

# Изучение нефротоксичности антибактериальных ЛС на клеточной линии RPTEC

\*В. А. ЕВТЕЕВ<sup>1</sup>, И. С. СЕМЕНОВА<sup>1</sup>, Н. Д. БУНЯТЯН<sup>1,2</sup>,  
А. Б. ПРОКОФЬЕВ<sup>1,2</sup>, В. Г. КУКЕС<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» МЗ РФ (Сеченовский университет), Москва, Россия

## Study of Antibacterial Drugs' Nephrotoxicity in the RPTEC Cell Line

\*VLADIMIR A. EVTEEV<sup>1</sup>, IRINA S. SEMENOVA<sup>1</sup>, NATALYA D. BUNYATYAN<sup>1,2</sup>,  
ALEKSEY B. PROKOFIEV<sup>1,2</sup>, VLADIMIR G. KUKES<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia

<sup>2</sup> I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

### Резюме

Созданная клеточная линия человека RPTEC/TERT1 показала максимальное соответствие с первичными человеческими проксимальными почечными канальцами, что делает оптимальным её использование для исследований нефротоксических свойств ксенобиотиков. Измерение трансэпителиального сопротивления (TEER) является ценным неинвазивным методом, который может быть применён для количественной оценки целостности барьера клеток на различных стадиях их роста и дифференцировки, для прогнозирования токсичности и проницаемости лекарственных средств. *Цель исследования* — изучить динамику изменения трансэпителиального сопротивления на модели клеточной линии RPTEC/TERT1 при инкубации с ЛС, обладающими нефротоксическим действием. *Материал и методы.* Клеточная линия проксимальных почечных канальцев человека RPTEC/TERT была получена из банка культур клеток АТСС. В эксперименте использовались клетки 14-го пассажа. Изучались следующие препараты: цисплатин — 2,5 мкг/мл; ванкомицин — 50 мкг/мл; дорипенем — 20 мкг/мл; цефепим — 150 мкг/мл. Для каждой концентрации препарата в эксперименте выполнялось 4–5 повторов. Измерения TEER проводились 4–5 раз для каждой лунки. *Результаты.* Цисплатин, ванкомицин, дорипенем, цефепим в применяемых концентрациях не оказывают цитотоксического действия на клеточную линию RPTEC по данным динамики TEER.

**Ключевые слова:** антибиотики; клеточные линии; нефротоксичность, трансэпителиальное сопротивление

**Для цитирования:** Евтеев В.А., Семенова И.С., Бунятян Н.Д., Прокофьев А.Б., Кукес В.Г. Изучение нефротоксичности антибактериальных ЛС на клеточной линии RPTEC. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68 (9–10): 42–45. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-42-45>.

### Abstract

The created cell line of human proximal renal tubules RPTEC/TERT1 showed maximum compliance with primary human RPTEC, which makes it optimal for use in studies of the nephrotoxic properties of xenobiotics. Transepithelial resistance measurement (TEER) is a valuable non-invasive method that can be used to quantify the integrity of the cell barrier at various stages of cell growth and differentiation, as well as to predict the toxicity and permeability of drugs. *The aim of the study* was to examine the dynamics of changes in transepithelial resistance in the model of the RPTEC/TERT1 cell line during incubation with drugs with nephrotoxic effects. *Material and methods.* The human proximal renal tubule cell line RPTEC/TERT was obtained from the ATCC cell culture bank. Cells at passage 14 were used in the experiment. The following drugs were studied: cisplatin: 2.5 mcg/ml; vancomycin: 50 mcg/ml; doripenem — 20mcg/ml; cefepim — 150mcg/ml. 4–5 repetitions were performed for each concentration of the drug in the experiment. THEER measurements were carried out 4–5 times for each well. *Results.* Cisplatin, vancomycin, doripenem, and cefepim in the concentrations used do not show a cytotoxic effect on the RPTEC cell line according to TEER dynamics.

