

УДК 615.03:577.182.24:57.086.835
<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-155-164>



Оригинальная статья | Original article



Сравнительное исследование чувствительности клеточных линий НЕК293 и RPTEC для оценки нефротоксического действия цефуроксима и цефепима

В.А. Евтеев^{1,✉}, И.С. Семенова¹, Н.Д. Бунятян^{1,2}, А.Б. Прокофьев^{1,2}

¹ 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

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Евтеев Владимир Александрович evteev@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Выявление нефротоксических свойств является актуальной задачей как на доклиническом этапе разработки новых препаратов, так и при изучении возможностей оптимизации фармакотерапии. Основной проблемой при этом является поиск экспериментальной модели для оценки нефротоксичности лекарственных средств, наиболее приближенной к условиям *in vivo*.

Цель работы: сравнение чувствительности клеточных линий НЕК293 и RPTEC, используемых в качестве экспериментальных моделей при оценке нефротоксического действия цефуроксима и цефепима.

Материалы и методы: в исследовании использовали клеточные линии НЕК293 и RPTEC, которые культивировали в планшетах с мембранными вставками диаметром пор 0,4 мкм. Для каждой клеточной линии проводили инкубацию с цефалоспорином цефуроксимом и цефепимом, преимущественно выводящимися через почки, в течение 3 сут. Препараты добавляли в базальный отдел лунки планшета 2 раза/сут в следующих концентрациях: цефуроксим – 50 и 150 мкг/мл, цефепим – 30 и 120 мкг/мл. Через 24, 48 и 72 ч инкубации с препаратами измеряли уровни экспрессии генов транспортеров органических анионов *SLC22A6* и *SLC22A8* методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Признаком нефротоксического действия цефалоспоринов считали активацию каспаз 3 и 7, которую оценивали с помощью флуориметрического теста, который проводили через 24, 48 и 72 ч после инкубации с препаратами.

Результаты: показано уменьшение экспрессии генов транспортеров органических анионов *SLC22A6* и *SLC22A8* в обеих клеточных линиях при транспорте цефалоспоринов, причем в клеточной линии RPTEC оно наступало раньше, чем в клеточной линии НЕК293. Активация каспаз 3 и 7 при инкубации клеток с цефуроксимом и цефепимом в низких концентрациях (50 и 30 мкг/мл соответственно) была отмечена только в клеточной линии RPTEC через 72 ч, а при инкубации с этими препаратами в высоких концентрациях (150 и 120 мкг/мл соответственно) в клетках линии RPTEC она наблюдалась уже через 24 ч.

Выводы: клеточная линия RPTEC является более чувствительной к токсическому действию цефуроксима и цефепима в связи с более высоким уровнем экспрессии генов транспортеров лекарственных средств. Повышение концентрации цефалоспоринов уменьшает время активации каспаз 3 и 7 в этой клеточной линии. Экспериментальная модель на основе клеточной линии RPTEC является перспективной для проведения анализа нефротоксических свойств различных препаратов.

© В.А. Евтеев, И.С. Семенова, Н.Д. Бунятян, А.Б. Прокофьев, 2023

Ключевые слова: лекарственные препараты; нефротоксичность; клеточные линии; HEK293; RPTEC; транспортеры органических анионов; цефалоспорины; цефуроксим; цефепим

Для цитирования: Евтеев В.А., Семенова И.С., Бунятян Н.Д., Прокофьев А.Б. Сравнительное исследование чувствительности клеточных линий HEK293 и RPTEC для оценки нефротоксического действия цефуроксима и цефепима. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):155–164. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-155-164>

Susceptibility of HEK293 and RPTEC Cell Lines to Nephrotoxic Effects of Cefuroxime and Cefepime: A Comparative Study

V.A. Evteev^{1,✉}, I.S. Semenova¹, N.D. Bunyatyan^{1,2}, A.B. Prokofiev^{1,2}

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Corresponding author: **Vladimir A. Evteev** evteev@expmed.ru

ABSTRACT

Researchers need to identify the nephrotoxic properties of medicinal products both during preclinical development and when exploring options to optimise pharmacotherapy. The main challenge is to find an experimental model for assessing drug-induced nephrotoxicity that reflects *in vivo* conditions as closely as possible.

The aim of the study was to compare the susceptibility of HEK293 and RPTEC cell lines used as experimental models for assessing the nephrotoxicity of cefuroxime and cefepime.

Materials and methods. The study investigated HEK293 and RPTEC cell lines cultured on plates with 0.4 µm pore membrane inserts. The cell lines were incubated for 3 days with cefuroxime and cefepime (cephalosporins excreted primarily by the kidneys). The medicinal products were added to the basal part of the well at concentrations of 50 and 150 µg/mL (cefuroxime) or 30 and 120 µg/mL (cefepime) twice a day. After incubating the cells with cefuroxime and cefepime for 24, 48, and 72 hours, the authors determined the expression levels of the *SLC22A6* and *SLC22A8* genes encoding organic anion transporters by a reverse transcription polymerase chain reaction. The authors considered caspase 3 and caspase 7 activation indicative of the nephrotoxic effect of cephalosporins; they evaluated this indicator by a fluorometric assay after 24, 48, and 72 hours of incubation.

