



научный центр  
экспертизы средств  
медицинского применения

**Отчет по этапу № 2** *«Разработка методики определения экспрессии генов-транспортеров лекарственных веществ методом ОТ-ПЦР»*

**НИР** *«Разработка методов определения и критериев оценки активности экспрессии генов-транспортеров лекарственных веществ»* за I квартал 2019 г.

Прокофьев А.Б., директор ЦКФ.  
09.04.2019

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



# Изучение влияния лекарственных веществ на экспрессию транспортеров органических анионов на экспериментальных моделях

**Цель исследования:**

**Изучение функциональных характеристик транспортеров ЛС на моделях клеточных культур**

**Задачи исследования:**

1. Провести анализ литературных данных о структуре, функциях и клинико-фармакологическом значении MATE-транспортеров
2. Отработать методику определения уровня экспрессии генов MATE-транспортеров (SLC47A1 и SLC47A2) на модели клеточной линии HepG2 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией
3. Изучить функциональные характеристики транспортера OAT2 на модели клеточной линии HepG2



## Рекомендации регуляторных органов

Исследования функциональных характеристик МАТЕ-транспортеров включены в рекомендации FDA и EMA по межлекарственному взаимодействию.

Clinical Drug Interaction  
Studies —  
Study Design, Data Analysis,  
and Clinical Implications  
Guidance for Industry

*DRAFT GUIDANCE*

U.S. Department of Health and Human Services  
Food and Drug Administration  
Center for Drug Evaluation and Research (CDER)

October 2017  
Clinical Pharmacology



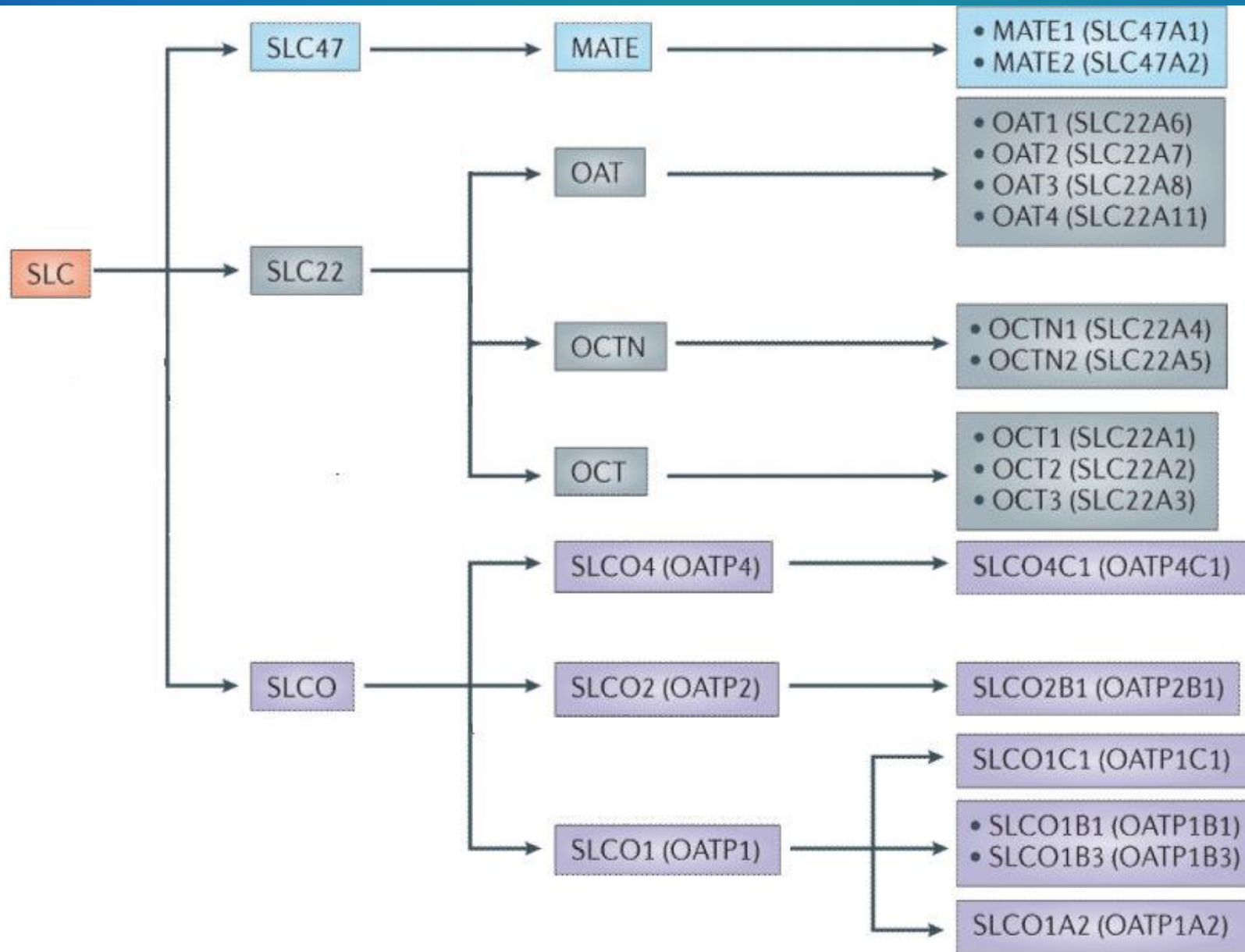
EUROPEAN MEDICINES AGENCY  
SCIENCE MEDICINES HEALTH

Guideline on the investigation of drug interactions

21 June 2012  
CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2\*\*  
Committee for Human Medicinal Products (CHMP)