**Keywords:** antibiotics; cell lines; nephrotoxicity, transepithelial resistance

**For citation:** Evteev V. A., Semenova I. S., Bunyatyan N. D., Prokofiev A. B., Kukes V. G. Study of antibacterial drugs' nephrotoxicity in the RPTEC cell line. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2023; 68 (9–10): 42–45. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-42-45>.

© Коллектив авторов, 2023

\*Адрес для корреспонденции: Петровский б-р, д. 8, стр. 2, НЦЭСМП, г. Москва, Россия, 127051.  
E-mail: evteev@expmed.ru

© Team of Authors, 2023

\*Correspondence to: 8/2 Petrovsky Blvd., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051 Russia.  
E-mail: evteev@expmed.ru

## Введение

В настоящее время клеточные линии эпителия проксимальных почечных канальцев широко используются в качестве экспериментальной модели для исследования нефротоксических свойств не только при разработке новых лекарственных препаратов (ЛП), но и для коррекции фармакотерапии использующихся ЛП в клинической практике. Клеточная линия RPTEC/TERT1 была создана путём иммортализации первичных клеток проксимальных почечных канальцев человека (RPTEC) посредством трансфекции гена субъединицы теломеразы (TERT1). Последующий анализ экспрессии генов специфических транспортёров и метаболических ферментов не выявил значимых различий клеток RPTEC/TERT1 с первичными человеческими RPTEC [1].

Значение трансэпителиального сопротивления (TEER — Transepithelial electrical resistance) является одним из основных показателей, отражающим образование плотных межклеточных контактов в монослое эпителиальных клеточных линий (парацеллюлярное сопротивление), что особенно важно для клеток, выполняющих барьерную и транспортную функцию [2]. TEER является хорошо зарекомендовавшим себя методом, отражающим функциональную активность и уровень дифференцировки клеток эпителия.

Измерение TEER является ценным неинвазивным методом, который может быть применён для количественной оценки целостности монослоя клеток на различных стадиях их роста и дифференцировки, для прогнозирования токсичности и проницаемости клеток для лекарственных средств на ранних стадиях разработки лекарств [3]. Однако возможности его использования при оценке нефротоксических свойств ксенобиотиков, в том числе ЛС, ещё не до конца исследована.

Цель работы — изучить динамику изменения трансэпителиального сопротивления на модели клеточной линии RPTEC/TERT1 при инкубации с ЛС, обладающими нефротоксическим действием.

В данной работе было исследовано влияние нефротоксических ЛС на показатель TEER на модели клеточной линии эпителия проксимальных почечных канальцев RPTEC/TERT1. В качестве ксенобиотиков использовались лекарственные препараты с доказанными нефротоксическими свойствами: ванкомицин и цисплатин [4]. Кроме того, использовались бета-лактамы антибиотиков — цефепим [5] и дорипенем [6], для которых в некоторых исследованиях отмечены нефротоксические свойства.

В ходе исследования решались следующие задачи: восстановление и культивирование клеточной линии RPTEC в 24-луночных планшетах «Transwell» с мембранными вставками с диамет-

ром пор 0,4 мкм; измерение показателя трансэпителиального сопротивления до значений, свидетельствующих об образовании плотного монослоя; инкубация RPTEC с ЛС, обладающими нефротоксическим действием; оценка влияния на показатель трансэпителиального сопротивления в клеточной линии RPTEC.

## Материал и методы

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

Восстановление клеточной линии производилось по следующей методике: во флакон с 10 мл среды DMEM F12 объёмом 25 см<sup>2</sup> добавляли культуру клеток, рекомбинантный человеческий фактор роста EGF — 10 нг/мл, трансферрин — 5 мкг/мл, инсулин — 5 мкг/мл, гидрокортизон — 25 нг/мл, селенит натрия — 8,65 нг/мл, затем помещали в инкубатор на 15–20 мин для достижения нормального pH (7,0–7,6). Пробирку с клетками размораживали на водяной бане в течение 2 мин при температуре 37°C. После размораживания флакон обрабатывали 70% этанолом и далее работали в асептических условиях. Содержимое пробирки переносили в пробирку центрифуги, содержащую 9,0 мл культуральной среды и центрифугировали при 250 g 5–7 мин. Супернатант удаляли и ресуспендировали клетки в свежей среде. Полученную суспензию переносили в культуральный флакон. Условия культивирования стандартные: 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В эксперименте использовались клетки 14-го пассажа.

