

Экспериментальные модели клеточных линий для скрининга нефротоксичности

И. А. Мазеркина*, В. А. Евтеев, А. Б. Прокофьев, О. В. Муслимова, Е. Ю. Демченкова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Резюме. Цель работы — обзор клеточных моделей для экспериментальной оценки нефротоксичности ЛС *in vitro* по данным литературных источников. Нефротоксичность является причиной отказа от дальнейшей разработки нового лекарственного средства в 2% случаев по результатам доклинических исследований *in vivo* на лабораторных животных и в 19% — после исследований III фазы. Прогнозирование токсичности на клеточных моделях позволит сэкономить средства при разработке лекарственного средства, а также сократить/избежать исследований на лабораторных животных. В настоящее время не существует официальных международных рекомендаций по исследованию нефротоксичности *in vitro*, тема находится в интенсивной разработке. Основной мишенью токсического поражения почек являются эпителиальные клетки проксимальных канальцев, поэтому основные исследования направлены на создание клеточных линий, характеризующихся стабильными функциональными качествами этих клеток. При моделировании нефротоксичности также важным является выбор релевантных методов и конечных точек тестов, которые могли бы учитывать возможные механизмы токсического действия. В обзоре рассматриваются существующие линии эпителиальных клеток проксимального почечного канальца человека и современные методики оценки цитотоксичности. Дальнейшая перспектива разработки клеточных моделей для скрининга нефротоксичности — оптимизация и стандартизация систем *in vitro*, которые позволили бы на доклиническом этапе прогнозировать нефротоксичность лекарственного средства *in vivo*.
Ключевые слова: клеточные культуры; нефротоксичность *in vitro*; эпителиальные клетки проксимальных почечных канальцев; прогнозирование нефротоксичности

Для цитирования: Мазеркина ИА, Евтеев ВА, Прокофьев АБ, Муслимова ОВ, Демченкова ЕЮ. Экспериментальные модели клеточных линий для скрининга нефротоксичности. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2021;11(3):160–166. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-160-166>

* **Контактное лицо:** Мазеркина Ирина Анатольевна, mazerkina@expmed.ru

Experimental Cell Line Models for Nephrotoxicity Screening

I. A. Mazerkina*, V. A. Evteev, A. B. Prokofiev, O.V. Muslimova, E. Yu. Demchenkova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to review literature data on cell models for experimental assessment of drug nephrotoxicity *in vitro*. Because of nephrotoxicity, 2% of new investigational medicinal products are discarded at the stage of preclinical *in vivo* studies in laboratory animals, and 19%—after phase III clinical trials. Prediction of toxicity in cell models could make drug development more cost-effective and help to reduce/avoid animal testing. At present, there are no official international guidelines for assessment of nephrotoxicity *in vitro*, but there is a lot of research underway. The main toxicity target in kidneys is renal proximal tubule epithelial cells, therefore the main research is focused on the development of renal proximal tubule epithelial cell lines with stable functional characteristics. Another important aspect in nephrotoxicity modeling is the choice of relevant test methods and end points which would reflect potential toxicity mechanisms. The paper reviews existing human renal proximal tubule epithelial cell lines and current test methods for assessing cytotoxicity. Promising areas for future development of cell models for nephrotoxicity assessment— are optimisation and standardisation of *in vitro* systems that would help to make preclinical predictions of drug nephrotoxicity *in vivo*.

Key words: cell cultures; nephrotoxicity *in vitro*; renal proximal tubule epithelial cells; nephrotoxicity prediction

For citation: Mazerkina IA, Evteev VA, Prokofiev AB, Muslimova OV, Demchenkova EYu. Experimental cell line models for nephrotoxicity screening. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2021;11(3):160–166. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2021-11-160-166>

* **Corresponding author:** Irina A. Mazerkina, mazerkina@expmed.ru

Основная цель разработки клеточных моделей для изучения нефротоксичности лекарственных средств (ЛС) *in vitro* — создание систем, которые могли бы на доклиническом этапе прогнозировать возможность и условия развития нефротоксичности *in vivo*. Это актуально при изучении новых