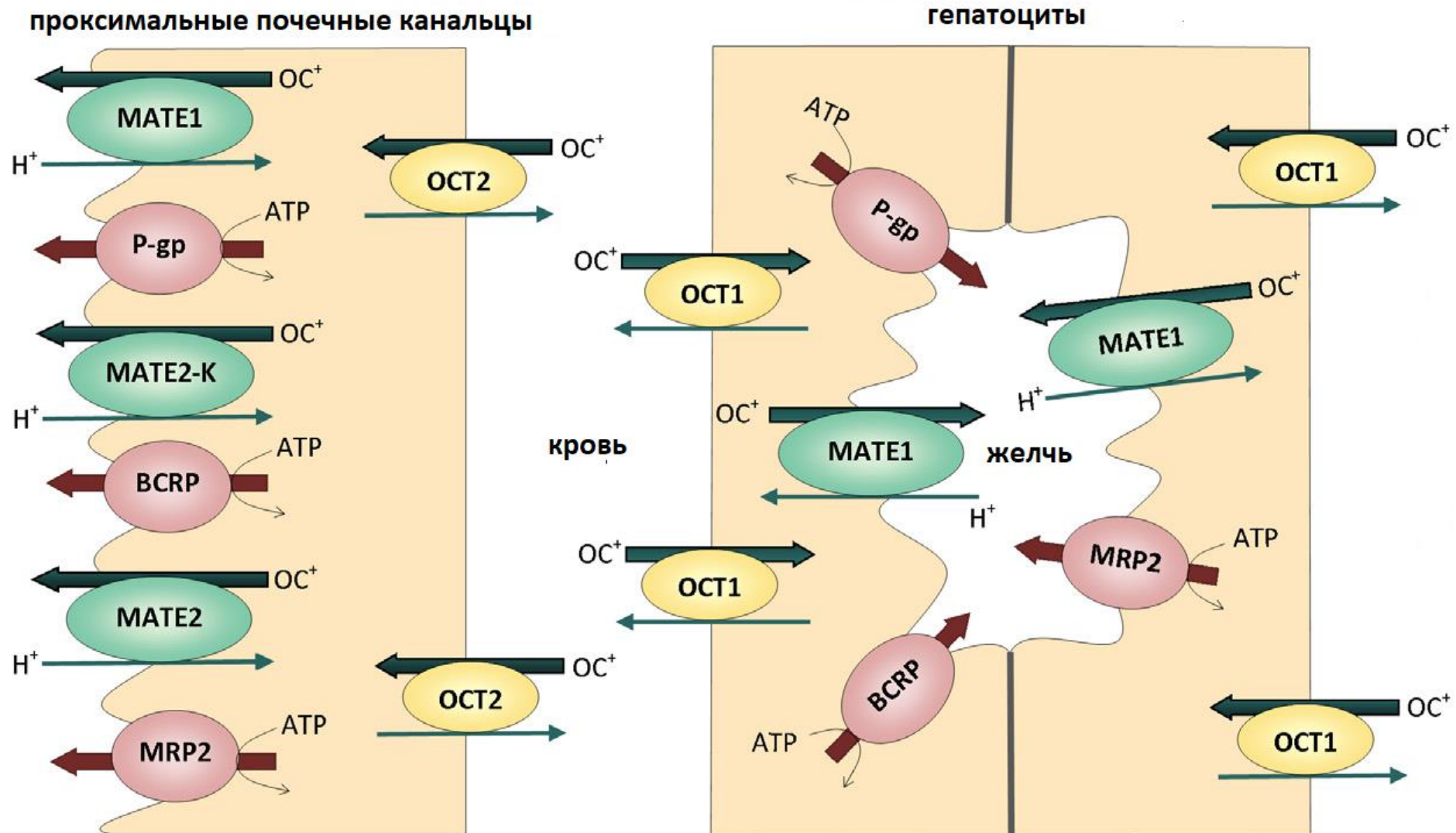
# Классификация SLC-транспортеров







# Локализация





## Субстратная специфичность

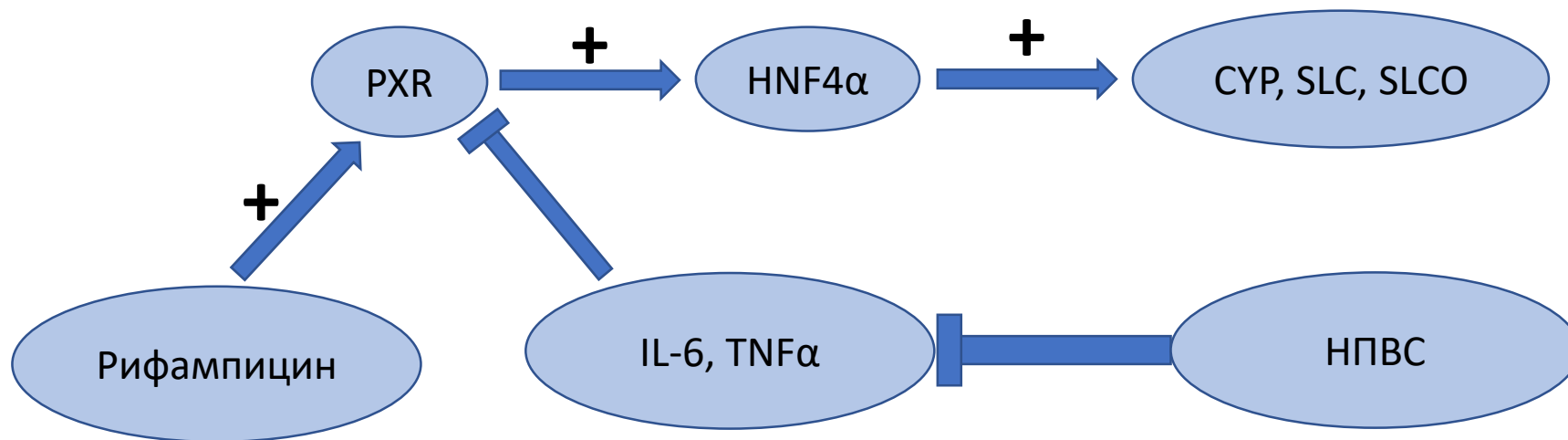
ЛП-субстраты	Субстраты, используемые в экспериментах	Ингибиторы
Циметидин, <b>метформин</b> , цефалексин, ацикловир, ганцикловир, фексофенадин, <b>цисплатин</b> , топотекан, атенолол	Тетраэтиламмоний, метилфенилпиридин	Хинидин, циметидин, верапамил, прокаинамид, левофлоксацин, ранитидин, ципрофлоксацин, пириметамин, моксифлоксацин, ондансетрон