**Культивирование.** 12-й пассаж клеток RPTEC культивировали в 24-луночных планшетах Costar «Transwell» с мембранными вставками с диаметром пор 0,4 мкм. Посевная концентрация 45×10<sup>3</sup> кл/см<sup>2</sup>. Количество клеток в каждой лунке составляло примерно 0,2×10<sup>6</sup>. 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% CO<sub>2</sub> и относительной влажности 80–85%. В среду добавляли инсулин — 5 мкг/мл, трансферрин — 5 мкг/мл, селенит натрия — 5 мкг/мл, hEGF — 10 нг/мл, гидрокортизон — 25 нг/мл. Среду меняли через каждые 2–3 дня. Объём культуральной среды в апикальном отделе — 0,1 мл, в базолатеральном — 0,6 мл.

**Трансэпителиальное сопротивление.** Измерение проводилось на приборе «ERS-2» («Millipore», США) с помощью электрода «MERSSTX01» («Millipore», США). Измерение проводилось на 5-й день после посева клеток в культуральный планшет один раз в сутки на протяжении 14 сут (кроме выходных дней). Расчёт TEER проводился по формуле:  $TEER = (R_{TOTAL(\Omega)} - R_{BLANK(\Omega)}) \times R_{AREA}(cm^2)$ , где  $R_{TOTAL(\Omega)}$  — сопротивление лунки с монослоем клеток, Ом;  $R_{BLANK(\Omega)}$  — сопротивление пустой лунки, Ом;  $R_{AREA}$  — площадь мембраны, см<sup>2</sup> [3].

**Лекарственные препараты.** Для оценки влияния нефротоксических ЛС на показатель TEER в клеточной линии RPTEC использовались следующие препараты: цисплатин — 2,5 мкг/мл; ванкомицин — 50 мкг/мл; дорипенем — 20 мкг/мл; цефепим — 150 мкг/мл (рис. 1). Цисплатин в нетоксической концентрации использовали в качестве классического нефротоксического лекарственного препарата, который обладает первичной токсичностью для проксимальных почечных канальцев [7]. Концентрация антибиотиков соответствовала их концентрации при назначении в средних терапевтических дозах. Для каждой концентрации препарата в эксперименте выполнялось 4–5 повторов. Стоконый раствор препаратов (100:1) добавляли в базальную камеру 24-луночного планшета Corning Transwell. Измерения TEER проводились 5 раз для каждой лунки.

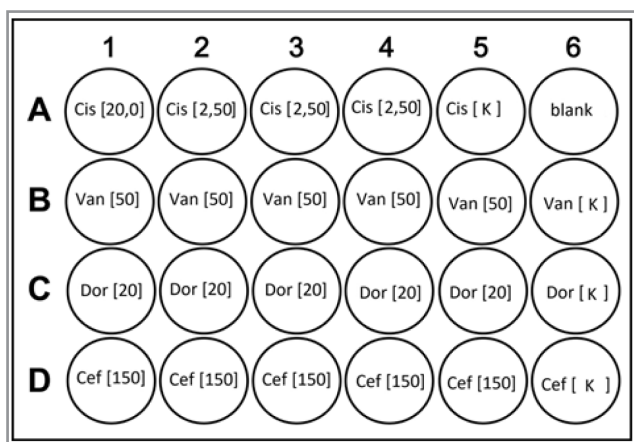


Рис. 1. Схема эксперимента по транспорту.

**Примечание.** Здесь и на рис. 2: Cis — цисплатин; Dor — дорипенем; Cef — цефепим; blank — лунка не содержащая клеток; K — отрицательный контроль. В квадратных скобках указаны конечные концентрации препаратов в культуральной среде в мкг/мл.

**Fig. 1. Transport experiment scheme.**  
**Note.** Cis — cisplatin; Dor — doripenem; Cef — cefepime; blank — well that does not contain cells; K — negative control. The final concentrations of drugs in the culture medium in  $\mu\text{g/ml}$  are indicated in square brackets.

