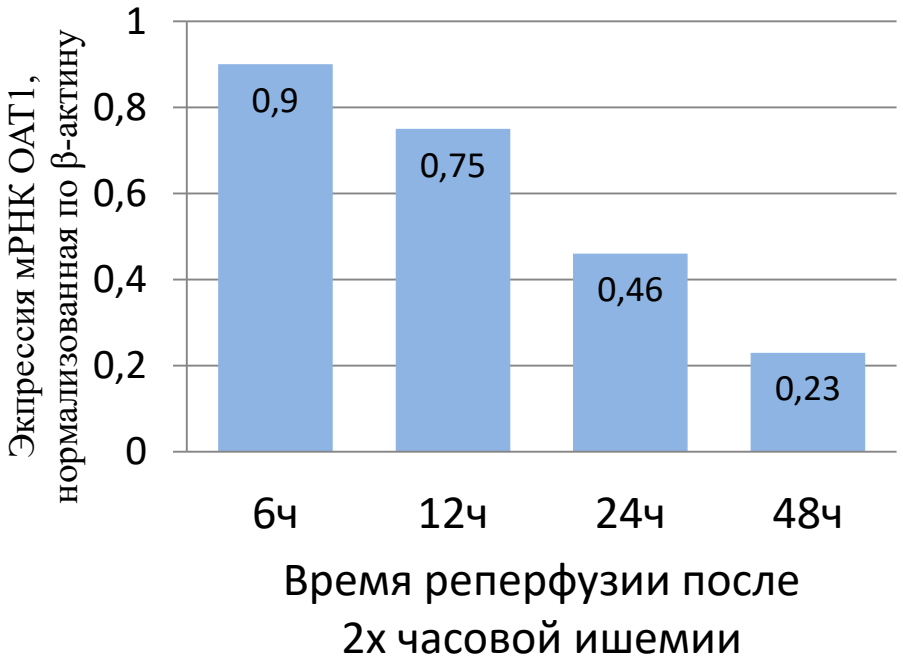
Изменение уровня PGE2 оценивалось по основе экспрессии COX1 и COX2. Уровень экспрессии в контроле условно принят за единицу.