**Цель:** отработка методики определения уровня экспрессии генов MATE-транспортеров (SLC47A1 и SLC47A2) на модели клеточной линии HepG2 методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

### **Задачи:**

1. Культивирование клеточных линий с последующим выделением мРНК
2. Подбор условий проведения полимеразной цепной реакции с генами SLC47A1 и SLC47A2
3. Подходы к изучению регуляции экспрессии генов MATE-транспортеров: оценка влияния транскрипционных факторов HNF4 $\alpha$  и PXR на экспрессию генов MATE-транспортеров





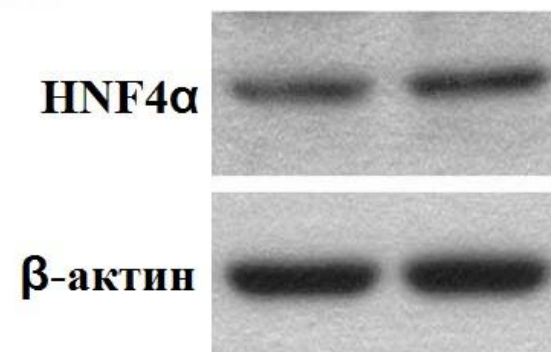
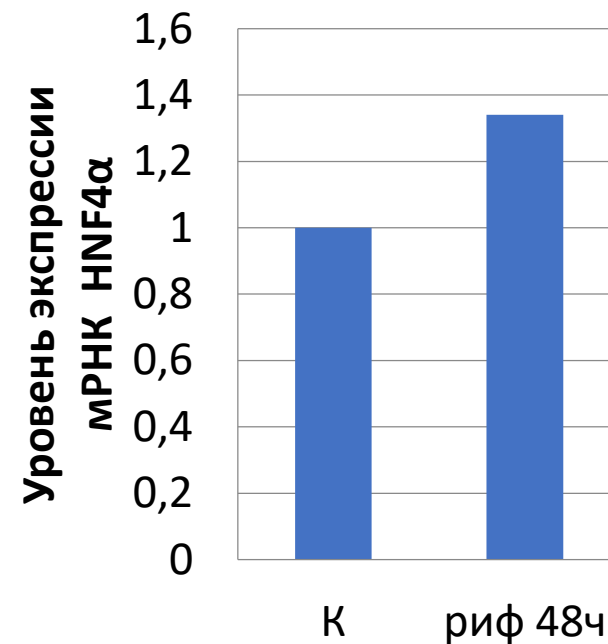
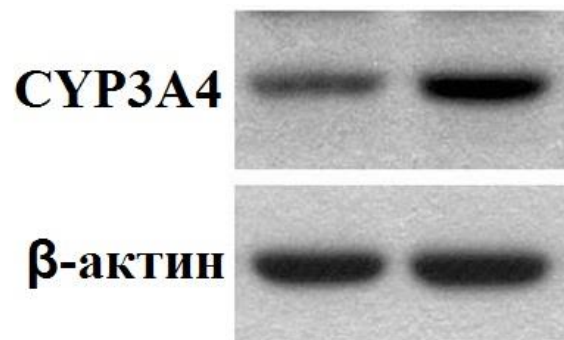
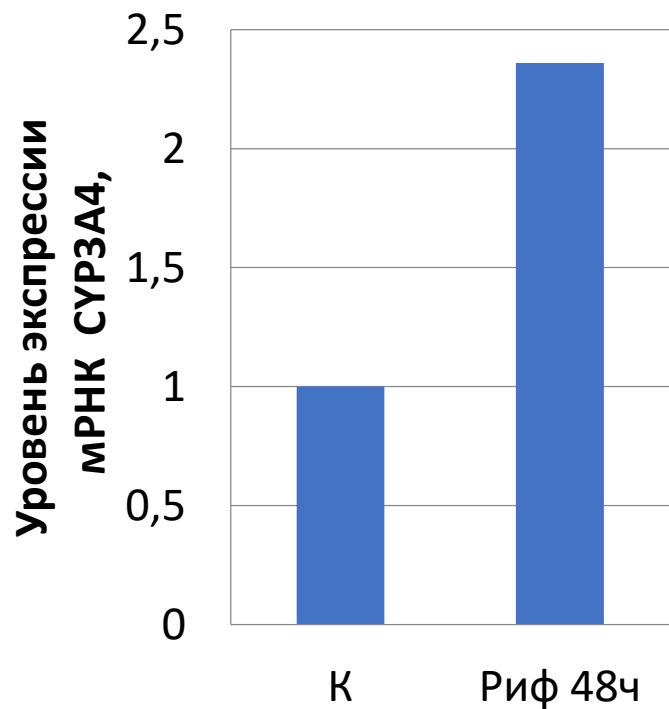