Results. According to the study, the expression of the *SLC22A6* and *SLC22A8* genes decreased with cephalosporin transport in both cell lines. The decrease occurred in the RPTEC cell line earlier than in the HEK293 cell line. The authors observed caspase 3 and caspase 7 activation only in the RPTEC cell line after incubation with cefuroxime and cefepime at low concentrations (50 and 30 µg/mL, respectively) for 72 hours and at high concentrations (150 and 120 µg/mL, respectively) for 24 hours.

Conclusions. The RPTEC cell line exhibits higher susceptibility to cefuroxime and cefepime toxic effects than the HEK293 cell line due to higher transporter gene expression. Higher cephalosporin concentrations accelerate caspase 3 and caspase 7 activation in the RPTEC cell line. The experimental model based on the RPTEC cell line is a promising tool for the analysis of the nephrotoxic properties of a wide range of medicinal products.

Key words: medicinal products; nephrotoxicity; cell lines; HEK293; RPTEC; organic anion transporters; cephalosporins; cefuroxime; cefepime

For citation: Evteev V.A., Semenova I.S., Bunyatyan N.D., Prokofiev A.B. Susceptibility of HEK293 and RPTEC cell lines to nephrotoxic effects of cefuroxime and cefepime: a comparative study. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):155–164. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-155-164>

Введение

Для достоверного прогнозирования нефротоксичности потенциальных фармакологических агентов в исследованиях *in vitro* необходим научно обоснованный выбор конкретных клеточных мишеней, а также выявление надежных биомаркеров нефротоксичности [1]. Скрининг нефротоксических свойств лекарственных средств (ЛС) *in vitro* в настоящее время имеет низкий уровень связи с данными из клинической практики фармакотерапии. Проксимальные почечные каналцы не только реабсорбируют глюкозу, альбумин и различные электролиты посредством специальных транспортеров, но также участвуют в выведении ксенобиотиков (в том числе ЛС) в мочу, и именно этот сегмент нефрона является важной мишенью для нефротоксического повреждения. В связи с этим внимание исследователей нефротоксичности в последнее время привлечено к экспериментальным моделям на основе линий эпителиальных клеток проксимальных почечных каналцев [2].

Существует несколько возможных механизмов нефротоксического действия ксенобиотиков. Так, транспорт отрицательно заряженных молекул посредством транспортеров органических анионов (organic anion transporters, OAT) осуществляется в обмен на анион дикарбоновой кислоты, что замедляет функционирование цикла Кребса – важного компонента энергетического обмена клетки. Таким образом, при транспорте анионов клетками проксимальных каналцев возможно возникновение ишемических явлений, увеличивающих риск развития апоптоза [3]. Нефротоксическое действие ксенобиотиков нередко определяется активностью ферментов, участвующих в их метаболизме: в частности, нефротоксичность цисплатина зависит от активности фермента глутатион-S-трансферазы [4]. Основными протеазами, участвующими в процессе апоптоза, являются каспазы. Каспазы 3 и 7 – эффекторные каспазы митохондриального пути апоптоза, которые могут рассматриваться в качестве биомаркеров токсического действия ЛС [5].

Согласно рекомендациям по доклиническим исследованиям Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA)¹ и Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency,

EMA)², в случае, когда почечный клиренс исследуемого ЛС составляет более 25%, производитель обязан протестировать его на предмет сродства к почечным транспортерам. В качестве экспериментальных моделей для такого тестирования предлагается использовать клеточные линии HEK293, CHO, MDCK и др. Основной характеристикой клеточных линий, используемых в качестве моделей *in vitro*, является уровень экспрессии и функциональной активности транспортеров, ферментов и других функциональных белков, которые участвуют в транспорте ЛС. Несмотря на то что эти транспортеры и ферменты достаточно хорошо изучены, современные клеточные модели *in vitro* плохо воспроизводят как морфологию, так и функцию почечных каналцев и, следовательно, не могут в должной степени продемонстрировать реакцию на повреждение нефротоксичными лекарственными препаратами *in vivo*. В связи с этим в настоящее время исследователи нефротоксичности рассматривают в качестве перспективной клеточную линию RPTEC (renal proximal tubule epithelial cells), полученную из эпителия проксимальных почечных каналцев человека [6]. В отличие от вышеперечисленных клеточных линий, RPTEC имеет сходную морфологию с проксимальным эпителием *in vivo*, что позволяет ожидать более высокую корреляцию полученных результатов с данными клинических исследований [7].

Известно, что антибиотики семейства бета-лактамов, в частности цефалоспорины, преимущественно выводятся через почки, что обосновывает проведение исследований нефротоксичности для данной группы препаратов. Цефалоспорины цефуроксим (II поколение) и цефепим (IV поколение) широко применяются в клинике и в повышенных дозировках могут вызывать нефротоксические эффекты [8].

Цель работы – сравнение чувствительности клеточных линий HEK293 и RPTEC, используемых в качестве экспериментальных моделей при оценке нефротоксического действия цефуроксима и цефепима.

Задачи исследования:

1) изучить влияние концентрации и времени воздействия антибиотиков группы цефалоспоринов на уровень экспрессии генов транспортеров органических анионов (OAT) в клеточных линиях HEK293 и RPTEC;

¹ In vitro drug interaction studies – cytochrome p450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions. Guidance for industry. FDA-2017-D-5961. FDA; 2020.