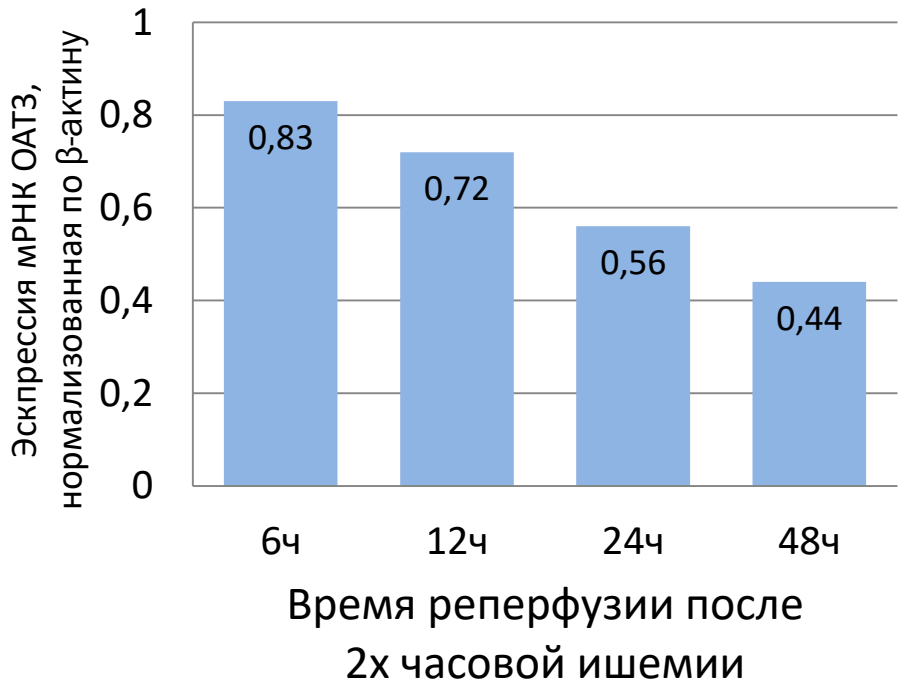




Результаты

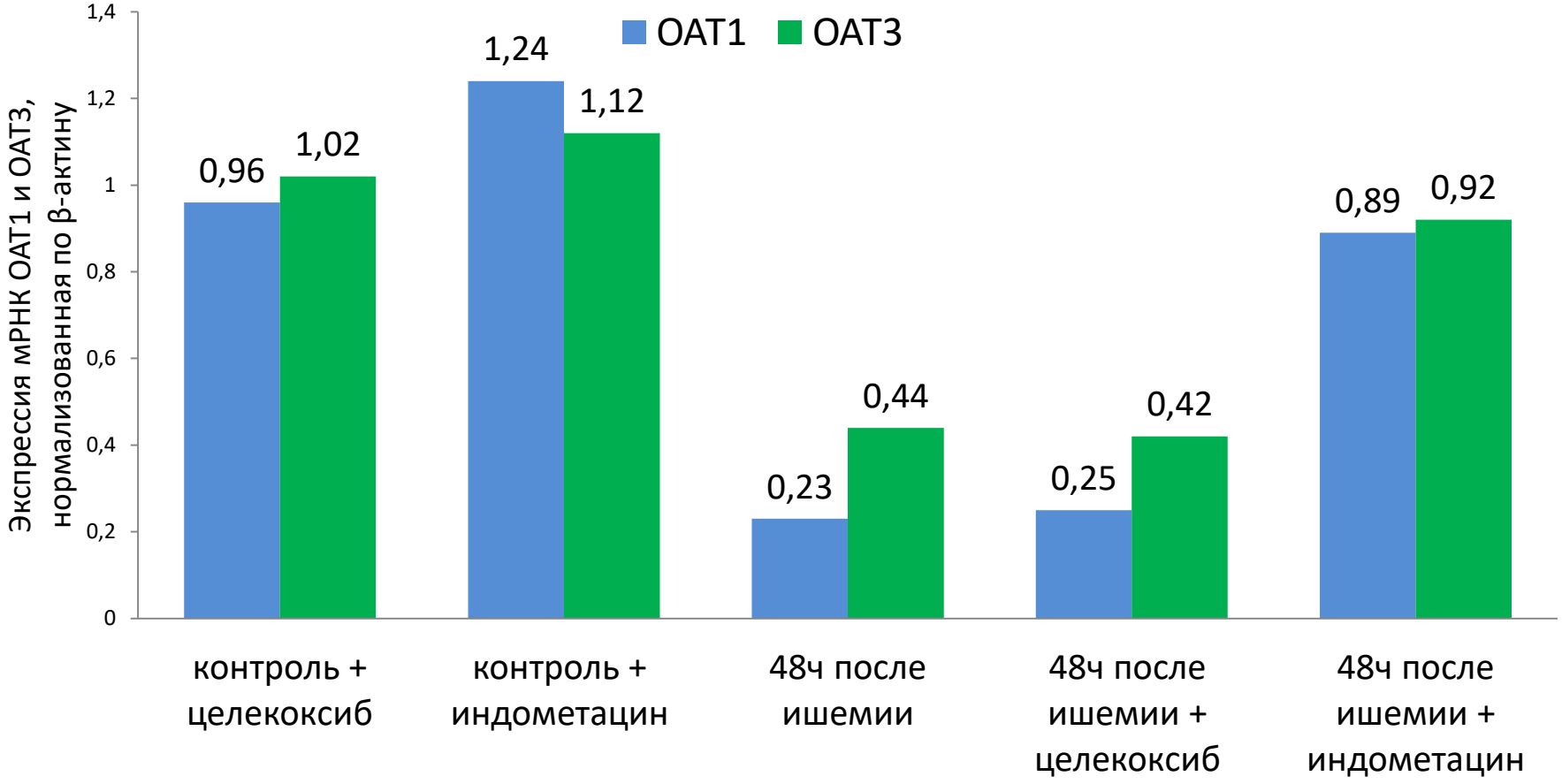
Уровень экспрессии мРНК OAT1 и OAT3 в HEK293 относительно β-актина в условиях реперфузии после ишемии. Уровень экспрессии мРНК OAT1 в контроле условно принят за единицу