## Материалы и методы

- 1. Культивирование клеток:** модифицированная по Дульбекко среда Игла (DMEM; «Gibco», США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят («HyClone», США), 50 ед./мл гентамицина («ПанЭко», Россия) и 0,1 мг/мл пирувата натрия («Santa Cruz», США) при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и относительной влажности 80–85%. В экспериментах использовали культуры в логарифмической стадии.
- 2. Выделение тотальной РНК:** реагент «PureZOL» по протоколу рекомендованному производителем
- 3. Измерение концентрации РНК:** фотометр «NanoDrop» (Thermo Scientific, USA)
- 4. Реакция обратной транскрипции:** фермент RevertAid (Fermentas) по протоколу, рекомендованному производителем
- 5. Полимеразная цепная реакция:** начальная денатурация при 94°C в течение 2 мин; отжиг праймеров при 60 °C, 30 с; синтез продукта при 72°C, 30 с; заключительная выдержка после прохождения циклов: 5 мин при 72°C. Количество циклов варьировало в пределах 25—32 в зависимости от изучаемого гена. Нормирование экспрессии генов проводилось по  $\beta$ -actin в качестве гена "домашнего хозяйства".
- 6. Детекция ПЦР продуктов:** горизонтальный электрофорез в 2% агарозном геле на TBE-буфере. Электрофореграммы денсиметрировали. При анализе гелей использовали программу Scion Image 4.0.2.

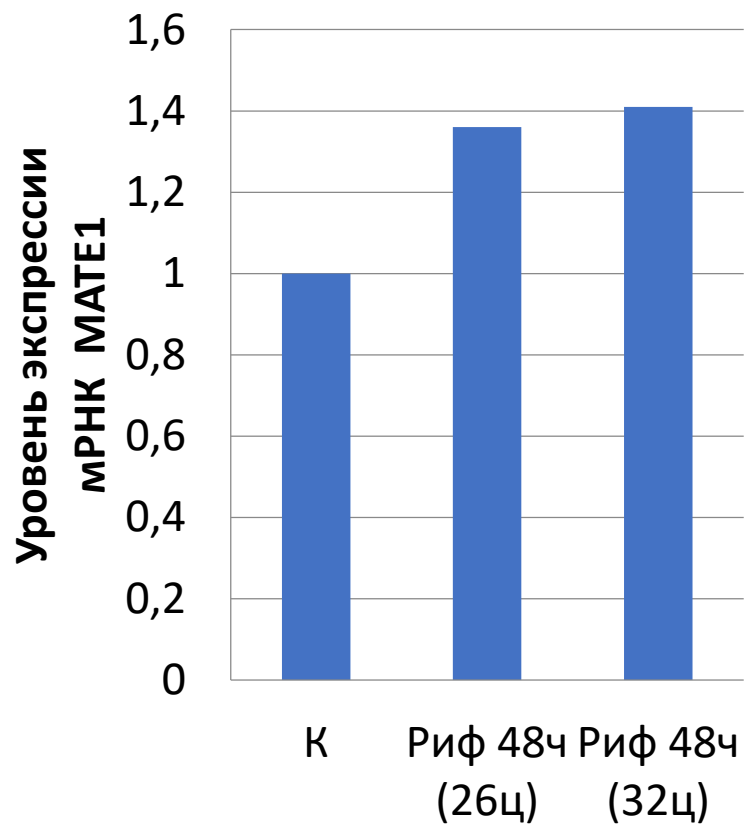


# Результаты

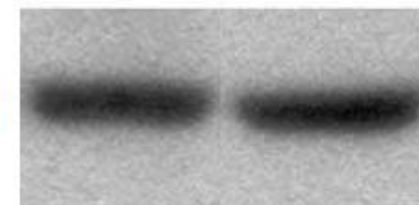




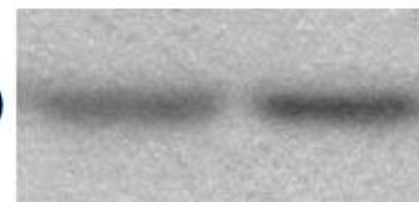
## Результаты



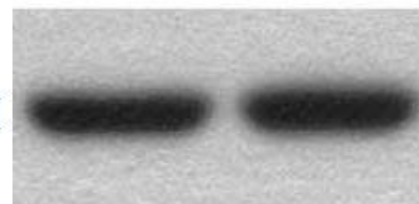
MATE1 (32ц)



MATE1 (26ц)