² ICH Guideline M12 on drug interaction studies. EMA/CHMP/ICH/652460/2022. EMA; 2022.

2) изучить активацию каспаз 3 и 7 в клеточных линиях HEK293 и RPTEC;

3) провести сравнение полученных результатов для используемых клеточных линий.

Материалы и методы

Клеточная культура. Клеточная линия проксимальных почечных канальцев человека RPTEC, иммортализованная путем ретровирусной трансфекции гена *hTERT* (вектор *pLXSN*), была получена из банка культур клеток ATCC (код: CRL-4031). Культура клеток почек эмбриона человека HEK293 была любезно предоставлена коллегами из НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Восстановление клеточной линии RPTEC производили по следующей методике: культуральный флакон 25 см², содержащий 10 мл культуральной среды DMEM/F12 (с добавлением следующих веществ: 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 (Gibco, США)), помещали в инкубатор на 15–20 мин для достижения нейтрального значения pH (7,0–7,6), а также для предотвращения защелачивания среды в процессе восстановления клеток. Пробирку с клетками размораживали на водяной бане в течение 2 мин при температуре 37 °С. После размораживания флакон обрабатывали 70% этанолом и далее все действия проводили в асептических условиях. Содержимое переносили в центрифужную пробирку, содержащую 9,0 мл культуральной среды, и центрифугировали при 250 g в течение 5–7 мин. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в свежей среде. Полученную суспензию переносили в культуральный флакон. Условия культивирования стандартные: 37 °С и 5% CO₂. В эксперименте использовали клетки 14–15 пассажей.

Культивирование. Клеточную линию HEK293 культивировали в 12-луночных планшетах с мембранными вставками с диаметром пор 0,4 мкм (Costar® 12 mm Transwell®, 0.4 µm Pore Polyester Membrane Inserts). В качестве культуральной среды использовали DMEM/F12 (Gibco, США), 50 ед./мл гентамицина («ПанЭко», Россия) и 0,1 мг/мл пирувата натрия (Santa Cruz, США) при 37 °С, 5% CO₂ и относительной влажности 80–85%. В экспериментах использовали культуры в логарифмической фазе роста.

Клеточную линию RPTEC культивировали в 12-луночных планшетах с мембранными вставками с диаметром пор 0,4 мкм (Costar® 12 mm Transwell®, 0.4 µm Pore Polyester Membrane Inserts). Количество клеток в каждой лунке составляло примерно 0,5×10⁶. 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 °С, 5% CO₂ и относительной влажности 80–85%. В среду были добавлены: инсулин – 5 мкг/мл, трансферрин – 5 мкг/мл, селенит натрия – 5 мкг/мл (Insulin–Transferrin–Sodium Selenite Supplement; Sigma-Aldrich, кат. № I1884), hEGF (Sigma-Aldrich, кат. № E9644) – 10 нг/мл, гидрокортизон – 25 нг/мл (Sigma-Aldrich, кат. № H6909). Замена среды производилась через каждые 2–3 сут. Объем буфера для апикального и базолатерального отделов составил 0,5 и 1,5 мл соответственно (чтобы избежать разности гидростатических давлений).

Лекарственные препараты. Использовали субстанции цефалоспоринов: цефуроксим (USP Reference Standard, кат. № 1098209) и цефепим (USP Reference Standard, кат. № 1097636). Субстанции растворяли в культуральной среде, концентрация препаратов в рабочем растворе составляла 50 и 150 мкг/мл для цефуроксима, 30 и 120 мкг/мл – для цефепима. Рабочие растворы добавляли в культуральную среду 2 раза/сут на протяжении 3 сут таким образом, что концентрации конечных растворов составили 50 и 150 мкг/мл для цефуроксима, 30 и 120 мкг/мл – для цефепима. Выбранные концентрации цефалоспоринов примерно соответствуют минимальной и максимальной концентрации данных препаратов в крови в рамках применения их в терапевтических дозах³.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ПЦР). Выделение тотальной РНК из клеток проводили с использованием реагента PureZOL (BioRad, США) по протоколу, рекомендованному производителем. Реакцию обратной транскрипции проводили в амплификаторе Biometra TOne 96G (Analytik Jena, Германия) в общем объеме 20 мкл по следующему протоколу: в пробирку, находящуюся на льду, добавляли последовательно: 2 мкл тотальной РНК, 0,2 мкг гекса-праймеров, воды, обработанной диэтилпиноксикарбонатом (DEPC-treated water; Fermentas) – до 12,5 мкл, затем перемешивали и далее добавляли: 4 мкл 5x ПЦР-буфера (Fermentas), 0,5 мкл (20 ед.) ингибитора

³ Цефуроксим. https://www.vidal.ru/drugs/cefuroksim_14802
Цефепим. https://www.vidal.ru/drugs/cefepime_22119

РНказы (RiboLock, Fermentas), 2 мкл 10 мМ смеси dNTP (Fermentas), 1 мкл обратной транскриптазы (RevertAid, Fermentas). После осторожного перемешивания инкубировали сначала 10 мин при 25 °С, а затем 60 мин при 42 °С. Для завершения реакции инкубировали 10 мин при 72 °С. Во всех экспериментах проводили контрольную реакцию с использованием воды вместо РНК.