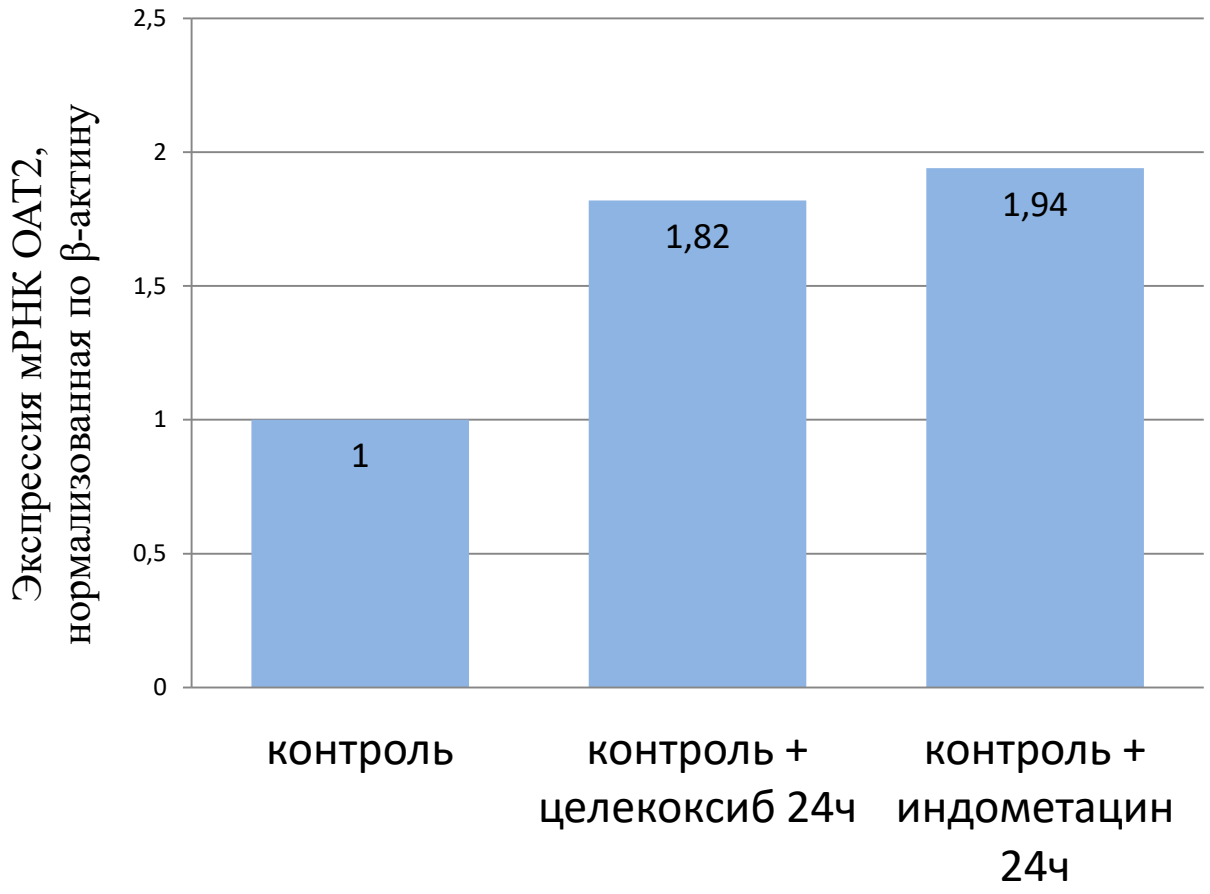
Результаты

Действие блокаторов циклооксигеназы: индометацина (неселективный) и целекоксиба (селективный блокатор COX2) на экспрессию мРНК OAT1 и OAT3. Уровень экспрессии контроля условно принят за единицу.



Результаты

Влияние целекосиба и индометацина на уровень экспрессии OAT2 в клеточной линии HepG2