ЛС, поскольку может сэкономить средства и остановить разработку токсичного ЛС на ранних этапах. Нефротоксичность является причиной отказа от дальнейшей разработки нового ЛС только в 2% случаев по результатам доклинических исследований *in vivo* на лабораторных животных и в 19% — после

исследований III фазы [1]. Исследования *in vivo* на лабораторных животных воспроизводят комплексность поражения почек при воздействии нефротоксических веществ, однако межвидовые фенотипические различия кровообращения, метаболизма, экспрессии транспортеров не всегда позволяют экстраполировать результаты исследований на человека [2]. Недостатком проведения исследований *in vivo* также является высокая себестоимость. Кроме того, в настоящее время большое внимание уделяется соблюдению этических принципов исследований в рамках концепции 3R (Reduction, Refinement, Replacement): уменьшение количества тестируемых животных, модификация методик, направленная на минимизацию страдания и стресса животных, и замена тестов на животных на исследования на волонтерах и модели *in vitro* и *in silico* [3]. Таким образом, в настоящее время являются актуальными разработка и совершенствование моделей для изучения лекарственной токсичности *in vitro*, достоинствами которых являются снижение стоимости исследований и соблюдение этических принципов.

Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) и Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) при разработке новых ЛС в случае выведения почками более 25% вещества рекомендуют проводить исследования *in vitro* для определения почечного транспорта посредством транспортеров органических анионов OAT1 и OAT3, однако не существует официально рекомендованных клеточных моделей для исследования нефротоксичности *in vitro*. Основным требованием, предъявляемым к клеточным системам при исследованиях *in vitro*, является наличие экспрессии тех же транспортеров, с которыми предполагается взаимодействие *in vivo*¹. Данный подход позволяет определить, является ли данное ЛС субстратом и/или ингибитором OAT, и прогнозировать возможность межлекарственного взаимодействия.

Развитие клеточного моделирования нефротоксичности ЛС включает несколько аспектов и направлений. С одной стороны, это создание и стандартизация клеточных культур, обладающих органоспецифичными и видоспецифичными свойствами зрелых почечных клеток человека. Другой важный аспект — это выбор информативных критериев оценки цитотоксичности ЛС с учетом его механизма действия.

Цель работы — обзор клеточных моделей, используемых при экспериментальной оценке нефротоксичности ЛС *in vitro*, по данным литературных источников.

КЛЕТЧНЫЕ ЛИНИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НЕФРОТОКСИЧНОСТИ

Поскольку основные транспортные и концентративные процессы происходят в проксимальном отделе почечных канальцев, в большинстве клеточных моделей нефротоксичности воспроизводится функция и свойства эпителиальных клеток проксимального отдела почечного канальца. Эпителиальные клетки дистальных почечных канальцев относятся к кубическому эпителию и образуют плотный слой с поляризацией на базолатеральную поверхность, контактирующую с интерстицием и кровью, и апикальную поверхность с щеточной каемкой со стороны просвета почечного канальца.

За канальцевую секрецию и реабсорбцию ЛС и многих экзогенных и эндогенных веществ отвечают экспрессированные в эпителиальных клетках проксимальных почечных канальцев трансмембранные белки-транспортеры. Транспортеры относятся к двум большим семействам: семейство транспортеров растворенных веществ (solute carrier transporters, SLC) и семейство аденозинтрифосфат-связывающих кассетных транспортеров (ATP-binding cassette transporters, ABC). Наличие мембранного клеточного потенциала обуславливает различие при переносе ионизированных молекул ЛС в клетку и из нее, поэтому в транспорте одного вещества участвует не менее двух транспортеров. В процессе канальцевой секреции транспортеры, расположенные на базолатеральной поверхности эпителиальных клеток, осуществляют захват ЛС в клетку из крови (инфлюкс), а транспортеры, расположенные на апикальной поверхности, — выброс ЛС из клетки в просвет канальца (эффлюкс) [4, 5]. Со стороны щеточной каемки располагаются белки-рецепторы мегалин и кубилин, которые участвуют в процессе обратного захвата путем эндоцитоза низкомолекулярных белков и некоторых ЛС [6]. Процесс транспорта против электрического градиента является энергозатратным и поэтому более чувствительным к ишемии [7]. Клетки эпителия проксимального почечного канальца характеризуются наличием большого количества митохондрий, которые не только обеспечивают энергозатратные процессы ресурсами, но также участвуют в активации апоптоза [8].