Полимеразную цепную реакцию для всех изучаемых генов проводили в термоциклере C1000 CFX96 (BioRad, США) по следующей схеме: начальная денатурация при 94 °С в течение 2 мин; отжиг праймеров при 60 °С, 30 с; синтез продукта при 72 °С, 30 с; заключительная выдержка после прохождения циклов 5 мин при 72 °С. Количество циклов варьировало в пределах 25–30 с в зависимости от изучаемого гена. В качестве контроля использовали РНК вместо кДНК. Последовательности праймеров указаны в *таблице 1*. Нормирование экспрессии генов проводили по *GAPDH* в качестве гена «домашнего хозяйства», для анализа результатов количественной полимеразной реакции использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$. В качестве отрицательного контроля использовали клеточную культуру без добавления препарата. Изменения активности генов в опытных образцах определяли относительно отрицательного контроля.

Флуориметрический тест на каспазы 3 и 7. Исследование проводили методом флуориметрии с использованием коммерческого набора «The EarlyTox™ Caspase-3/7 R110 Assay Kit» (Molecular Devices, США). Набор обеспечивает возможность проведения одноступенчатого анализа активности двух каспаз благодаря флуорогенному субстрату (Ac-DEVD)₂-R110, представляющему собой пептидный димер, который содержит сайты для гидролиза каспазами 3 и 7. При гидролизе данного димера под действием каспаз происходило высвобождение флуоресцентного красителя родамина 110, количество которого измеряли на планшетном флуориметре Cary Eclipse Fluorescence (Agilent Technologies).

Клетки высевали в количестве (20–25)×10³ (объем среды 0,1 мл) на лунку 96-луночного микропланшета для флуориметрии (Molecular Devices, США). Для прикрепления и роста клеток планшет инкубировали сутки при 37 °С и 5% CO₂. Затем к клеткам добавляли препараты по методике, изложенной выше.

Приготовление буфера для анализа (все компоненты включены в коммерческий набор): флуорогенный субстрат (Ac-DEVD)₂-R110 смешивали с лизирующим буфером в соотношении 1:20 до конечной концентрации субстрата 2 мМ. В каждую лунку добавляли по 100 мкл буфера для анализа. В результате объем раствора в каждой лунке составлял 200 мкл, а конечная концентрация субстрата – 50 мкмоль/л. Отрицательным контролем являлась культуральная среда в отсутствие препарата. В качестве холостой пробы использовали препараты с флуорогенным субстратом в отсутствие клеточной культуры. Далее образцы для анализа перемешивали на шейкере при 300 об/мин в течение 30 с и инкубировали 2 ч при комнатной температуре.

Измерение флуоресценции проводили на планшетном флуориметре при следующих параметрах: длина волны – 490 нм, длина волны эмиссии – 520 нм. Результаты представляли с использованием программного обеспечения SoftMax Pro (Molecular Devices) в виде графика с использованием 4-параметрической аппроксимации кривой. Результаты люминесцентного анализа холостых проб использовали в качестве фоновых.

Для определения базовой активности каспаз в клетках использовали результат люминесцентного анализа проб отрицательного контроля. Положительным считали результат с флуоресценцией выше значений отрицательного контроля.

Статистическая обработка данных. Проводили с помощью пакета программ Statistica 13 (StatSoft, США). Различия в средних значениях опыта по отношению к контролю на каждой

Таблица 1. Последовательности праймеров для проведения полимеразной цепной реакции

Table 1. Primer sequences for the polymerase chain reaction

Ген <i>Gene</i>	Прямой праймер (5'→3') <i>Forward primer (5'→3')</i>	Обратный праймер (5'→3') <i>Reverse primer (5'→3')</i>
<i>OAT1</i>	TTGTCCGAACCTCTCTTGCT	CACAGGAACAGCACCGTAGA
<i>OAT3</i>	CTGAGCACCGTCATCTTGAA	AGACCAACCAGCGTATGGAC
<i>GAPDH</i>	GGATTTGGTCGTATTGGG	GGAAGATGGTGATGGGATT

временной точке рассчитывали с помощью ANOVA. Уровнем статистической значимости считали $p < 0,05$. Для каждой концентрации препарата проводили 3 независимых эксперимента. В рамках данной работы провести большее количество экспериментов не представлялось возможным, что являлось ограничением исследования. Полученные результаты могут рассматриваться в качестве предварительных.

Результаты и обсуждение

Влияние цефуроксима и цефепима на экспрессию генов транспортеров OAT1 и OAT3 в клеточных линиях HEK293 и RPTEC

Уровень экспрессии гена *SLC22A6* (OAT1) в клетках линий HEK293 и RPTEC при инкубации с цефуроксимом в концентрациях 50 и 150 мкг/мл изменялся неравномерно (рис. 1). В клетках линии RPTEC экспрессия гена *SLC22A6* при инкубации с цефуроксимом в концентрации 50 мкг/мл снижалась в среднем на 24,75% каждые сутки, в то время как в клетках линии HEK293 наблюдалось снижение уровня экспрессии в среднем на 16,36% в сутки. Это можно объяснить, по-видимому, более активным транспортом цефуроксима в клеточной линии RPTEC. Представленные на рисунке данные также свидетельствуют о том, что динамика понижения уровня экспрессии

гена *SLC22A6* статистически значимо зависит от концентрации ЛС.