Выводы

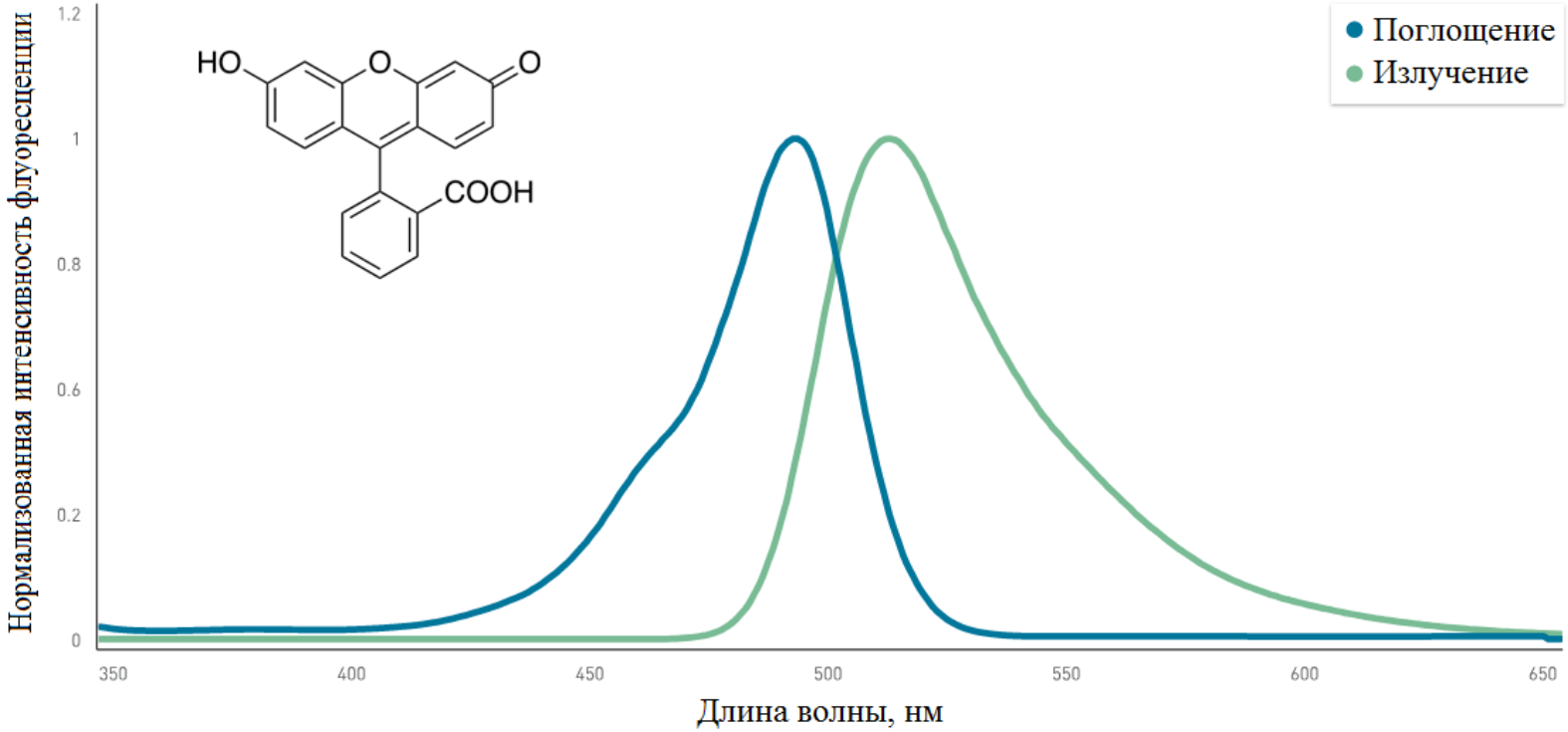
1. Создание модели постишемической реперефузии *in vitro* на клеточной линии HEK293 вызывает увеличение экспрессии циклооксигеназы 1. Экспрессия циклооксигеназы 2 в этих условиях понижается.
2. В условиях реперфузии наблюдается понижение экспрессии OAT1 и OAT3.
3. Неселектиный ингибитор циклоксигеназы – индометацин останавливает этот процесс и возвращает экспрессию OAT1 и OAT3 на прежний уровень.
4. Селективный ингибитор циклооксигеназы 2 - целекоксиб не оказывает влияние на уровень экспрессии транспортеров в клеточной линии HEK293, что позволяет предположить зависимость экспрессии транспортеров от циклоокисгеназы 1.
5. В клеточной линии HepG2 оба ингибитора циклооксигеназы вызывали повышение экспрессии OAT2, что можно объяснить исходно высоким уровнем COX2, характерным для данной клеточной линии.

Изучение функциональных характеристик транспортеров

1. Отработка методики измерения флуоресцеина как контрольного субстрата при исследовании активности транспортеров

2. Влияние гипоксии на функциональные характеристики транспортеров органических анионов на модели клеточной линии HEK293

Флуоресцеин



- Субстрат OAT1, OAT3
- Определяется методом флуориметрии

Современные исследования транспортеров с использованием флуоресцеина в качестве контрольного субстрата