Необходимые свойства клеточных систем для исследования нефротоксичности

Методики, использующиеся при исследовании накопления ЛС внутри клетки или мембранных микропузырьков, подходят для оценки взаимодействия ЛС с транспортерами — это дает информацию о возможном межлекарственном взаимодействии на уровне транспортеров. Ингибирование почечных

¹ Guideline on the investigation of drug interactions. CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2**. EMA; 2012.

Clinical drug interaction studies — Cytochrome P450 enzyme and transporter-mediated drug interactions. Guidance for industry. FDA; 2020.

транспортёров может привести к накоплению ЛС в клетке [9] или интерстиции в токсичных дозах [10].

Определение прямого токсического действия на клетки, выращенные на плашках, для исследования органоспецифической токсичности малоинформативно. Z. Lin и соавт. провели масштабное исследование цитотоксичности с применением 273 гепатотоксичных, 191 кардиотоксичного и 85 нефротоксичных веществ на различных линиях клеток: 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, то есть прямое цитотоксическое воздействие на клетки само по себе не может оцениваться как органоспецифическое [11].

Для оценки нефротоксичности клетки должны обладать функциональными свойствами, максимально приближенными к таковым *in vivo*. Для комплексной оценки нефротоксичности видоспецифические клетки выращивают на специальных полупроницаемых мембранах в виде монослоя, добиваясь характерных плотных межклеточных связей, поляризации клеток на базолатеральную и апикальную поверхности. Для подтверждения валидности таких систем проводятся тесты по определению морфологических показателей: наличие плотных межклеточных связей, ресничек, а также по определению функциональных свойств: активность транспортёров, наличие обусловленного рецепторами мегалин/кубилиновой системы эндоцитоза, экспрессия и функция метаболических энзимов, продукция цитокинов, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аденозинтрифосфата (АТФ) и других маркеров. В некоторых случаях, например при выращивании клеток почечного эпителия из стволовых клеток, определяют маркеры, характеризующие их зрелость и принадлежность к почечному эпителию [12, 13].

Видо- и органоспецифичные клеточные линии для исследования нефротоксичности

Линии рекомбинантных клеток НЕК 293 (human embryonic kidney 293). Широко использовались для оценки взаимодействия ЛС с транспортёрами, однако поскольку в клетках НЕК 293 содержатся нейрональные маркеры, предполагается, что данные клетки не являются клетками почечного эпителия [14] и поэтому не подходят под категорию органоспецифичных клеток для исследования нефротоксичности.

Клетки НК-2 (human kidney-2). Были получены путем иммортализации с помощью генов вируса папилломы человека, при росте демонстрируют специфические маркеры эпителиальных клеток проксимальных почечных канальцев [15], однако для экспрессии некоторых транспортёров,

например ОАТ и транспортёров органических катионов (organic cation transporter, OCT), требуется их дополнительная трансфекция [16]. Также была показана слабая экспрессия мегалина — рецептора, который участвует в обратном захвате путем эндоцитоза аминокгликозидов. В результате клетки НК-2 оказались нечувствительны к токсическому действию гентамицина [17].

Первичные клетки проксимальных почечных канальцев человека НРТС (Human Proximal Tubular Cells). Получают непосредственно от доноров. В работе Y. Li и соавт. было показано преимущество использования первичных донорских клеток по сравнению с НК-2. Исследовались 41 ЛС с известной нефротоксичностью, и модель с использованием НРТС показала прогностическую ценность на уровне 76–85% [18]. В НРТС определяется экспрессия ОАТ, транспортёра органических катионов/карнитина 2 OCTN-2 (organic cation / carnitine transporter-2), белка, ассоциированного с множественной лекарственной устойчивостью (multidrug resistance-associated protein, MRP), Р-гликопротеина, белка резистентности рака молочной железы (breast cancer resistance protein, BCRP). Дополнительно в этих клетках экспрессированы различные метаболические ферменты: гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), гамма-глутамилцистеин синтетаза, глутатион-S-трансфераза и другие [19]. К недостаткам первичных донорских клеток относятся большая межиндивидуальная вариабельность, ограниченная способность к размножению и склонность к потере дифференцировки и потере экспрессии транспортёров при пассажах.

Клетки, подобные эпителиальным клеткам проксимального почечного канальца, полученные из стволовых клеток эмбриона человека (НРТС-like cells). Была разработана методика выращивания из эмбриональных клеток человека клеток, подобных клеткам проксимального почечного канальца [13], с которыми было проведено исследование токсичности 41 ЛС. При сравнении была отмечена более низкая по сравнению с НРТС чувствительность клеток, полученных из стволовых клеток, однако сохранялось преимущество по сравнению с линией НК-2. К недостаткам НРТС-like cells относится низкая экспрессия мегалина, следствием чего является ложноотрицательный результат на нефротоксичность с гентамицином. К достоинствам эпителиальных клеток, выращенных из стволовых клеток, можно отнести их большую доступность и сохранение свойств при пассажах [12].

Клетки проксимального канальца человека, иммортализованные с помощью человеческой обратной транскриптазы теломеразы RPTEC/TERT1 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT). Были получены M. Wieser и соавт. [20] и обладают морфологическими и функциональными характеристиками эпителиальных клеток проксимального канальца

человека, имея микроворсинки, плотные контакты, активность ГТТ, эндоцитоз, функционирующие транспортеры. Бессмертные RPTEC/TERT1 могут прожить не менее 90 удвоений популяции.

Условно иммортализованные эпителиальные клетки проксимальных почечных канальцев ciRPTEC (conditionally immortalized human proximal tubule cell). Клетки, полученные из мочи добровольцев с трансфекцией hTERT и чувствительного к температуре антигена SV40T, благодаря которому клетки размножаются при 33 °С и созревают при 37 °С [21]. 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 [22].

Псевдоиммортализованные первичные клетки эпителия проксимальных почечных канальцев человека SA7K. 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. 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 клеток предлагается также для исследования нефротоксичности при многократном лекарственном воздействии [23].

Влияние условий культивирования на функциональные свойства клеток

Существенную роль в изменении функциональных свойств клеток играют способы и условия их культивирования. Культивирование в виде монослоя на полупроницаемых мембранах (2.5D) позволило более точно оценить влияние захватывающих и поглощающих транспортеров на транспорт ксенобиотиков. Другое перспективное направление — симуляция напряжения сдвига потока, которое испытывают клетки со стороны потока жидкости в канальце в физиологических условиях. Осуществляется подобная симуляция различными способами, в том числе ротацией или покачиванием системы. Была показана связь напряжения сдвига потока с формированием ресничек и уровнем экспрессии некоторых транспортеров, усилением транспорта альбуминов мегалин/кубилиновой системой, реорганизацией актина и клеточного скелета [24]. Другое направление — выращивание трехмерных культур в специальных средах. Р. F. Secker и соавт. показали, что при выращивании клеток RPTEC/TERT1 в специальной среде формируются высоко дифференцированные стабильные

трубочки, у которых экспрессия транспортеров превосходила экспрессию в 2D-культуре [25]. Недостатком 3D-культур является их малая воспроизводимость и сложность стандартизации результатов оценки.

ОЦЕНКА НЕФРОТОКСИЧНОСТИ НА КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ

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 неодинаков у различных соединений.

Механизмы нефротоксичности

Мишенью для повреждения может стать любой из процессов, происходящих в эпителиальных клетках проксимального канальца: инфлюкс, эффлюкс, эндоцитоз, внутриклеточный метаболизм. Нефротоксичность некоторых ЛС может иметь одновременно несколько механизмов. Например, нефротоксичность цисплатина обусловлена повреждением митохондрий и клеточных ядер, активацией апоптоза, образованием активных форм кислорода и воспалением [26]. Еще один механизм токсичности — ингибирование транспортеров как частный случай межлекарственного взаимодействия. Ингибирование на уровне эффлюксных транспортеров может привести к токсическому накоплению вещества в эпителиальной клетке [9], если же ингибирование происходит на уровне инфлюксных транспортеров, токсические вещества могут накапливаться в интерстиции [10].

Конечные точки при оценке 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.

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 используются методики визуализации высокого разрешения, ядерно-магнитный резонанс, иммуноферментный анализ, гистохимические исследования и другие. Ниже кратко перечислены наиболее широко используемые.

Оценка жизнеспособности. Заключается в подсчете живых и мертвых клеток и вычислении доли живых клеток в общем количестве. 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, бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия), также используют флуоресцентные метаболические красители. Преимуществом выбора флуоресцентных красителей является возможность использования для регистрации результатов простого метода — флуориметрии [27, 28].

Оценка апоптоза. Определяются морфологические изменения клеток при апоптозе (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) [29].

Оценка изменения электрофизиологических показателей. Изменения электрофизиологических показателей, происходящие при нарушении целостности клеточного монослоя, определяются измерением трансэпителиального электрического сопротивления (transepithelial electrical resistance, TEER) [30] либо электрического импеданса [31] и характеризуют жизнеспособность клеток. Определение митохондриального мембранного потенциала — количественная оценка мембранного потенциала митохондрий с использованием флуоресценции для оценки нарушений целостности мембраны [32], поскольку это нарушение может быть результатом токсического воздействия.

Оценка метаболических изменений. Определение ЛДГ, выявление остаточного лактата [33], глутатион-S-трансферазы (GST) и др. [19]. Также проводят оценку оксидативного стресса путем определения активных форм кислорода [34].

Исследование транскриптома. Оценка изменения генной регуляции при воздействии токсических факторов. L. Aschauer и соавт. на клетках RPTEC/TERT1 изучали транскриптомные профили при повторяющемся воздействии известных нефротоксических веществ и гипоксии и показали, что изменение транскриптома, то есть регуляция генов, является специфичным показателем для некоторых нефротоксикантов [35].

Появились работы с определением *in vitro* биомаркеров острого почечного повреждения (ОПП), что является перспективным направлением ранней клинической диагностики этого состояния. В 2009 г. Консорциумом по тестовому прогнозированию безопасности (Predictive Safety Testing Consortium, PSTC) молекула почечного повреждения (kidney injury molecule-1, KIM-1), фактор трилистника 3 (urinary trefoil factor 3, TFF-3), бета-2 микроглобулин (urinary beta-2 microglobulin, B2M), цистатин С (CysC), альбумин мочи (uALB), общий белок мочи (uTP) и кластерин (CLU) были квалифицированы как маркеры первостепенной

важности для исследования почечного повреждения на крысах [36].

В исследовании Y. Li и соавт., изучавших нефротоксичность на первичных эпителиальных клетках проксимальных почечных канальцев, отмечалась исходно повышенная экспрессия мезенхимального маркера виментина (mesenchymal marker vimentin, VIM), 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 [18]. В недавнем исследовании X. Qiu и соавт. было изучено 18 биомаркеров почечного повреждения на клетках RPTEC/TERT1. Авторами показано повышение регуляции кластерина, цистатина С, GSTπ и тканевого ингибитора металлопротеиназ TIMP-1 при воздействии цисплатина, циклоспорина, аристолохиевой кислоты и гентамицина [37].

Таким образом, проводится постоянное совершенствование методик определения нефротоксичности *in vitro*. Улучшение характеристик клеточных систем и приближение их к физиологическим свойствам *in vivo* позволяет применять в исследованиях некоторые биомаркеры острого почечного повреждения и показатели, используемые в клинической медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конечная цель разработки моделей для оценки нефротоксичности *in vitro* — создание информативных, высокопроизводительных и хорошо воспроизводимых методик. Отмечается значительный прогресс в этом направлении: разработаны клеточные линии, длительно сохраняющие функции эпителиальной клетки проксимального почечного канальца, расширяется панель методик комплексной оценки токсического действия и методы биоинформатической оценки и прогноза. Вопросы стандартизации методик во многом решаются наличием банков клеточных культур и производством специальных тестовых систем. Дальнейшее накопление опыта в этой области позволит выйти на уровень рутинных исследований нефротоксичности *in vitro* и выявлять побочные эффекты ЛС на более ранних этапах, до исследований *in vivo*.

Вклад авторов. И. А. Мазеркина — анализ литературы, ответственность за все аспекты работы, надлежащее изучение и решение вопросов, связанных с достоверностью данных или целостностью всех частей статьи; В. А. Емеев — анализ и интерпретация результатов работы, критический пересмотр содержания; А. Б. Прокофьев — критический пересмотр содержания, утверждение окончательного варианта статьи для публикации; О. В. Муслимова — сбор данных литературы, участие в редактировании текста; Е. Ю. Демченкова — работа с источниками литературы, анализ данных.

Authors' contributions. *Irina A. Mazerkina*—analysis of scientific literature, overall responsibility for all aspects of the study, thorough assessment of data reliability and ensuring integrity of all parts of the paper; *Vladimir A. Evteev*—analysis and interpretation of the study results, review of the paper contents; *Aleksey B. Prokofiev*—review of the paper contents, approval of the final version of the paper for publication; *Olga V. Muslimova*—data collection, editing the text; *Elena Yu. Demchenkova*—literature review, analysis of data.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00005-21-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022400082-4).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00005-21-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400082-4).

Конфликт интересов. А. Б. Прокофьев является членом редакционной коллегии журнала «Ведомости НЦЭСМП», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Aleksey B. Prokofiev is a member of the Editorial Board of *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*, the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Redfern WS, Ewart L, Hammond TG, Bialecki R, Kinter L, Lindgren S, et al. Impact and frequency of different toxicities throughout the pharmaceutical life cycle. *Toxicologist*. 2010;114(S1):1081.
2. Zou L, Stecula A, Gupta A, Prasad B, Chien HC, Yee SW, et al. Molecular mechanisms for species differences in organic anion transporter 1, OAT1: implications for renal drug toxicity. *Mol Pharmacol*. 2018;94(1):689–99. <https://doi.org/10.1124/mol.117.111153>
3. Steimberg N, Bertero A, Chiono V, Dell'Era P, Di Angelantonio S, Hartung T, et al. iPS, organoids and 3D models as advanced tools for in vitro toxicology. *ALTEX*. 2020;37(1):136–40. <https://doi.org/10.14573/altex.1911071>
4. Nigam SK, Wu W, Bush KT, Hoenig MP, Blantz RC, Bhatnagar V. Handling of drugs, metabolites, and uremic toxins by kidney proximal tubule drug transporters. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(11):2039–49. <https://doi.org/10.2215/CJN.02440314>
5. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(3):215–36. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>
6. Eshbach ML, Weisz OA. Receptor-mediated endocytosis in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol*. 2017;79(1):425–48. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034234>
7. Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(10):629–46. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.107>
8. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kundendorf U, Krautwald S, Dong Z. Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(12):2689–701. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014030262>
9. Li Q, Guo D, Dong Z, Zhang W, Zhang L, Huang SM, et al. Ondansetron can enhance cisplatin-induced nephrotoxicity via inhibition of multiple toxin and extrusion proteins (MATEs). *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;273(1):100–9. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.08.024>
10. Zhou Y, Yang Y, Wang P, Wei M, Ma Y, Wu X. Adefovir accumulation and nephrotoxicity in renal interstitium: Role of organic anion transporters of kidney. *Life Sci*. 2019;224:41–50. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.03.042>
11. Lin Z, Will Y. Evaluation of drugs with specific organ toxicities in organ-specific cell lines. *Toxicol Sci*. 2012;126(1):114–27. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr339>
12. Li Y, Kandasamy K, Chuah JK, Lam YN, Toh WS, Oo ZY, Zink D. Identification of nephrotoxic compounds with embryonic stem-cell-derived human renal proximal tubular-like cells. *Mol Pharm*. 2014;11(7):1982–90. <https://doi.org/10.1021/mp400637s>
13. Narayanan K, Schumacher K, Tasnim F, Kandasamy K, Schumacher A, Ni M, et al. Human embryonic stem cells differentiate into functional renal proximal tubular-like cells. *Kidney Int*. 2013;83(4):593–603. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.442>
14. Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*. 2002;16(8):869–71. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0995fje>
15. Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int*. 1994;45(1):48–57. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.6>
16. Jenkinson SE, Chung GW, van Loon E, Bakar NS, Dalzell AM, Brown CDA. The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule. *Pflügers Arch*. 2012;464(6):601–11. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1163-2>
17. Wu Y, Connors D, Barber L, Jayachandra S, Hanumegowda UM, Adams SP. Multiplexed assay panel of cytotoxicity in HK-2 cells for detection of renal proximal tubule injury potential of compounds. *Toxicol In Vitro*. 2009;23(6):1170–8. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.003>
18. Li Y, Oo ZY, Chang SY, Huang P, Eng KG, Zeng JL, et al. An *in vitro* method for the prediction of renal proximal tubular toxicity in humans. *Toxicol Res*. 2013;2(5):352–65. <https://doi.org/10.1039/c3tx50042j>
19. Lash LH, Putt DA, Cai H. Drug metabolism enzyme expression and activity in primary cultures of human proximal tubular cells. *Toxicology*. 2008;244(1):56–65. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.10.022>
20. Wieser M, Stadler G, Jennings P, Streubel B, Pfaller W, Ambros P, et al. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(5):F1365–75. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90405.2008>
21. Wilmer MJ, Saleem MA, Masereeuw R, Ni L, van der Velden TJ, Russel FG, et al. Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters. *Cell Tissue Res*. 2010;339(2):449–57. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0882-y>
22. Nieskens T, Peters J, Schreurs M, Smits N, Woestenenk R, Jansen K, 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(2):465–75. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-9871-8>
23. Li S, Zhao J, Huang R, Steiner T, Bourner M, Mitchell M, et al. Development and application of human renal proximal tubule epithelial cells for assessment of compound toxicity. *Curr Chem Genom Transl Med*. 2017;11:19–30. <https://doi.org/10.2174/2213988501711010019>
24. Birdsall H, Hammond T. Role of shear stress on renal proximal tubular cells for nephrotoxicity assays. *J Toxicol*. 2021;2021:6643324. <https://doi.org/10.1155/2021/6643324>
25. Secker PF, Luks L, Schlichenmaier N, Dietrich DR. RPTEC/TERT1 cells form highly differentiated tubules when cultured in a 3D matrix. *ALTEX*. 2018;35(2):223–34. <https://doi.org/10.14573/altex.1710181>
26. Bernal-Barquero CE, Vazquez-Zapien GJ, Mata-Miranda MM. Revisión de las alteraciones en la expresión génica y vías apoptóticas provocadas en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. *Nefrología*. 2019;39:362–71. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2018.11.012>
27. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*. 2011;740:1–6. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
28. Трусов ГА, Чапленко АА, Семенова ИС, Мельникова ЕВ, Олфир ЮВ. Применение проточной цитометрии для оценки качества биомедицинских клеточных продуктов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(1):16–24. [Trusov GA, Chaplenko AA, Semenova IS, Melnikova EV, Olefir YuV. Use of flow cytometry for quality evaluation of biomedical cell products. *BIO-preparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(1):16–24 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-1-16-24>

29. Camaño S, Lazaro A, Moreno-Gordaliza E, Torre AM, de Lucas C, Humanes B, et al. Cilastatin attenuates cisplatin-induced proximal tubular cell damage. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;334(2):419–29. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.165779>
30. 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;144(5):509–15. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1351-1>
31. Ke N, Wang X, Xu X, Abassi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol*. 2011;740:33–43. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_6
32. Sakamuru S, Attene-Ramos MS, Xia M. Mitochondrial membrane potential assay. *Methods Mol Biol*. 2016;1473:17–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6346-1_2
33. Limonciel A, Aschauer L, Wilmes A, Prajczek S, Leonard MO, Pfaller W, 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;25(8):1855–62. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.05.018>
34. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21(7):363–83. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
35. Aschauer L, Limonciel A, Wilmes A, Stanzel S, Kopp-Schneider A, Hewitt P, et al. Application of RPTEC/TERT1 cells for investigation of repeat dose nephrotoxicity: A transcriptomic study. *Toxicol In Vitro*. 2015;30(1 Pt A):106–16. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.10.005>
36. Dieterle F, Sistare F, Goodsaid F, Papaluca M, Ozer JS, Webb CP, et al. Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nat Biotechnol*. 2010;28(5):455–62. <https://doi.org/10.1038/nbt.1625>
37. Qiu X, Miao Y, Geng X, Zhou X, Li B. Evaluation of biomarkers for in vitro prediction of drug-induced nephrotoxicity in RPTEC/TERT1 cells. *Toxicol Res (Camb)*. 2020;9(2):91–100. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa005>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Мазеркина Ирина Анатольевна, канд. мед. наук. *Irina A. Mazerkina*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3733-6822>

Евтеев Владимир Александрович. *Vladimir A. Evteev*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-6150-5796>

Прокофьев Алексей Борисович, д-р мед. наук. *Aleksey B. Prokofiev*, Dr. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7024-5546>

Муслимова Ольга Валерьевна, канд. мед. наук. *Olga V. Muslimova*, Cand. Sci. (Med.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1009-9609>

Демченкова Елена Юрьевна, канд. фарм. наук. *Elena Yu. Demchenkova*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1972-4386>

Статья поступила 29.06.2021

После доработки 09.08.2021

Принята к печати 20.09.2021

Article was received 29 June 2021

Revised 9 August 2021

Accepted for publication 20 September 2021

АКТУАЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Совет Евразийской экономической комиссии предложил внести изменения в утвержденные Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения (далее — Правила). Соответствующее решение Совета Евразийской экономической комиссии проходит процедуру общественного обсуждения. С принятием этого документа будет расширен доступ пациентов к незарегистрированным лекарственным препаратам при угрозах возникновения чрезвычайных ситуаций, а также к группам лекарственных средств высокотехнологической терапии, orphanным препаратам. В частности, предлагается сократить сроки рассмотрения регистрационных досье при проведении процедуры взаимного признания и обеспечения возможности внесения изменений в досье в процессе его экспертизы государством признания. Также появится возможность подачи документов на регистрацию лекарственных средств в дистанционном режиме в условиях эпидемиологических ограничений.

Предлагается дополнить раздел об установлении пострегистрационных мер Правил специальными процедурами и приложениями по регистрации лекарственных препаратов в исключительных случаях, условной регистрации и ускоренной экспертизе. Также планируется расширить условия доступа ввозимых в государство — член Союза незарегистрированных лекарственных препаратов для оказания медицинской помощи по жизненным показаниям конкретного пациента либо оказания медицинской помощи ограниченному контингенту пациентов с редкой или особо тяжелой патологией.

Публикуется по: Е. Сидорова. Совет ЕЭК предложил сократить сроки рассмотрения регистрационных досье лекарств. *Фармацевтический вестник* от 16 августа 2021¹.

¹ <https://pharmvestnik.ru/content/news/Sovet-EEK-predlozil-sokratit-sroki-rassmotreniya-registracionnyh-dose-lekarstv.html>