При транспорте цефепима в концентрациях 30 и 120 мкг/мл в обеих клеточных линиях наблюдалось относительно равномерное понижение уровня экспрессии гена *SLC22A6* (OAT1). При добавлении цефепима в концентрации 120 мкг/мл понижение экспрессии гена более значительно, чем в концентрации 30 мкг/мл (рис. 2).

При транспорте цефуроксима в концентрации 50 мкг/мл понижение экспрессии гена *SLC22A8* (OAT3) в клеточной линии RPTEC было более значительным, чем в HEK293 (рис. 3). При добавлении цефуроксима в концентрации 150 мкг/мл в клеточной линии HEK293 происходит резкое снижение экспрессии гена *SLC22A8* на вторые сутки.

При добавлении цефепима в концентрации 30 мкг/мл снижение уровня экспрессии гена *SLC22A8* (OAT3) в клеточных линиях HEK293 и RPTEC происходило на вторые сутки (рис. 4). При инкубации с цефепимом в концентрациях 30 и 120 мкг/мл в клеточной линии RPTEC понижение уровня экспрессии генов *SLC22A8* в среднем, соответственно, на 9,6 и 7,8% больше, чем в клеточной линии HEK293.

Как цефуроксим, так и цефепим вызывали статистически значимое снижение уровня

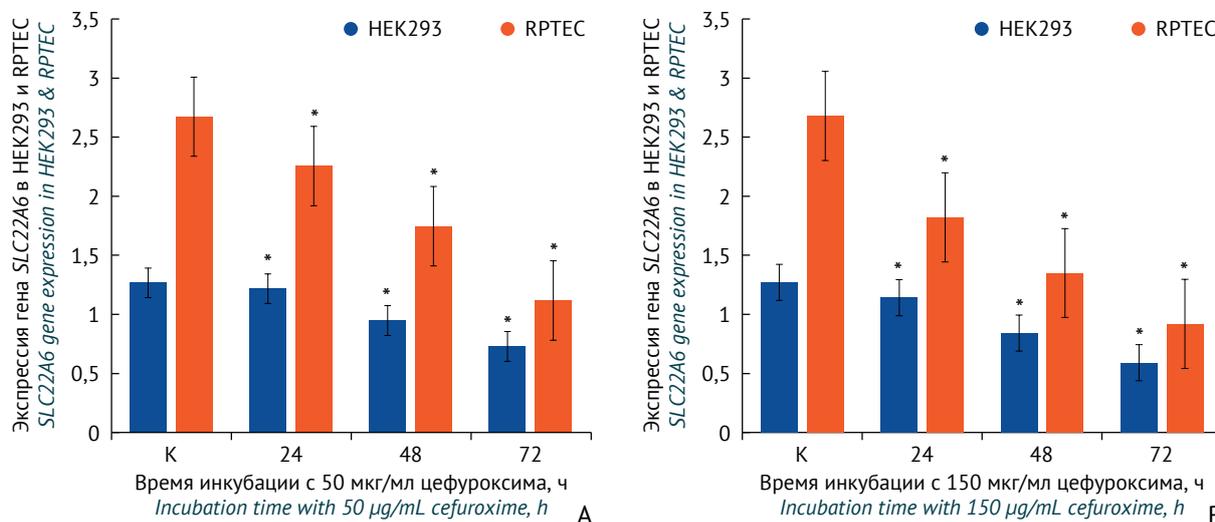


Рис. 1. Уровень экспрессии гена *SLC22A6* (OAT1) относительно *GAPDH* в клеточных линиях HEK293 и RPTEC при инкубации с цефуроксимом в концентрациях 50 мкг/мл (А) и 150 мкг/мл (В). К — отрицательный контроль (клеточная культура без добавления препарата); данные представлены в формате $M \pm SD$ (среднее \pm стандартное отклонение, данные 3 экспериментов); * — уровень значимости $p < 0,05$

Fig. 1. *SLC22A6* (OAT1) gene expression levels in HEK293 and RPTEC cell lines upon incubation with 50 µg/mL (A) and 150 µg/mL (B) of cefuroxime calculated using *GAPDH* as a reference gene. K shows negative controls (cells cultured without the medicinal product). Data are presented as $M \pm SD$ (mean \pm standard deviation of 3 experiments). Asterisks (*) indicate a significance level of $p < 0.05$

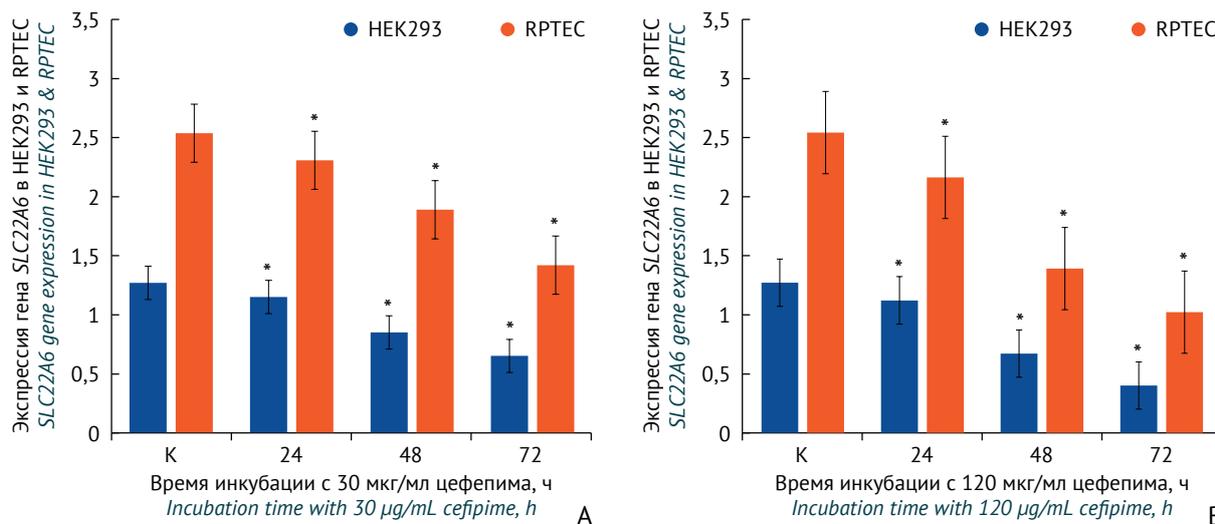


Рис. 2. Уровень экспрессии гена *SLC22A6* (*OAT1*) относительно *GAPDH* в клеточных линиях HEK293 и RPTEC при инкубации с цефепимом в концентрации 30 мкг/мл (А) и 120 мкг/мл (В). К – отрицательный контроль (клеточная культура без добавления препарата); данные представлены в формате $M \pm SD$ (среднее \pm стандартное отклонение, данные 3 экспериментов); * – уровень значимости $p < 0,05$

Fig. 2. *SLC22A6* (*OAT1*) gene expression levels in HEK293 and RPTEC cell lines upon incubation with 30 µg/mL (A) and 120 µg/mL (B) of cefuroxime calculated using *GAPDH* as a reference gene. K shows negative controls (cells cultured without the medicinal product). Data are presented as $M \pm SD$ (mean \pm standard deviation of 3 experiments). Asterisks (*) indicate a significance level of $p < 0.05$

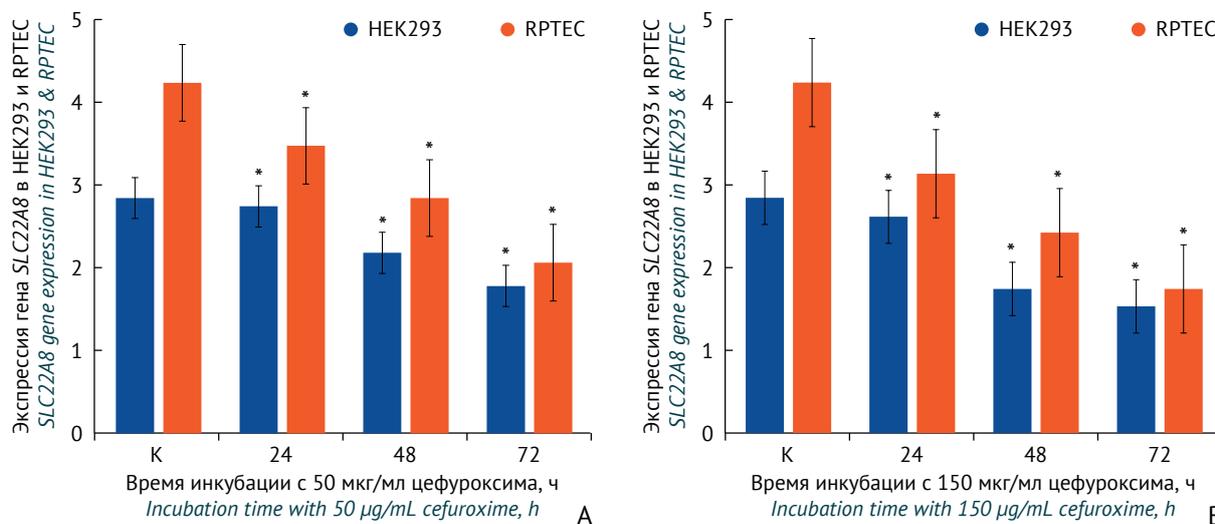


Рис. 3. Уровень экспрессии гена *SLC22A8* (*OAT3*) относительно *GAPDH* в клеточных линиях HEK293 и RPTEC при инкубации с цефуроксимом в концентрациях 50 мкг/мл (А) и 150 мкг/мл (В). К – отрицательный контроль (клеточная культура без добавления препарата); данные представлены в формате $M \pm SD$ (среднее \pm стандартное отклонение, данные 3 экспериментов); * – уровень значимости $p < 0,05$

Fig. 3. *SLC22A8* (*OAT3*) gene expression levels in HEK293 and RPTEC cell lines upon incubation with 50 µg/mL (A) and 150 µg/mL (B) of cefuroxime calculated using *GAPDH* as a reference gene. K shows negative controls (cells cultured without the medicinal product). Data are presented as $M \pm SD$ (mean \pm standard deviation of 3 experiments). Asterisks (*) indicate a significance level of $p < 0.05$

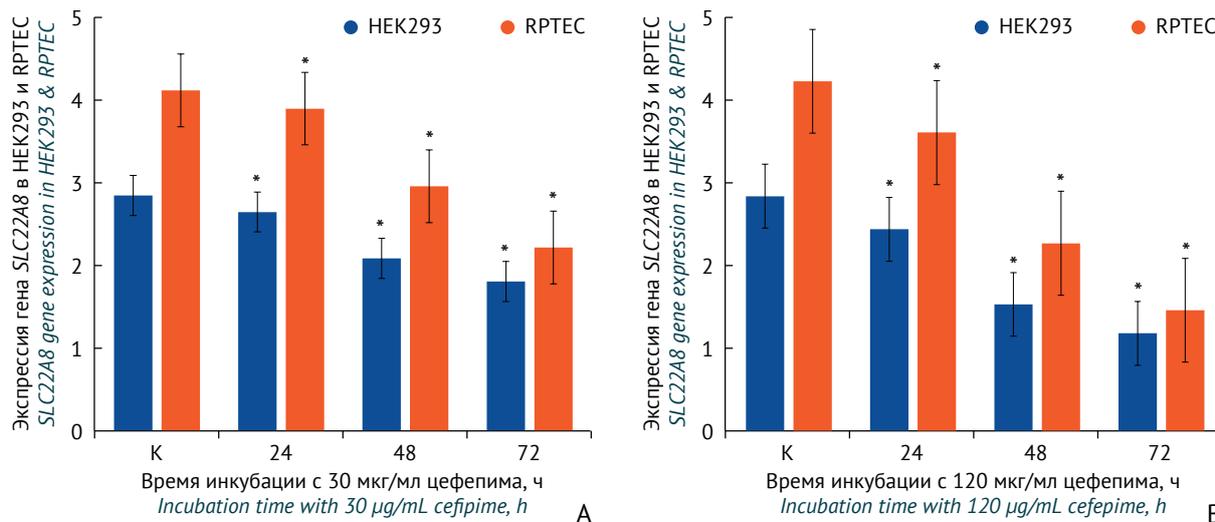


Рис. 4. Уровень экспрессии гена *SLC22A8* (OAT3) относительно *GAPDH* в клеточных линиях HEK293 и RPTEC при инкубации с цефепимом в концентрациях 30 мкг/мл (А) и 120 мкг/мл (В). К – отрицательный контроль (клеточная культура без добавления препарата); данные представлены в формате $M \pm SD$ (среднее \pm стандартное отклонение, данные 3 экспериментов); * – уровень значимости $p < 0,05$

Fig. 4. *SLC22A8* (OAT3) gene expression levels in HEK293 and RPTEC cell lines upon incubation with 30 µg/mL (A) and 120 µg/mL (B) of cefepime calculated using *GAPDH* as a reference gene. K shows negative controls (cells cultured without the medicinal product). Data are presented as $M \pm SD$ (mean \pm standard deviation of 3 experiments). Asterisks (*) indicate a significance level of $p < 0.05$

экспрессии генов транспортеров *SLC22A6* (OAT1) и *SLC22A8* (OAT3) в обеих клеточных линиях, причем для клеток линии RPTEC оно более выражено.

Влияние цефуроксима и цефепима на активность каспаз 3 и 7

Для оценки влияния цефалоспоринов на активацию каспаз в клеточных линиях HEK293

и RPTEC методом флуориметрии проводили качественное сравнение базового уровня флуоресценции в контрольных клетках с флуоресценцией в клетках, инкубированных с цефалоспоринами. Результаты флуориметрического теста на каспазы 3 и 7 в клеточных линиях HEK293 и RPTEC при инкубации с цефуроксимом (50 и 150 мкг/мл) и цефепимом (30 и 120 мкг/мл) представлены в *таблице 2*.

Таблица 2. Влияние концентрации и времени воздействия цефуроксима и цефепима на активность каспаз 3/7 в клеточных линиях HEK293 и RPTEC

Table 2. Effects of cefuroxime and cefepime concentrations and exposure periods on caspase 3/7 activity in HEK293 and RPTEC cell lines

Название препарата <i>Name of the medicinal product</i>	Концентрация препарата, мкг/мл <i>Concentration of the medicinal product, mg/mL</i>	Клеточная линия HEK293 <i>HEK293 cell line</i>			Клеточная линия RPTEC <i>RPTEC cell line</i>		
		24 ч <i>24 h</i>	48 ч <i>48 h</i>	72 ч <i>72 h</i>	24 ч <i>24 h</i>	48 ч <i>48 h</i>	72 ч <i>72 h</i>
Цефуроксим <i>Cefuroxime</i>	50	-	-	+	-	-	-
	150	+	+	+	+	+	+
Цефепим <i>Cefepime</i>	30	-	-	-	-	-	+
	120	-	+	нет данных <i>no data</i>	+	+	+

Примечание. «-» – отсутствие активации каспаз 3/7; «+» – активация каспаз 3/7.
 Note. -, no caspase 3/7 activation observed; +, caspase 3/7 activation observed.

Результаты флуориметрического теста показывают, что при стандартных концентрациях цефуроксима и цефепима (50 и 30 мкг/мл) в клеточной линии HEK293 не было отмечено активации каспаз в течение 72 ч, а в клеточной линии RPTEC активация наблюдалась только на третьи сутки инкубации с цефепимом. При высокой концентрации цефуроксима (150 мкг/мл) активация каспаз наблюдалась уже через 24 ч в обеих клеточных линиях. При повышенной концентрации цефепима (120 мкг/мл) в клеточной линии HEK293 активация каспаз выявлена на вторые сутки, а в клеточной линии RPTEC — уже на первые сутки. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой чувствительности клеточной линии RPTEC к токсическому действию цефалоспоринов по сравнению с клеточной линией HEK293. Время активации каспаз в обеих клеточных линиях зависело не только от периода инкубации с препаратом группы цефалоспоринов, но также от концентрации препаратов.

Выводы

1. Клеточная линия RPTEC является более чувствительной, чем клеточная линия HEK293,

к токсическому действию цефалоспоринов цефуроксима и цефепима, что коррелирует со статистически значимым повышенным уровнем экспрессии транспортеров OAT в клеточной линии RPTEC.

2. Активация каспаз 3/7, наблюдающаяся при инкубации в клеточных линиях HEK293 и RPTEC, подтверждает инициацию апоптоза по митохондриальному пути.

3. В обеих клеточных линиях инкубация с цефуроксимом и цефепимом в высоких дозах (150 и 120 мкг/мл соответственно) вызывает статистически значимое понижение уровня экспрессии генов транспортеров OAT1 и OAT3.

4. Инкубация с цефалоспоринами вызывает активацию каспаз 3 и 7 в клеточных линиях HEK293 и RPTEC только при повышенных концентрациях препаратов.

Экспериментальная модель на основе клеточной линии RPTEC является перспективной для проведения анализа нефротоксических свойств различных препаратов.

Литература / References

- Huang JX, Kaeslin G, Ranall MV, Blaskovich MA, Becker B, Butler MS, et al. Evaluation of biomarkers for in vitro prediction of drug-induced nephrotoxicity: comparison of HK-2, immortalized human proximal tubule epithelial, and primary cultures of human proximal tubular cells. *Pharmacol Res Perspect*. 2015;3(3):e00148. <https://doi.org/10.1002/prp2.148>
- Aschauer L, Carta G, Vogelsang N, Schlatter E, Jennings P. Expression of xenobiotic transporters in the human renal proximal tubule cell line RPTEC/TERT1. *Toxicol In Vitro*. 2015;30(1 Pt A):95–105. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.12.003>
- 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>
- Zazuli Z, Otten LS, Drögemöller BI, Medeiros M, Monzon JG, Wright GEB, et al. Outcome definition influences the relationship between genetic polymorphisms of ERCC1, ERCC2, SLC22A2 and cisplatin nephrotoxicity in adult testicular cancer patients. *Genes (Basel)*. 2019;10(5):364. <https://doi.org/10.3390/genes10050364>
- Servais H, Ortiz A, Devuyt O, Denamur S, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis*. 2008;13(1):11–32. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0151-z>
- 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>
- Fisel P, Renner O, Nies AT, Schwab M, Schaeffeler E. Solute carrier transporter and drug-related nephrotoxicity: the impact of proximal tubule cell models for preclinical research. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10(3):395–408. <https://doi.org/10.1517/17425255.2014.876990>
- Mac K, Chavada R, Paull S, Howlin K, Wong J. Cefepime induced acute interstitial nephritis – a case report. *BMC Nephrol*. 2015;16:15. <https://doi.org/10.1186/s12882-015-0004-x>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: *В.А. Евтеев* – идея и дизайн эксперимента, измерение экспрессии генов, тест на каспазы, написание и редактирование текста рукописи; *И.С. Семенова* – культивирование клеточных линий HEK293 и RPTEC, инкубация клеток с цефалоспоридами; *Н.Д. Бунятян* и *А.Б. Прокофьев* – руководство и общий контроль над экспериментом, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

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

Конфликт интересов. А.Б. Прокофьев является членом редколлегии журнала «Безопасность и риск фармакотерапии». Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Vladimir A. Evteev* elaborated the study idea and experiment design, measured gene expression, conducted the caspase assay, drafted and edited the manuscript. *Irina S. Semenova* cultured HEK293 and RPTEC cell lines and incubated the cells with cephalosporins. *Natalya D. Bunyatyan* and *Alexey B. Prokofiev* provided guidance and general supervision for the experiment and approved the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022400082-4).

Conflict of interest. Alexey B. Prokofiev is a member of the Editorial Board of *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. The other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Евтеев Владимир Александрович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6150-5796>
evteev@expmed.ru

Семенова Ирина Семеновна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9026-0508>
semenovais@expmed.ru

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0936-5551>
bunyatyan@expmed.ru

Прокофьев Алексей Борисович, д-р мед. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7024-5546>
prokofiev@expmed.ru

Поступила 28.04.2022

После доработки 14.04.2023

Принята к публикации 06.06.2023

Vladimir A. Evteev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6150-5796>
evteev@expmed.ru

Irina S. Semenova, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9026-0508>
semenovais@expmed.ru

Natalia D. Bunyatyan, Dr. Sci. (Pharm.),
Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0936-5551>
bunyatyan@expmed.ru

Alexey B. Prokofiev, Dr. Sci. (Med.),
Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7024-5546>
prokofiev@expmed.ru

Received 28 April 2022

Revised 14 April 2023

Accepted 6 June 2023