Авторы, год	Название
Furuya T, 2017	Organic anion transporter 1 (OAT1/SLC22A6) enhances bioluminescence based on d-luciferin-luciferase reaction in living cells by facilitating the intracellular accumulation of d-luciferin.
Koji Takaori ,2016	Severity and Frequency of Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis
Caetano-Pinto P, 2017	Cetuximab Prevents Methotrexate-Induced Cytotoxicity in Vitro through Epidermal Growth Factor Dependent Regulation of Renal Drug Transporters.
J. Jansen, 2016	Bioengineered kidney tubules efficiently excrete uremic toxins
Chedik,2017	Inhibition of Human Drug Transporter Activities by the Pyrethroid Pesticides Allethrin and Tetramethrin.
Nieskens , 2016	A Human Renal Proximal Tubule Cell Line with Stable Organic Anion Transporter 1 and 3 Expression Predictive for Antiviral-Induced Toxicity.
Melanie L. Lawrence, 2015	Transport of organic anions and cations in murine embryonic kidney development and in serially-reaggregated engineered kidneys
Preising C, 2015	Regulation of Expression of Renal Organic Anion Transporters OAT1 and OAT3 in a Model of Ischemia/Reperfusion Injury.
Бреслер В.М., Наточин Ю.В, 1972	Угнетение диуретиками секреции флюоресцина в проксимальном канальце почки лягушки (прижизненное исследование методом контактной микроскопии).(Laboratory of development of excretory function, I. M. Sechenov, institute of evolutionary physiology and biochemistry, academy of sciences of the USSR, Leningrad)

Дизайн эксперимента

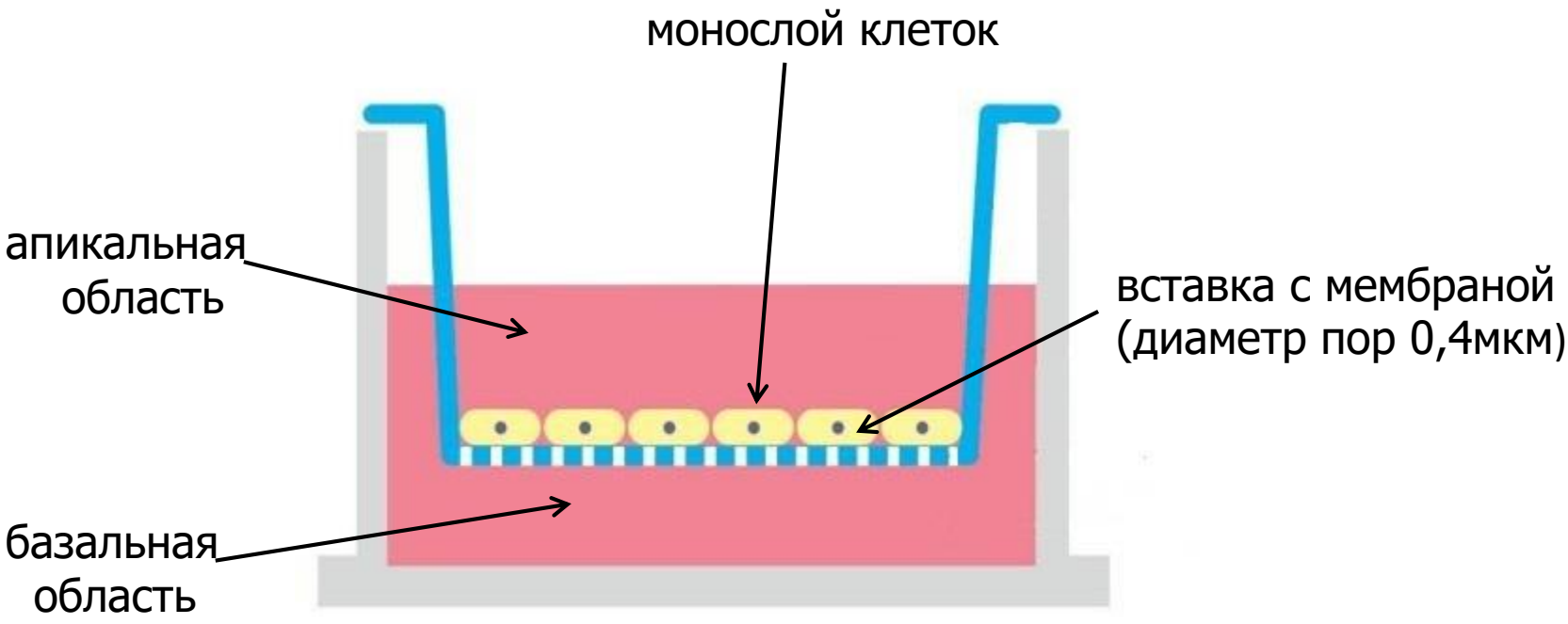
1. Выращивание клеток HEK293 на 12ти луночных плашках с мембранными вставками диаметром пор 0,4мкм (Costar, Transwell).