$\beta$ -актин

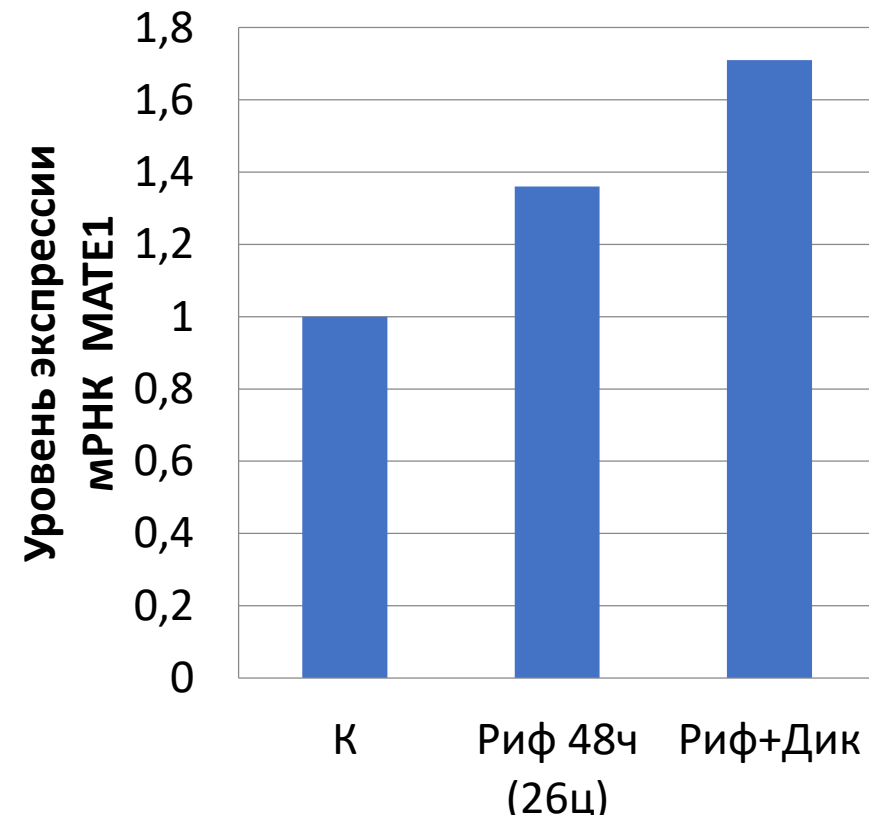
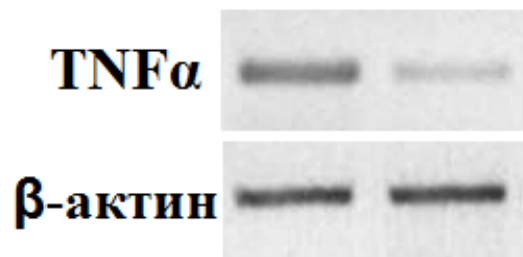
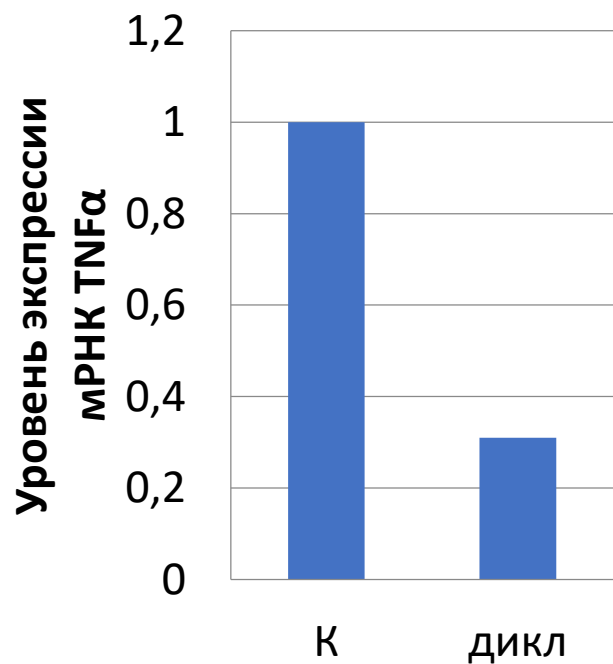


К

Риф



# Результаты





- 1. В регуляции экспрессии MATE-транспортеров в гепатоцитах по-видимому принимает участие система транскрипционных факторов «PXR-HNF4 $\alpha$ »**
- 2. Уровень экспрессии MATE-транспортеров в клеточной культуре HepG2 в среднем понижен из-за блокирования системы «PXR-HNF4 $\alpha$ » посредством TNF $\alpha$ .**
- 3. При блокировании TNF $\alpha$  с помощью НПВС происходит увеличение экспрессии MATE-транспортеров**

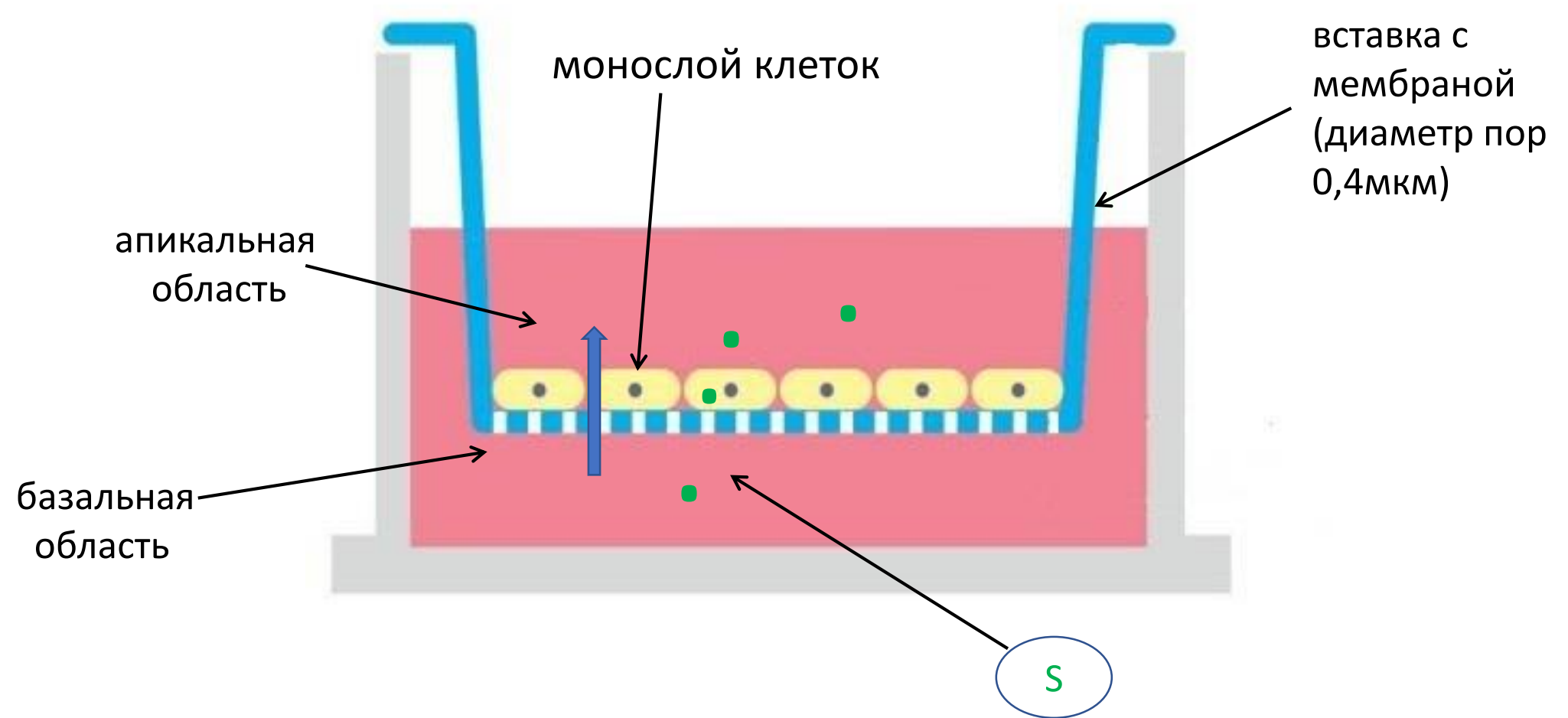




**Цель:** изучить функциональные характеристики транспортера OAT2 на модели клеточной линии HepG2 при использовании маркерного субстрата

## **Задачи:**

1. Культивирование клеток HepG2 на 12ти луночных плашках с мембранными вставками диаметром пор 0,4мкм (Costar, Transwell).
2. Добавление флуоресцентного маркера (флуоресцин) в базальную камеру на различные промежутки времени
3. Измерение концентрации маркеров в клетках
4. Оценка влияния ингибиторов OAT на транспорт





### **Условия культивирования**

Клеточные линии HepG2 выращивались на 12ти луночных плашках (Transwell®, Costar) до полного заполнения при 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Исследование проводилось на 4-6 пассажах. За сутки до эксперимента клетки были промыты PBS-буфером 2-3 раза (pH=7,4) и росли без добавления сыворотки.

### **Пробоподготовка**

Объем среды для апикального и базолатерального отделов составил 0,2 мл и 0,5 мл соответственно (чтобы избежать разности гидростатических давлений). За сутки до эксперимента клетки росли без добавления сыворотки. Перед исследованием транспорта клетки промывались PBS-буфером 2-3 раза (pH=7,4)



### **Транспорт флуоресцина**

Флуоресцеин в конечной концентрации  $1\mu\text{M}$  добавлялся в базолатеральный отдел на следующие промежутки времени: 20, 40, 60, 80, 100, 120сек. После этого клетки промывались 3-4 раза ледяным PBS-буфером для прекращения транспорта.

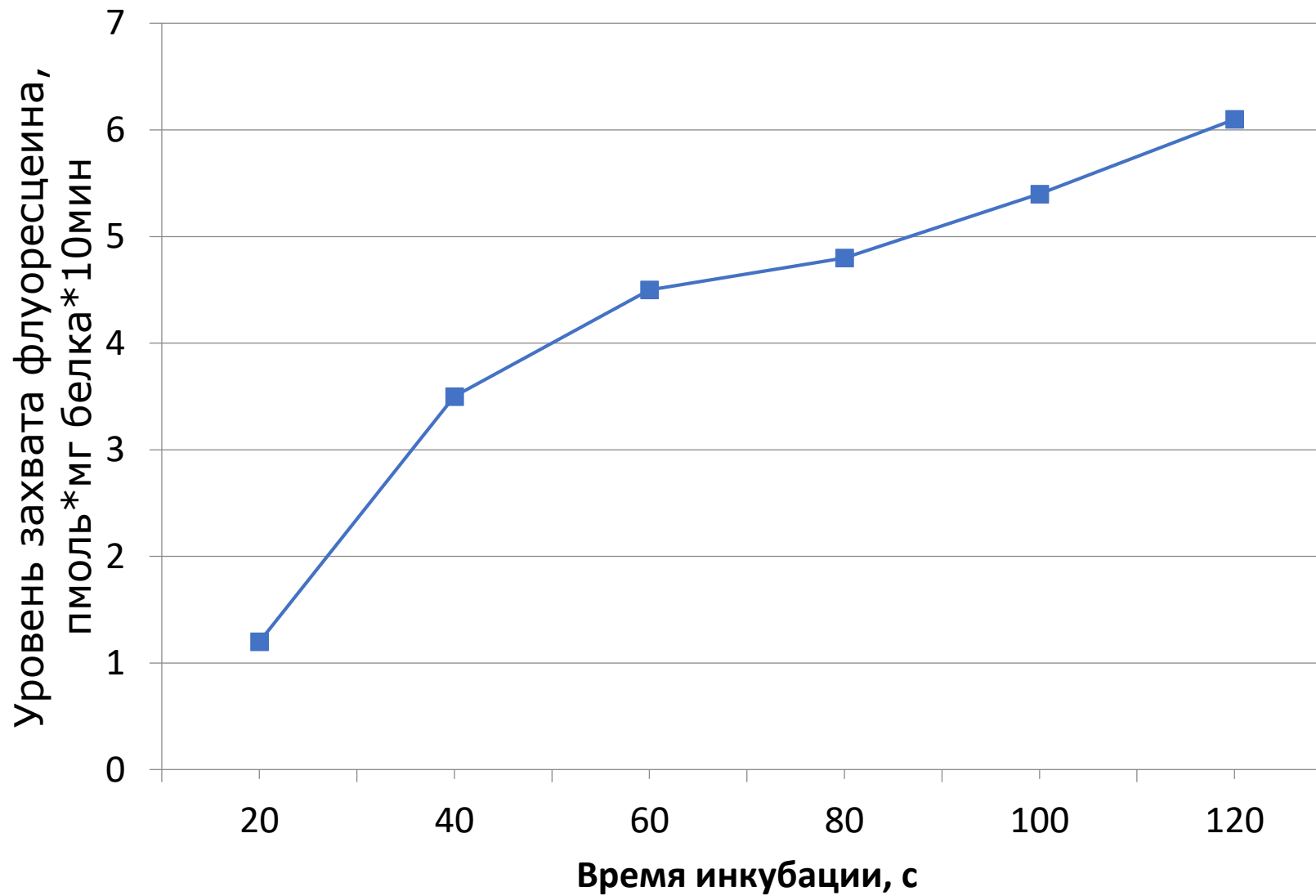
Также готовились отдельные концентрации флуоресцеина для опыта с о. В качестве ингибитора OAT2 использовался рифампицин в конечной концентрации  $50\mu\text{M}$

### **Определение концентрации флуоресцеина**

Клетки лизировали в 1 мл 0,1% Triton-X100 и флуоресценцию рассчитывали планшетном ридере «Chameleon V» («Hidex», Финляндия). Производилась корректировка на внеклеточное связывание и неспецифическую адгезию к клеткам путем вычитания количества флуоресцеина на клетки при  $4^{\circ}\text{C}$ . Нормализацию проводили по количеству общего белка. Количество белка измеряли спектрофотометрическим методом (по Брэтфорду).



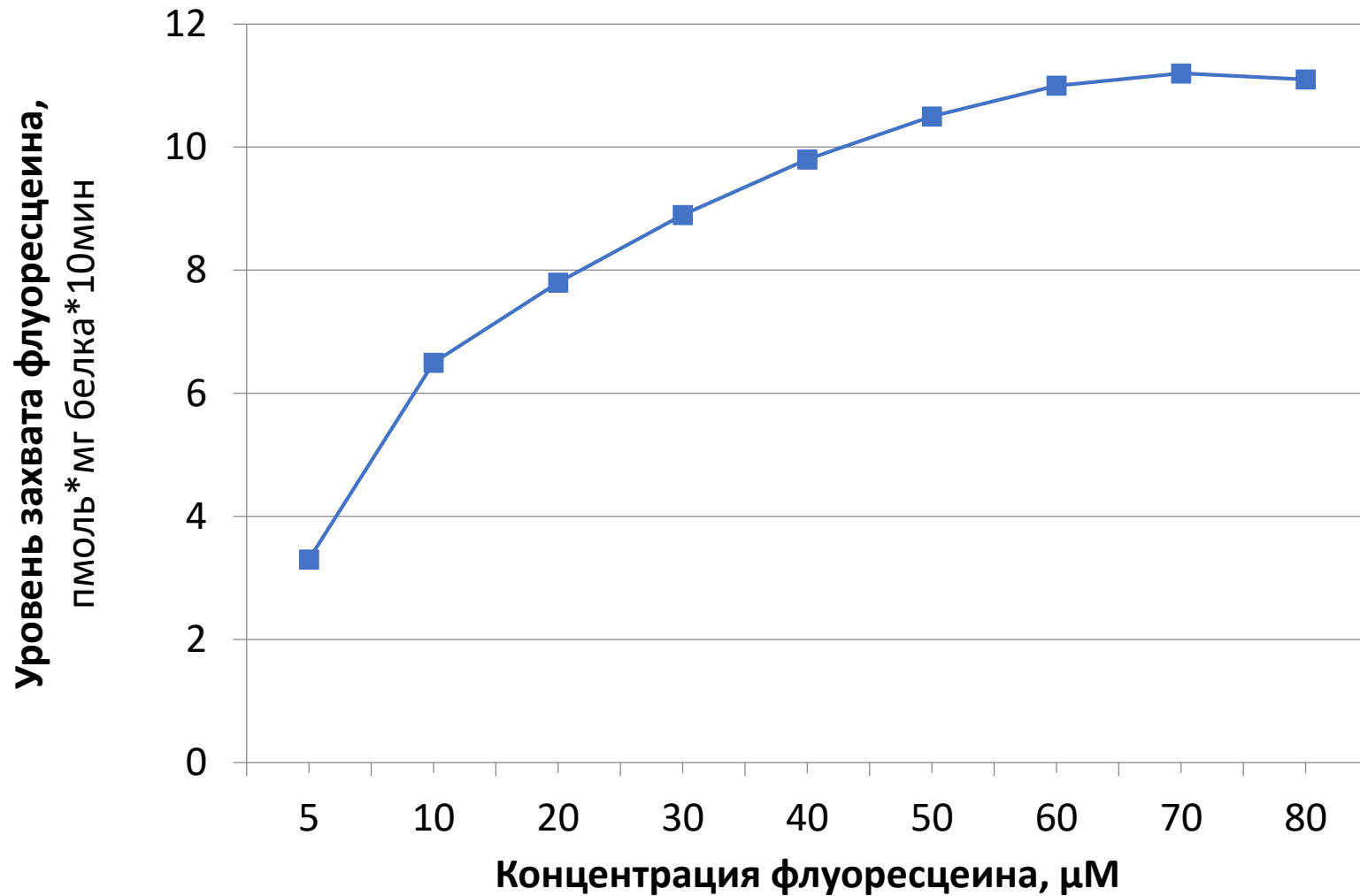
## Результаты





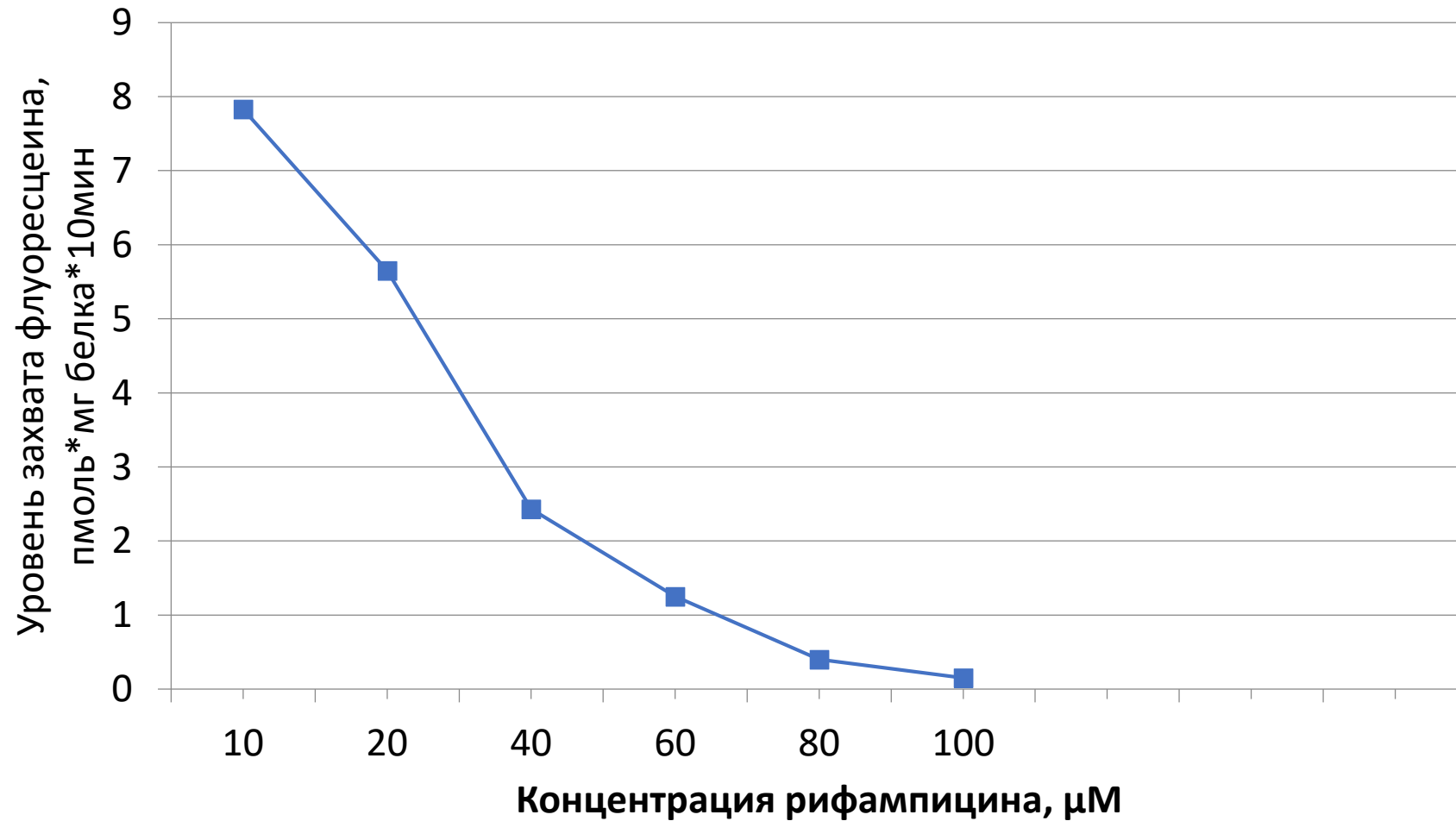


## Зависимость активности OAT2 от концентрации субстрата





## Влияние ингибитора OAT2 на транспорт флуоресцеина





## Выводы

1. Клеточная линия HepG2 подходит для определения транспорта ксенобиотиков с помощью культуральных вставок с проницаемой мембраной
2. Транспорт флуоресцеина с помощью OAT2 на модели клеточной линии HepG2 при определенной концентрации субстрата не коррелирует с уровнем экспрессии его гена. По-видимому, это связано с тем, что в транспорте флуоресцеина принимают участие и другие транспортеры, в частности OATP1B1.
3. Рифампицин снижает захват флуоресцеина за счет блокирования OAT2 (и, возможно, OATP1B1).



## Публикационная активность в I квартале 2019 года

Журнал «Фармация» направлена 1 статья

1. В.А. Евтеев, А.Б. Прокофьев, Н.Д. Бунятян, В.Г. Кукес

**МАТЕ-транспортеры: участие в фармакокинетике лекарственных средств и межлекарственных взаимодействиях.**

Журнал «Вестник НЦЭСМП» направлена статья:

2. О.А. Горошко, Л.М. Красных, В.Г. Кукес, В.И. Зозина

**Значение редокс-статуса коэнзима Q10 как биомаркера окислительного стресса.**

«Биофармацевтический журнал» направлена статья:

3. В.В. Смирнов, Г.В. Раменская, Л.М. Красных, О.О. Колоскова, В.И. Ковчина, И.П. Шиловский, М.Р.

Хаитов **Изучение фармакокинетики инновационного препарата для лечения ринита**

В 1 квартале опубликованы три научные статьи:

1. Сереброва С.Ю. и соавт **«Положения к алгоритму по ведению первичных необследованных пациентов с симптомами диспепсии на этапе первичной медико-санитарной помощи»** Журнал «Профилактическая медицина»

2. Сереброва С.Ю. и соавт **«Дискуссионные проблемы оценки качества воспроизведенных препаратов эзомепразола»** «Химико-фармацевтический журнал»

3. Сереброва С.Ю. и соавт **«Оптимальный выбор анальгетического и жаропонижающего препарата»** Журнал «Медицинский совет»



RegLek

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!**



научный центр  
экспертизы средств  
медицинского применения