## Результаты и обсуждение

Изменение трансэпителиального сопротивления в монослое клеточной линии RPTEC при инкубации с ЛС показано на рис. 2.

Показатель трансэпителиального сопротивления клеточной линии RPTEC достигает пороговых значений примерно за 2 нед. после посева. Значения TEER ( $280\text{--}320 \text{ Ом}\times\text{см}^2$ ) изучаемого клона RPTEC отличаются от данных в других источниках, но попадают в диапазон значений для данной клеточной линии ( $100\text{--}600 \text{ Ом}\times\text{см}^2$ ) [8].

Первые 3 сут инкубации отмечалось увеличение TEER при культивировании со всеми препаратами. На 4-е сутки инкубации у всех ЛП отмечалось снижение TEER на  $15\text{--}20 \text{ Ом}\times\text{см}^2$ . На 8-е сутки инкубации зафиксирован рост TEER, что может быть связано с выведением ЛП из клеток, что привело к прекращению их действия на межклеточные контакты. Подобный эффект был зафиксирован в работе L. Aschauer и соавт. [9].

Ни одно из тестируемых соединений не вызывало снижения TEER в концентрациях, считающихся нецитотоксичными.

## Выводы

1. Результаты измерения значений TEER находятся в диапазоне, соответствующем данной клеточной линии, согласно данным литературы.

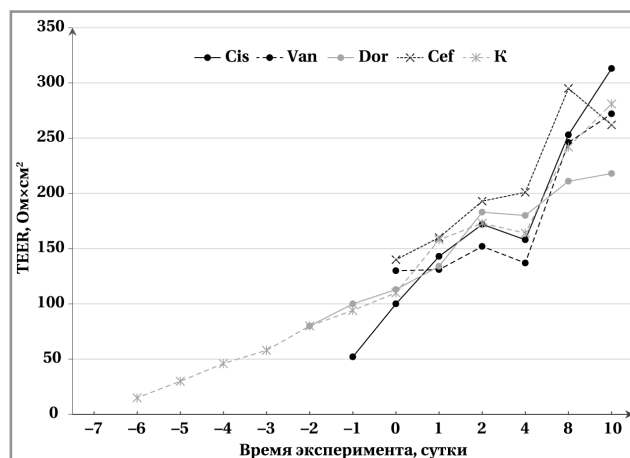


Рис. 2. Трансэпителиальное сопротивление клеточной линии RPTEC при инкубации с препаратами.

**Примечание.** Данные представлены в формате  $M\pm SD$  (среднее  $\pm$  стандартное отклонение, данные 5 экспериментов); \* — уровень значимости  $p<0,05$ .

**Fig. 2. Transepithelial resistance of the RPTEC cell line during incubation with drugs.**

**Note.** Cis — cisplatin; Dor — doripenem; Cef — cefepime; blank — a well that does not contain cells; K — negative control. Data are presented in  $M\pm SD$  format (mean  $\pm$  standard deviation, data from 5 experiments); \* — significance level  $P<0.05$

2. Цисплатин в концентрациях 2,5 мкМ на изучаемом клоне RPTEC не оказывает нефротоксического эффекта

3. Ванкомицин хотя и понижает значение TEER в монослое RPTEC, тем не менее за 6 сут инкубации оно не достигает критических значений, соответствующих токсическому действию.

4. Цефепим и дорипенем в концентрациях, соответствующих среднетерапевтическим дозам препаратов, не оказывает нефротоксического эффекта.

## Дополнительная информация

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учёта НИР 121022400082-4).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Вклад авторов.** В. А. Евтеев — идея и дизайн эксперимента, измерение TEER; И. С. Семенова — культивирование клеточных линий RPTEC, инкубация клеток с лекарственными препаратами; Н. Д. Бунятян — систематизация и анализ данных литературы, критический пересмотр текста статьи; А. Б. Прокофьев, В. Г. Кукес — руководство и общий контроль над экспериментом.



## Литература/References

1. 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. Epub 2008 Aug 20. PMID: 18715936.
2. Anderson J.M. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci.* 2001; 16: 126–130. doi: 10.1152/physiolonline.2001.16.3.126.
3. Srinivasan B., Kolli A.R., Esch M.B. *et al.* TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom.* 2015 Apr; 20 (2): 107–126. doi: 10.1177/2211068214561025.
4. Tiong H.Y., Huang P., Sijing X., Li Y. *et al.* Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical in vitro models. *Mol Pharm.* 2014; 11 (7): 1933–1948. doi: 10.1021/mp400720w.
5. Mac K., Chavada R., Paull S. *et al.* Cefepime induced acute interstitial nephritis — a case report. *BMC Nephrol.* 2015; 16, 15. doi: 10.1186/s12882-015-0004-x.
6. 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. doi: 10.1177/2042098615622330.
7. Secker P.F., Schlichenmaier N., Beilmann M. *et al.* Functional transepithelial transport measurements to detect nephrotoxicity in vitro using the RPTEC/TERT1 cell line. *Arch Toxicol.* 2019; 93: 1965–1978. doi: 10.1007/s00204-019-02469-8.
8. Wilmer M.J., Ng C.P., Lanz H.L., Vulto P., Suter-Dick L., Masereeuw R., Kidney-on-a-chip technology for drug-induced nephrotoxicity screening. *Trends Biotechnol.* 2016; 34 (2): 156–170. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.11.001.
9. 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; 30 (1 PtA): 106–116. doi: 10.1016/j.tiv.2014.

## Информация об авторах

*Евтеев Владимир Александрович* — старший аналитик Научного отдела клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6150-5796. ResearcherID: E-1204-2017. eLIBRARY SPIN-код: 3347-0189. Scopus Author ID: 16230318000

*Семенова Ирина Семеновна* — к. б. н., главный эксперт лаборатории биомедицинских клеточных продуктов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-9026-0508.

*Бунятян Наталья Дмитриевна* — д. м. н., профессор, ведущий научный сотрудник Научного отдела клинической фармакологии «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России; заведующая кафедрой фармацевтической технологии и фармакологии Первого московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0003-0936-5551. ResearcherID: D-3071-2018. eLIBRARY SPIN-код: 9853-1232. Scopus Author ID: 6506018057

*Прокофьев Алексей Борисович* — д. м. н., профессор, начальник научного отдела клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России; профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Первого московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0001-7024-5546. ResearcherID: D-D-2961-2018. eLIBRARY SPIN-код: 1003-0672. Scopus Author ID: 57189082881

*Кукес Владимир Григорьевич* — д. м. н., профессор, академик РАН, главный научный сотрудник Научного отдела клинической фармакологии «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5112-6928. ResearcherID: D-3908-2018. eLIBRARY SPIN-код: 8498-3521. Scopus Author ID: 7005152932

## About the authors

*Vladimir A. Evteev* — Senior analyst of the Scientific Department of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6150-5796. ResearcherID: E-1204-2017. eLIBRARY SPIN: 3347-0189. Scopus Author ID: 16230318000

*Irina S. Semenova* — Ph. D. in Biology, Chief Expert of the Laboratory of Biomedical Cell Products, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-9026-0508.

*Natalya D. Bunyatyan* — D. Sc. in Medicine, Professor, Leading Researcher of the Scientific Department of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation; Head of the Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0003-0936-5551. ResearcherID: D-3071-2018. eLIBRARY SPIN code: 9853-1232. Scopus Author ID: 6506018057

*Aleksey B. Prokofiev* — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Scientific Department of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation; Professor of the Department of Clinical Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0001-7024-5546. ResearcherID: D-D-2961-2018. eLIBRARY SPIN code: 1003-0672. Scopus Author ID: 57189082881

*Vladimir G. Kukes* — D. Sc. in Medicine, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher of the Scientific Department of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-5112-6928. ResearcherID: D-3908-2018. eLIBRARY SPIN code: 8498-3521. Scopus Author ID: 7005152932