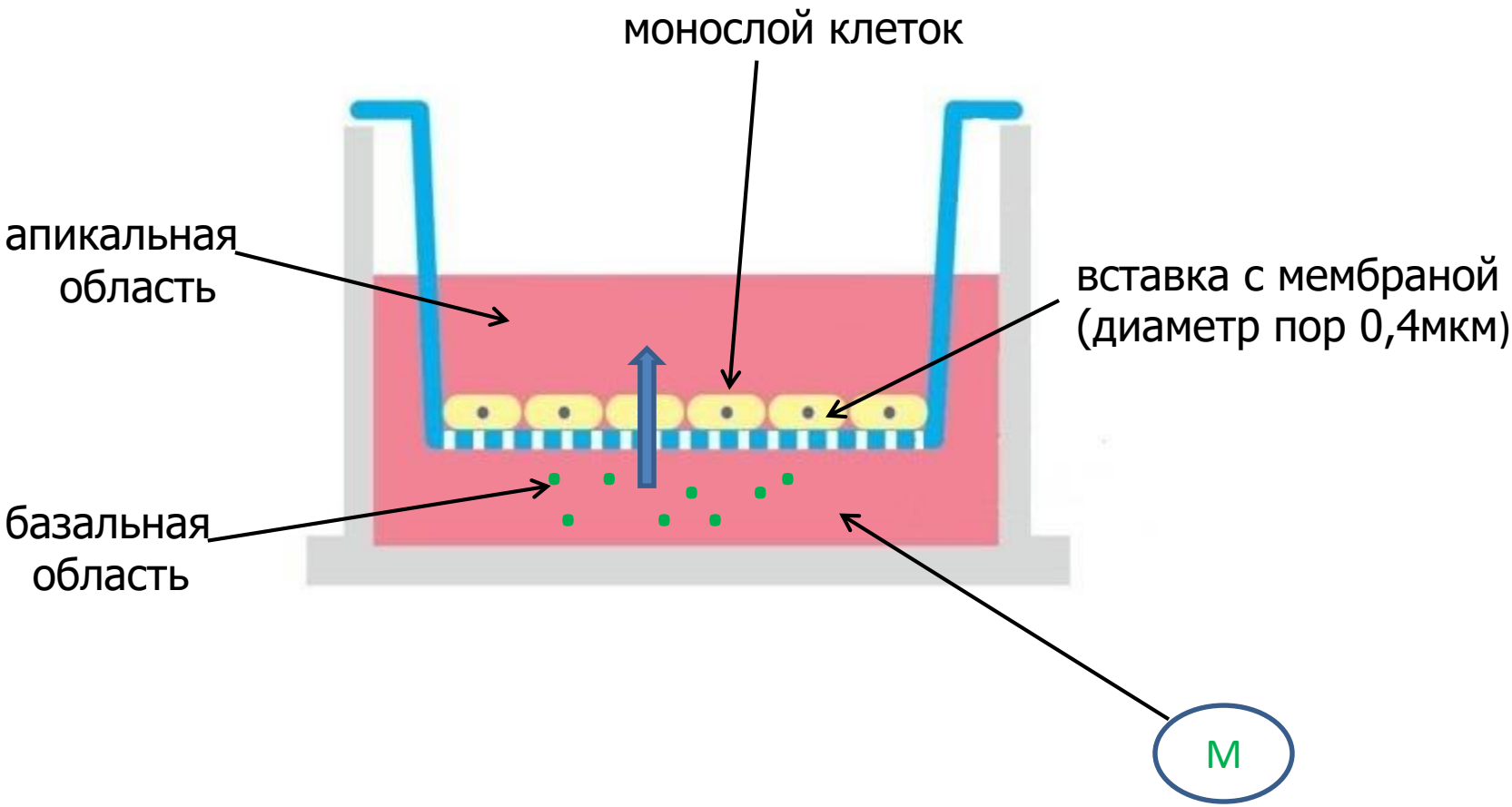
2. Создание условий ишемии*

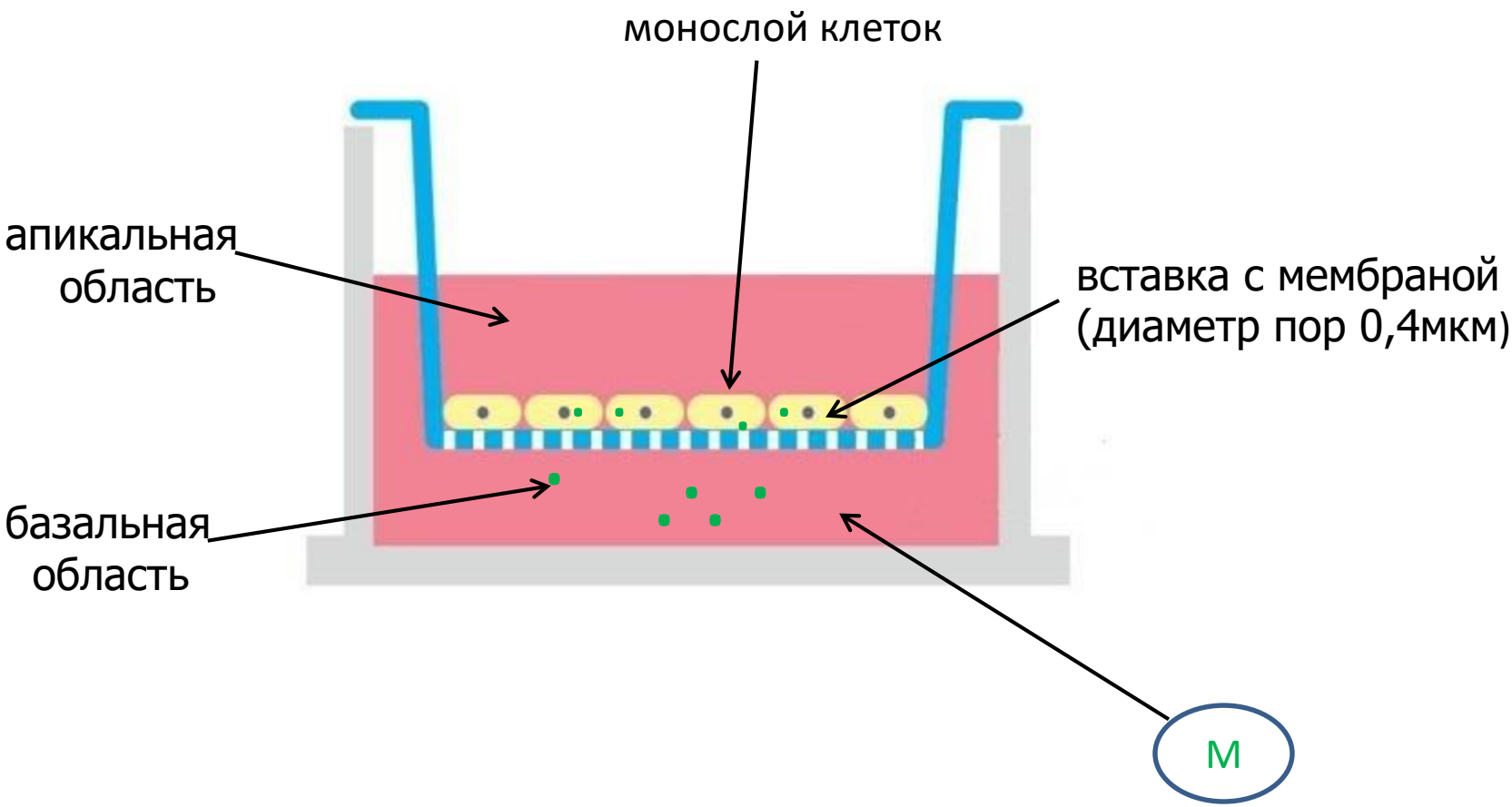
3. Добавление флуоресцеина в базальную камеру на различные промежутки времени

4. Измерение концентрации флуоресцеина в апикальной камере, а также в самих клетках

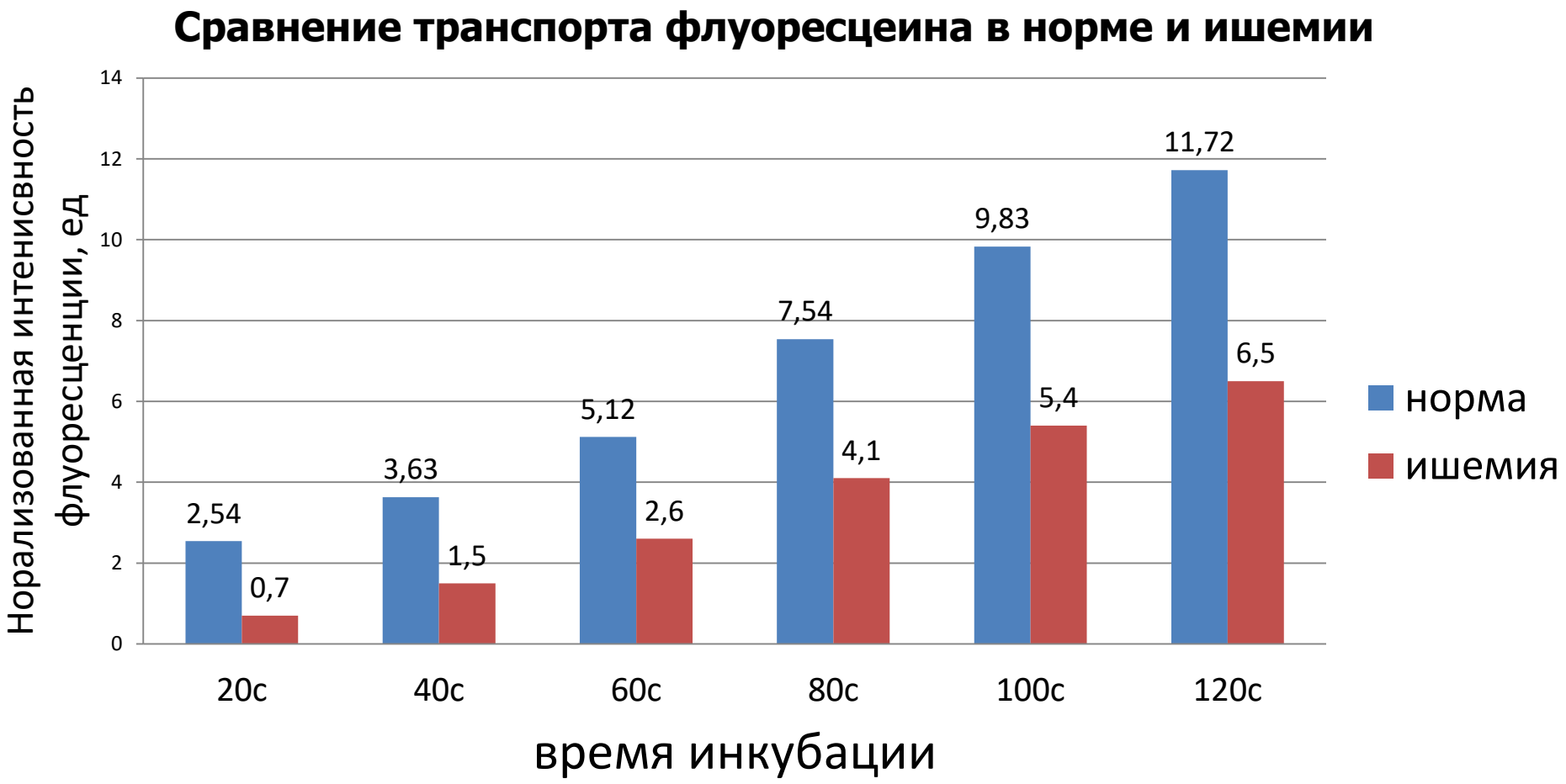
* - Sauvant C et al. Implementation of an in vitro model system for investigation of reperfusion damage after renal ischemia. Cell Physiol Biochem 2009;24:567- 576.


монослой клеток
апикальная область
вставка с мембраной (диаметр пор 0,4мкм)
базальная область


монослой клеток
апикальная область
вставка с мембраной (диаметр пор 0,4мкм)
базальная область
М


монослой клеток
апикальная область
вставка с мембраной (диаметр пор 0,4мкм)
базальная область
М

Результаты


Сравнение транспорта флуоресцеина в норме и ишемии
Норализованная интенисвность флуоресценции, ед
0
2
4
6
8
10
12
14
2,54
0,7
3,63
1,5
5,12
2,6
7,54
4,1
9,83
5,4
11,72
6,5
20с
40с
60с
80с
100с
120с
время инкубации
норма
ишемия

Выводы

1. Клеточная линия HEK293 подходит для определения транспорта ксенобиотиков с помощью культуральных вставок с проницаемой мембраной

2. Результаты по функциональной активности транспортеров как в норме так и в условиях гипоксии находятся в соответствии с данными по уровню экспрессии их генов

Публикационная активность в 2018 году

- По данной теме опубликовано 3 статьи в журналах: «Безопасность и риск фармакотерапии», «Биофармацевтический журнал», «Сеченовский вестник»

научный центр
экспертизы средств
медицинского применения

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ !