



# Возможности и перспективы доклинической оценки лекарственной безопасности с использованием альтернативных методов: опыт реализации программы «Токсикология в XXI веке» в США

В.Н. Перфилова<sup>1,2,✉</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Площадь Павших Борцов, д. 1, Волгоград, 400131, Российская Федерация

<sup>2</sup> Государственное бюджетное учреждение «Волгоградский медицинский научный центр»,  
Площадь Павших Борцов, д. 1, Волгоград, 400131, Российская Федерация

✉ Контактное лицо: Перфилова Валентина Николаевна [vnperfilova@mail.ru](mailto:vnperfilova@mail.ru)

## РЕЗЮМЕ

**АКТУАЛЬНОСТЬ.** Консорциумом Тох21 (США) разработана и успешно реализуется «Программа по токсикологии в XXI веке», направленная на переход к новой стратегии, согласно которой изучение токсичности химических веществ на животных будет заменено широким спектром подходов, базирующихся на тестах *in vitro* и вычислительных методах.

**ЦЕЛЬ.** Обзор информации об альтернативных моделях *in vitro*, разработанных для изучения токсичности химических соединений в рамках программы «Токсикология в XXI веке».

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Анализ информации, представленной Национальной токсикологической программой США (National Toxicology Program), Агентством по охране окружающей среды США (Environmental Protection Agency), Национальным центром развития трансляционных наук (National Center for Advancing Translational Sciences) и другими участниками консорциума Тох21 на официальных сайтах и в научной литературе, показал, что к настоящему времени разработана технология высокопроизводительного скрининга для тестирования безопасности химических веществ. С использованием этой технологии сформирована библиотека химических соединений Тох21 10К. Находящаяся в ней информация успешно используется для создания моделей, позволяющих прогнозировать токсичность химических веществ до начала доклинических исследований. Предложены новые подходы к изучению безопасности соединений на клеточных линиях человека для замены *in vivo* исследований. Создание моделей с использованием органов-на-чипах, мультиорганов-на-чипах и органоидов позволит преодолеть недостатки и ограничения применения моделей на основе клеточных линий и обеспечить более точное воспроизведение сложных взаимодействий клеток и матрикса, а также органов между собой. Новые технологии транскриптомики (токсикогеномики), разработанные в ходе реализации программы Тох21 для выявления новых биомаркеров и генных сигнатур токсичности химических веществ, могут быть применены для классификации токсикантов в соответствии со степенью риска для здоровья и выявления потенциальных побочных эффектов задолго до того, как будут обнаружены какие-либо патологические изменения в организме. Межведомственный координационный комитет по валидации альтернативных методов (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) проводит техническую оценку альтернативных методов испытаний и способствует их внедрению в регуляторную практику.

**ВЫВОДЫ.** Разработанные в рамках программы Тох21 новые подходы к изучению токсичности позволяют осуществить переход от тестирования потенциальных лекарственных средств *in vivo* к компьютерным и *in vitro* методам, обеспеченным новыми инструментами и технологиями.

© В.Н. Перфилова, 2023

**Ключевые слова:** консорциум Tox21; библиотека химических соединений; альтернативные модели; биоинформатика; высокопроизводительный скрининг; *in vitro* токсикология; клеточные культуры; органы-на-чипах; токсикогеномика

**Для цитирования:** Perfilova V.N. Возможности и перспективы доклинической оценки лекарственной безопасности с использованием альтернативных методов: опыт реализации программы «Токсикология в XXI веке» в США. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2024;12(1):68–82. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-379>

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

# Opportunities and Prospects for Preclinical Drug Safety Assessment Using Alternative Methods: Experience from the Toxicology in the 21st Century (Tox21) Programme in the USA

Valentina N. Perfilova<sup>1,2,✉</sup>

<sup>1</sup> Volgograd State Medical University,  
1 Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd 400131, Russian Federation

<sup>2</sup> Volgograd Medical Scientific Centre,  
1 Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd 400131, Russian Federation

✉ Corresponding author: **Valentina N. Perfilova** [vnperfilova@mail.ru](mailto:vnperfilova@mail.ru)

## ABSTRACT

**SCIENTIFIC RELEVANCE.** The Tox21 (Toxicology in the 21st Century) programme was developed by the US Tox21 Consortium with the aim to replace animal-based toxicity assessments of chemicals with a wide range of *in vitro* and *in silico* testing approaches and has since been successfully applied in practice.

**AIM.** The study aimed to review information on alternative *in vitro* models developed as part of the Tox21 programme for testing the toxicity of chemical compounds.

**DISCUSSION.** According to the information provided by the National Toxicology Program, Environmental Protection Agency, National Center for Advancing Translational Sciences, and other Tox21 Consortium members on their official websites and in the literature, the Tox21 Consortium has developed a quantitative high-throughput screening technology for testing the safety of chemicals and created the Tox21 10K library of chemical compounds using this screening technology. The library has been successfully used to create models that predict the toxicity of chemicals prior to preclinical studies. Researchers have proposed new approaches to studying the safety of chemical compounds in human cell lines to replace *in vivo* studies. Innovative organ-on-chip, multi-organ-on-chip, and organoid models are free from the drawbacks and limitations of cell-line models and offer more accurate representations of complex cell–matrix and organ–organ interactions. Developed under the Tox21 programme to search for new chemical toxicity biomarkers and gene signatures, novel transcriptomics (toxicogenomics) technologies can be used to classify toxicants according to their health risks and to identify potential side effects long before discovering any pathological changes in the body. The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods conducts technical evaluation of alternative testing methods and promotes their implementation into regulatory practice.

**CONCLUSIONS.** Thus, new tools and technologies provide an opportunity for switching from *in vivo* toxicity testing of candidate medicinal products to *in silico* and *in vitro* methods.

**Keywords:** Tox21 Consortium; library of chemical compounds; Tox21 10K; alternative models; bioinformatics; high-throughput screening; *in vitro* toxicology; cell cultures; organs-on-chips; toxicogenomics

**For citation:** Perfilova V.N. Opportunities and prospects for preclinical drug safety assessment using alternative methods: experience from the Toxicology in the 21st Century (Tox21) programme in the USA. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2024;12(1):68–82. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-379>

**Funding.** The study was performed without external funding.

**Disclosure.** The author declares having no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Введение

В традиционных доклинических токсикологических исследованиях в качестве модельных организмов используются животные. Однако после внедрения принципов 3R (Replacement, Reduction, Refinement – замена, сокращение, совершенствование), принятых учеными как моральное обязательство гуманно обращаться с животными, логичным шагом явилась разработка альтернативных моделей *in vitro* для изучения токсичности химических веществ [1, 2]. Необходимость разработки таких моделей обусловлена, кроме того, высокой стоимостью, длительностью и трудоемкостью исследований *in vivo*, а также сложностью экстраполяции данных на человека, связанной с генетической однородностью лабораторных животных (в пределах вида) и гетерогенной популяцией человека [3–5]. Переходу от *in vivo* к *in vitro* и *in silico* исследованиям способствует прогресс, достигнутый токсикологией за последние десятилетия: клонирование генов, экспрессирующих белки для регуляции биотрансформации химических веществ, получение трансгенных и нокаутных животных и изучение с их помощью роли специфических генов в токсических эффектах химических веществ, стремительное развитие геномики, протеомики, метаболомики, интерактомики, эпигенетики, системной, вычислительной и *in vitro* биологии [6, 7].

В 2007 г. Национальный исследовательский совет США (National Research Council, NRC) разработал программу «Токсикология в 21 веке» (Toxicology in the 21st Century)<sup>1</sup>, в которой были представлены рекомендации по переходу от традиционных подходов к исследованию токсичности на животных к альтернативным методам, основанным на изучении нарушений молекулярных событий и клеточных путей с использованием *in vitro* анализов биологического (человеческого) материала и новых методов биоинформатики. Программа направлена на разработку инновационных методов испытаний, включающих использование технологий qHTS, биоинформатики, тестов *in vitro*, а также

других новых методологий подхода к оценке безопасности химических веществ для человека и окружающей среды.

**Цель работы** – обзор информации об альтернативных моделях *in vitro*, разработанных для изучения токсичности химических соединений в рамках программы «Токсикология в 21 веке».

## Разработка программы Tox21 и этапы ее реализации

В разработке и поддержке программы «Токсикология в 21 веке» приняли участие Агентство по охране окружающей среды США (Environmental Protection Agency, EPA), Национальная токсикологическая программа (National Toxicology Program, NTP) со штаб-квартирой в Национальном институте по изучению влияния экологических факторов на здоровье человека (National Institute of Environmental Health Sciences, NIEHS), Национальный центр развития трансляционных наук (National Center for Advancing Translational Sciences, NCATS) и Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) [8, 9]. Этот консорциум, неофициально называемый «Tox21» – «Токсикология в 21 веке», был создан для решения следующих задач:

- 1) приоритизация веществ для дальнейшей углубленной токсикологической оценки;
- 2) определение механизмов действия для дальнейшего изучения (например, путей токсичности, связанных с заболеванием);
- 3) разработка моделей, которые точно прогнозируют влияние веществ на биологические реакции (прогностическая токсикология);
- 4) использование методов тестирования на клетках человека (подходы *in vitro*);
- 5) сокращение времени, усилий и затрат, связанных с тестированием;
- 6) сокращение и замена животных, используемых в тестах на токсичность.

Исследования программы Tox21 были разделены на 3 этапа (табл. 1).

<sup>1</sup> Toxicology in the 21st Century. <https://tox21.gov/>

**Таблица 1.** Этапы реализации программы «Токсикология в 21 веке» (Tox21)<sup>2</sup>**Table 1.** Implementation phases of the Toxicology in the 21st Century (Tox21)<sup>2</sup> programme

Этапы	Продолжительность	Достигнутые результаты
I	2005–2010 гг.	Разработаны методы высокопроизводительного скрининга для тестирования химических веществ. Начало формирования библиотеки Tox21 10K
II	2011–2016 гг.	Создание полного спектра клеточных анализов для дальнейшего определения и характеристики активности, выявленной в первоначальных тестах с использованием технологии высокопроизводительного скрининга (Quantitative high-throughput screening, qHTS). Формирование полной библиотеки химических соединений Tox21 10K
III	2014 г. – настоящее время	Увеличение разнообразия клеточных линий человека для разработки моделей. Внедрение 2D- и 3D-модельных систем, развитие токсикогеномики, скрининг экспрессии генов для получения информации из всего транскриптома. Продолжение исследований по разработке моделей <i>in vitro</i> для изучения токсичности химических веществ

Таблица составлена авторами по данным интернет-источника / The table is prepared by the author using data from the online source

На первом этапе (до 2010 г.) партнеры Tox21 использовали технологию высокопроизводительного скрининга (quantitative high-throughput screening, qHTS) для тестирования около 2800 соединений в более чем 75 анализах, проведенных в Национальном центре химической геномики США (National Chemical Genomics Center, NCGC; ныне часть NCATS). За это время Национальный центр вычислительной токсикологии Агентства по охране окружающей среды с помощью программы ToxCast™ также проверил 309 уникальных соединений в более чем 500 биохимических тестах<sup>3</sup>. Эти соединения также были протестированы в лаборатории WormTox в NTP. Так началось создание библиотеки химических соединений.

На втором этапе (до 2014 г.) партнерами Tox21 проанализировано 200 баз данных химических веществ и лекарственных препаратов в США и за рубежом, выбраны и протестированы перспективные соединения. В этот период участники Tox21 создали полный спектр клеточных тестов для дальнейшего определения и характеристики активности, выявленной в первоначальных тестах qHTS. Полученные результаты могут быть использованы для оценки неблагоприятного влияния химических веществ на биологические процессы, влекущие за собой нарушения здоровья человека. В 2012 г. участники консорциума заявили о завершении формирования основной части библиотеки Tox21 10K [10], но сбор и публикация данных qHTS продолжались до 2019 г., и библиотека постоянно пополнялась.

С 2014 г. по настоящее время исследования Tox21 находятся на III этапе. Усилия специалистов

программы направлены на разработку тестов *in vitro*, наиболее полно отражающих функционирование здорового организма человека и изменения, возникающие при различных болезнях. Партнеры Tox21 разработали «Федеральную программу США по Tox21: стратегический и оперативный план дальнейшего лидерства» [8]. В этом документе были определены пять ключевых направлений для реализации программы<sup>4</sup>:

1. Разработка альтернативных тест-систем, прогнозирующих токсичность для человека и реакцию на дозу.

2. Устранение основных технических ограничений существующих систем тестирования *in vitro*.

3. Курация (сохранение архивных данных) исследований *in vivo* и их характеристика (изучение вариабельности качественных и количественных данных) для оценки возможных отличий от результатов, получаемых в исследованиях *in vitro*.

4. Обеспечение доверия ученых к системам тестирования *in vitro* и интегрированным батареям тестов.

5. Уточнение и внедрение методов *in vitro* для изучения фармакокинетических характеристик.

Одним из конкретных направлений, выделенных NTP на III этапе выполнения Tox21, является увеличение биологического разнообразия клеточных линий человека, используемых в тестировании соединений с помощью qHTS. Кроме того, NTP исследует как монослойные, так и трехмерные (3D) клеточные системы. Эти 3D-модели используются при изучении

<sup>2</sup> Tox21 Research Phases. <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/tox21/phases>

<sup>3</sup> <https://www.epa.gov/chemical-research/exploring-toxcast-data>

<sup>4</sup> <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/tox21>

метаболизма и позволяют оценить влияние химических веществ на биологические системы. Еще одной задачей Tox21 на III этапе является скрининг экспрессии генов для получения информации из всего транскриптома (то есть всех экспрессированных молекул РНК в клетке или биологическом образце) о реакции биологических систем на воздействие химических веществ (токсикогеномика). Один из подходов в этом проекте – разработка гибридного метода отбора генов для создания целевого набора генов и его использования в высокопроизводительной транскриптомике [11].

## Направления исследований программы Tox21 и полученные результаты

### Создание библиотеки соединений Tox21 10K

Традиционные методы изучения токсичности потенциальных лекарственных препаратов, которые используются разработчиками, как правило, оценивают одно химическое соединение в течение месяцев или даже лет. Чтобы ускорить этот процесс, партнеры консорциума Tox21 создали библиотеку соединений, называемую «библиотекой Tox21 10K», которая включает информацию о 10000 химических веществ, и число их постоянно увеличивается [10]. Каждый из участников программы Tox21 – EPA, NTP и NCATS – привнес отдельные, частично перекрывающиеся библиотеки соединений, что позволило сформировать полную базу данных для скрининга, характеризующуюся широкой разновидностью химических структур, особенностей и свойств веществ, конечных точек для оценки их токсичности. Это самая большая библиотека соединений, когда-либо созданная специально для улучшения понимания химических основ токсичности в научно-исследовательской работе и при создании нормативно-правовой базы, регламентирующей вопросы разработки и применения химических веществ, которые могут иметь потенциальное воздействие на здоровье человека [10].

Отличительной чертой библиотеки Tox21 10K является ее доступность, что позволяет обеспечивать информационную поддержку фундаментальным исследованиям в области медицины. Библиотека представлена на структурно-ориентированной химико-информационной платформе PubChem<sup>5</sup>, это первая крупная

общедоступная финансируемая государством работа по созданию и публикации результатов биоанализа с применением технологий qHTS [10]. Участники консорциума Tox21 и другие разработчики лекарственных препаратов используют библиотеку для быстрого и эффективного исследования потенциальных токсических эффектов химических соединений. Кроме того, библиотека Tox21 10K включает фармацевтическую коллекцию NCATS (данные о группе соединений, составляющей более 90% от всех одобренных FDA препаратов), поэтому исследователи Tox21 могут напрямую тестировать токсические эффекты лекарственных средств, уже выведенных на фармацевтический рынок.

Разработчики Tox21 10K предлагают использовать представленную информацию для создания моделей, позволяющих прогнозировать токсичность химических веществ до того, как будут проведены экспериментальные исследования. Библиотека может обеспечить качественный набор данных для обучения вычислительных моделей в области биоинформатики, компьютерного моделирования и прогнозирования. Участники консорциума Tox21 провели конкурс Tox21 Data Challenge 2014<sup>6</sup>, в рамках которого ученые работали над созданием наиболее точных прогнозистических моделей с использованием Tox21 10K. В нем приняли участие более 100 команд со всего мира, а модели, набравшие наибольшее количество баллов, показали точность 80–90% при прогнозировании токсичности соединений.

На основе данных Tox21 10K сотрудниками исследовательского центра биоинформатики государственного университета Северной Каролины, США (Research Center for Bioinformatics, North Carolina State University, USA), отдела внутренних исследований / отделения биостатистики и вычислительной биологии NIH (Department of Internal Research / Bioinformatics and Computational Biosciences Branch DIR/BCBB) и NIEHS создан веб-сервер Tox21BodyMap<sup>7</sup>, позволяющий пользователю идентифицировать органы-мишени в организме человека, на которые исследуемое вещество с большей вероятностью будет оказывать воздействие. Мишени химических соединений, выявленные с использованием данных о тканеспецифической экспрессии генов и высокопроизводительного скрининга, были нанесены разработчиками на карту органов человека. Пользователи могут

<sup>5</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

<sup>6</sup> <https://tripod.nih.gov/tox21/challenge/>

<sup>7</sup> <https://sandbox.ntp.niehs.nih.gov/bodymap/>

вести химическое вещество из библиотеки Tox21 и регулировать пределы экспрессии генов, а также пороговые значения полумаксимальной концентрации активности  $AC_{50}$  для исследования органной специфичности химического вещества. Потенциальными возможностями использования Tox21BodyMap являются определение приоритетных химических веществ, анализ механизмов действия, выявление пробелов в результатах анализов и разработка дизайна исследований *in vivo*. Однако этот уникальнейший научный ресурс имеет ряд ограничений, обусловленных, во-первых, неравным количеством проведенных анализов химических веществ, входящих в библиотеку Tox21. Во-вторых, целевое сопоставление результатов тестов проведено только для 33 органов. Важно отметить, что картирование не учитывает характеристики ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion), оно отражает потенциальное влияние химических веществ на определенный путь в конкретном органе, что может быть использовано, например, для разработки новых клеточных моделей, но не показывает распределение химического вещества во всем организме [12]. В будущем для совершенствования и повышения эффективности такого подхода могут быть исследованы альтернативные ресурсы, включая экспрессию белков (например, Human Protein Atlas) и РНК (например, Genotype-Tissue Expression, GTEx). Можно ранжировать органы по типам тканей, а также учитывать половые различия, которые могут влиять на эффекты химических веществ [12].

#### **Высокопроизводительный скрининг для тестирования токсичности химических соединений**

Использование технологии qHTS *in vitro* для тестирования химических соединений, включенных в Tox21 10K [13], обусловлено возможностью с высокой скоростью проводить скрининг десятков тысяч соединений при различных концентрациях (как правило, 15 концентраций, от ~0,5 нМ до ~92 мкМ), чтобы получить кривые «концентрация–ответ», определяющие активность соединения. Таким образом были идентифицированы вещества с широким спектром эффектов и низким уровнем ложноположительных или ложноотрицательных результатов [14]. Применение qHTS было направлено на устранение неспособности традиционных методов тестирования токсичности справиться

со все возрастающим объемом химических веществ, по которым отсутствовали данные о безопасности, и биологических путях, по которым реализуется их негативное действие [10]. Например, в Реестре Закона о контроле за токсичными веществами (Toxic Substances Control Act Inventory, TSCAI) EPA в 1982 г. насчитывалось около 62 000 химических веществ, а в настоящее время их уже около 85 000<sup>8</sup>.

Программа Tox21 с начала своей реализации стала мировым лидером в создании и применении qHTS [10]. Результаты этих исследований были успешно использованы для быстрой оценки активности и токсичности лекарственных препаратов, которые применялись в комплексной терапии COVID-19 в период пандемии. В тестах qHTS была проанализирована эффективность препаратов в отношении различных мишеней и сигнальных путей, задействованных при проникновении вируса в клетку и его репликации, процессах воспаления и острых повреждениях легких [15].

Выявлено, что бромгексин, будесонид, флувоксамин и нитазоксанид, использовавшиеся при COVID-19 в качестве потенциальных лекарственных средств, оказывали положительные эффекты за счет уменьшения вирусной нагрузки, а колхицин, иматиниб и никлозамид способствовали облегчению симптомов заболевания. Их эффекты были опосредованы модуляцией сигнальных путей ядерных рецепторов, включая Nrf2/ARE (nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2 / antioxidant response element), уменьшением стресса эндоплазматического ретикулума и влиянием на такие мишени, как HDAC (histone deacetylase), путем изменения регуляции экспрессии ангиотензин-превращающего фермента 2-го типа (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) и TMPRSS2 (prostate-localised and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease), которые являются основными факторами клетки-хозяина, повышающими патогенность SARS-CoV-2. При этом для некоторых лекарственных препаратов (хлорпромазин, эметин, лопинавир, ритонавир, никлозамид и нитазоксанид) была выявлена цитотоксичность в *in vitro* исследованиях, что, вероятно, связано с их влиянием на множество мишеней. И хотя цитотоксичность *in vitro* зарегистрирована при микромолярных концентрациях, результаты указывают на потенциальную опасность многократного применения или высоких доз этих лекарственных препаратов [15].

<sup>8</sup> <https://www.epa.gov/tscainventory/how-access-tscainventory>

### Клеточные модели для изучения безопасности лекарственных средств

Для изучения действия химических соединений программа Tox21 рекомендует использование клеток человека во всех случаях, когда это возможно, чтобы устранить видовые различия в ответной реакции. При разработке *in vitro* тестов участники консорциума первоначально анализировали цитотоксичность 1408 соединений, ранее изученных в одном или нескольких традиционных токсикологических тестах, на 13 типах клеток (9 человеческих, 2 крысиных и 2 мышиных) [16]. Использовали клеточные линии, штаммы и первичные клеточные популяции разных тканей. В тестируемом диапазоне концентраций были соединения, обладающие цитотоксичностью как для всех типов клеток, так и только для одного или нескольких. Аналогичные данные были получены при скрининге соединений, влияющих на апоптоз [17]. Эти результаты показали, что ни одна из разновидностей клеток не может быть универсально информативной в отношении цитотоксичности или апоптоза, но использование нескольких типов клеток позволяет объединять соединения в группы по характеру реакции [16, 17].

Также изучалось влияние химических веществ на внутриклеточные стрессорные пути и активность ядерных рецепторов. Среди стрессорных путей рассматривались повреждение ДНК, стресс эндоплазматического ретикулума, тепловой шок, воспалительная реакция, повреждение митохондрий. Такой подход основывался на предположении, что соединения, которые индуцируют одну или несколько реакций на стресс, более вероятно будут проявлять *in vivo* токсичность, чем те, которые не индуцируют подобную реакцию. Для тестирования были выбраны ядерные рецепторы человека (андроген, арилуглеводород, эстроген- $\alpha$ , фарнезоид X, глюкокортикоид, X-рецептор печени, пролифераторы пероксисом- $\alpha$ , - $\delta$  и - $\gamma$ , прогестерон, прегнан X, ретиноид X, тироид- $\beta$ , витамин D) в связи с ключевой ролью, которую они играют в эндокринных и метаболических путях передачи сигналов [18]. Усилия Tox21 направлены на выявление максимального количества молекулярных внутриклеточных путей, нарушение которых под действием химических соединений приводит к возникновению вредных для здоровья человека эффектов и неблагоприятных последствий для организма. На основе информации об этих путях разрабатываются комплексы

тестов для проведения экспериментов и оценки нарушений в ключевых путях токсичности на моделях клеточных линий предпочтительно человеческого происхождения [6, 19].

В рамках программы Tox21 разработан протокол анализа калиевых ионных каналов hERG на клетках линии U2OS остеосаркомы человека, стабильно экспрессирующей эти каналы [20]. В этой связи наиболее подходящих для идентификации химических соединений, ингибирующих их активность. Метод используется для прогноза кардиотоксичности химических веществ [21]. Изоформа Kv11.1 у человека, кодирующаяся геном *hERG* (human ether- $\alpha$ -go-go-related gene), в последние годы вызывает повышенный интерес, поскольку ее дисфункция связана с синдромом удлинённого интервала QT (long QT syndrome, LQTS), вызывающим желудочковую аритмию типа «пируэт» (torsades de pointes), фибрилляцию желудочков и внезапную смерть [22]. Поскольку синдром удлинённого интервала QT может быть результатом лекарственной блокады канала [23], hERG признан основной антимишенью при скрининге препаратов-кандидатов. Выбор клеточной линии человека для оценки кардиотоксичности обусловлен также различиями в формировании потенциала действия у человека и грызунов [24]. Основные несоответствия связаны с разнообразием распределения и плотности калиевых каналов и характером их открытия во время фазы реполяризации [25].

Выявлено, что лекарственные препараты из нескольких классов, включая антигистаминные [26], антиаритмические [27], нейролептики [28], противомаларийные [29], антибиотики [30], гастропрокинетики [31], вызывают синдром удлинённого интервала QT, связанный с hERG. В США с 1953 по 2013 г. около 30% лекарственных средств было изъято из обращения из-за развития этой нежелательной реакции [32]. Примером является терфенадин, антигистаминный препарат, отозванный с рынка FDA в 1997 г. из-за его способности блокировать hERG [33]. В настоящее время FDA требует оценивать кардиотоксичность всех потенциальных лекарственных препаратов на каналах hERG до проведения доклинических исследований [34, 35].

В базе Tox21 Public Available Assays<sup>9</sup> имеется протокол изучения влияния лекарственных препаратов на жизнеспособность гепатоцитов (гепатотоксичность), активность каспазы и апоптоз на клеточной линии HepG2 гепатоцеллюлярной

<sup>9</sup> <https://tripod.nih.gov/tox/assays>

карциномы человека с высокой степенью дифференцировки. Анализ химических веществ из библиотеки соединений Tox21 10K позволил идентифицировать более 800 веществ, в той или иной степени снижающих потенциал митохондриальной мембраны (mitochondrial membrane potential, MMP) в клетках линии HepG2. Использование данного показателя для скрининга токсичных веществ обосновывается тем, что химические соединения, любыми путями воздействующие на функции и структурную целостность митохондрий, в конечном итоге изменяют MMP. В процессе скрининга идентифицировано несколько структурных мотивов, возможно потенциальных токсикофоров, в структуре химических веществ, наиболее часто связанных со снижением MMP, что может служить дополнительным маркером для выявления соединений, обладающих токсическим действием [36].

Широко используется протокол анализа жизнеспособности в отношении нормальных клеток человека в реальном времени с использованием клеточной линии HEK293, полученной из эмбриональных клеток почки человека. HEK293 наиболее широко используется среди клеточных линий человека<sup>10</sup> благодаря ее высокой трансфективности, быстрой скорости роста и способности расти в бессывороточной суспензионной культуре [37].

Использование клеточных культур для изучения токсичности лекарственных препаратов имеет ряд недостатков, ограничивающих их применение. Например, линии клеток печени для изучения гепатотоксичности: HepG2 не экспрессирует цитохромы P450 [38], HepaRG не производит мочевины в определяемых концентрациях [39], первичные гепатоциты человека (primary human hepatocytes, PHH) являются наиболее универсальной моделью клеток печени [40], однако быстро подвергаются дедифференцировке в 2D-культуре [41], теряют метаболическую активность и не делятся *in vitro*, что затрудняет получение большого количества клеток линии PHH для высокопроизводительного скрининга. Человеческие плюрипотентные стволовые клетки (pluripotent stem cells, PSC) привлекают внимание исследователей способностью бесконечно размножаться и дифференцироваться в гепатоцитоподобные клетки *in vitro*, однако они имеют незрелый фенотип [42, 43]. Кроме того, печень состоит из нескольких

типов клеток, включая холангиоциты, звездчатые клетки, клетки Купфера и синусоидальные эндотелиальные клетки. Каждый из этих типов клеток играет определенную роль в регуляции функции печени [44].

#### **Органы-на-чипах – новый подход к изучению токсичности**

Модели на основе изолированных клеточных культур являются недостаточно эффективными из-за отсутствия физиологически релевантной трехмерной тканевой среды [45, 46]. В этой связи были созданы клеточные культуры с трехмерным каркасом для имитации архитектуры тканей *in vivo*, а затем и микроинженерные конструкции на основе законов микрогидродинамики, объединяющие несколько типов клеток – так называемые органы-на-чипах. Они вошли в список 10 лучших новых технологий, способных оказать наибольшее влияние на решение проблем медико-биологической науки. Благодаря сочетанию клеточной биологии, инженерии и технологии биоматериалов микросреда чипа имитирует микроокружение органа с точки зрения взаимодействия тканей и механической стимуляции. Такая конструкция отражает структурные и функциональные характеристики тканей человека и позволяет прогнозировать реакцию на множество стимулов, включая лекарственные средства и воздействие окружающей среды [45, 47]. Уникальным преимуществом органов-на-чипах является возможность интегрировать процессы метаболизма и токсичности лекарственных препаратов в одном устройстве, что облегчает оценку безопасности их метаболитов [48].

Участники консорциума Tox21 NCATS и FDA в сотрудничестве с другими институтами и центрами NIH возглавляют программу Tissue Chip for Drug Screening<sup>11</sup> по разработке чипов тканей человека, которые моделируют структуру и функции человеческих органов (легкие, печень, сердце) для более быстрого и эффективно прогнозирования безопасности лекарственных средств.

Разработка печени-на-чипе позволила успешно воспроизвести и изучить различные варианты гепатотоксичности (гепатоцеллюлярное повреждение, стеатоз, холестаз и фиброз) с использованием клеток разных видов (крысы, собаки и человека) [49]. Так, с помощью печени-на-чипе была показана гепатотоксичность

<sup>10</sup> <https://www.synthego.com/hek293>

<sup>11</sup> <https://ncats.nih.gov/tissuechip>

для человека противогрибкового препарата тербинафина [50].

Для обнаружения лекарственно-индуцированной нефротоксичности была разработана высокопроизводительная 3D микрожидкостная платформа на чипе Nephroscreen [51]. Она может включать либо линию клеток почечных канальцев человека ciPTEC-OAT1, условно иммортализованные эпителиальные клетки проксимальных почечных канальцев (proximal tubule epithelial cell, PTEC) с повышенной экспрессией транспортеров органических анионов 1 (OAT-1), либо линию RPTEC (primary renal proximal tubule epithelial cells), контрольные клетки, клон SA7K. Отбор клеточных линий имел важное методологическое значение: обе были человеческие и подходили для тестирования со средней и высокой пропускной способностью. Линия ciPTEC-OAT1 обладает чувствительностью к анионным веществам, а клетки RPTEC показали очень хорошие результаты при оценке межлекарственных взаимодействий. Надежность и сопоставимость результатов, полученных с использованием модели Nephroscreen, была успешно подтверждена в нескольких лабораториях для четырех модельных препаратов: цисплатина, тенофовира, тобрамицина и циклоспорина А, которые влияют на проксимальные канальцы [51, 52].

Для изучения заболеваний сердца и кардиотоксичности химических веществ были разработаны модели сердца-на-чипе на основе человеческих культур клеток, поскольку между клетками сердца животных и человека имеется значительная разница [53–55]. Основные различия связаны с  $K^+$ -каналами IKto и IKur, которые оказывают влияние на реполяризацию желудочков у крыс и мышей, а у людей она в большей степени зависит от IKr и IKs. Это несоответствие приводит к формированию зубца J вместо сегмента ST и нечеткому зубцу T на электрокардиограмме мыши [25]. Также имеются противоречивые данные о зависимости между интервалом QT и частотой сердечных сокращений у грызунов, в то время как у человека частота сердечных сокращений в значительной степени влияет на потенциал действия и QT [24].

Различия в типе и характере активации калиевых каналов при развитии потенциала действия у крысы/мыши и человека являются важнейшим ограничением использования мышиных моделей при изучении кардиотоксичности лекарственных препаратов. Одним из вариантов преодоления таких ограничений было создание сердца-на-чипе путем культивирования

кардиомиоцитов, полученных из стволовых клеток hiPSC-CM, на мягком микроформованном желатине, что позволяло сформировать структуру, напоминающую нативную архитектуру миокарда человека. Данную систему использовали для исследования кардиотоксичного пролекарства терфенадина и его нетоксичного метаболита фексофенадина [56]. Сердце-на-чипе, созданное путем инновационной технологии 3D-биопечати и содержащее кардиомиоциты человека, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, применяли для оценки токсических эффектов цитостатического препарата доксорубицин [57].

Разработано большое количество моделей чипов гематоэнцефалического барьера, что связано с его важной ролью в доставке многих нейроактивных терапевтических соединений, а также в развитии многих неврологических заболеваний [58–60]. Создана почка-на-чипе, высланная первичным эпителием проксимальных канальцев, который экспрессирует белок транспортер Р-гликопротеин, представляющий собой АТФ-зависимый насос для ксенобиотиков. Данную модель использовали для исследования токсичности цисплатина. Важно отметить, что результаты анализа токсичности цитостатика и активность Р-гликопротеина, измеренные с использованием модели на чипе, лучше коррелировали с ответами *in vivo*, чем результаты, полученные при использовании монослойного культивирования клеток [61]. Существуют и другие органы-на-чипах, например, кишечник, легкие [46, 48, 62].

Мультиорганы-на-чипе, иначе называемые человек-на-чипе, позволяют изучить токсическое действие лекарственных препаратов одновременно на несколько органов. Например, при изучении влияния препарата на миокард сердце соединяют флюидным каналом с печенью-на-чипе, чтобы можно было одновременно оценить гепатотоксичность [63]. Разработанные к настоящему времени модели могут иметь от 2 до 10 различных органов-на-чипе и обеспечивать имитацию сложных физиологических и патофизиологических реакций [64]. Например, в работе S.Y. Chang и соавт. [65] была использована комплексная модель взаимодействующих друг с другом почки и печени-на-чипе для определения механизмов биоактивации и транспорта аристолоховой кислоты (соединения, обладающего доказанными нефротоксичными и канцерогенными свойствами). Модель легкие + печень-на-чипе была протестирована

при добавлении в систему известного канцерогена афлатоксина В1. Печень-на-чипе детоксицировала это вещество, в результате чего клетки бронхов пострадали в гораздо меньшей степени, чем в случае добавления к ним токсина в той же концентрации в отсутствие клеток печени в системе [66, 67].

Несмотря на успешно проводимые исследования, использование органов-на-чипе до настоящего времени не регламентировано нормативными документами по регистрации лекарственных средств [68]. Необходимым условием для их полного внедрения в доклинические исследования безопасности и эффективности лекарственных препаратов является соответствие таким критериям, как валидность, надежность, чувствительность.

#### **Органоиды для прогностических токсикологических исследований лекарственных средств**

Для преодоления ограничений, возникающих при использовании клеточных моделей для изучения токсичности, при поддержке участников программы Tox21 NIEHS, NTP, NCATS разрабатываются органоиды. Они представляют собой миниатюрные органы, полученные из стволовых клеток взрослых тканей (adult tissue-resident stem cells, ASC) или PSC *in vitro* [69] и формируются как трехмерные (3D) тканеподобные структуры за счет их самоорганизации, самообновления и способности к дифференцировке [70]. Органоиды анатомически и функционально близки к органам живого организма [71]. С использованием этой методологии была проведена оценка 238 препаратов, в том числе 32 отрицательных контроля и 206 зарегистрированных лекарственных средств, обладающих гепатотоксичностью [72]. В качестве показателей служили транспортная активность желчных кислот и жизнеспособность клеток. Результаты показали высокую степень прогноза токсичности с чувствительностью 88,7% и специфичностью 88,9%. Обнаружено также, что холестаза, вызванный бозентаном, ассоциирован с полиморфизмом CYP2C9\*2, то есть при использовании органоидов печени человека может быть выявлена различная чувствительность к лекарственному препарату, основанная на генетическом полиморфизме [72].

Токсичность лекарственных препаратов, в том числе представленных на фармацевтическом рынке, изучается также с использованием

разработанных участниками программы Tox21 органоидов сердца, почек, кишечника и мозга. Однако в настоящее время не существует стандартизированного метода прогнозирования лекарственной безопасности на органоидах, и количество отчетов, описывающих такие исследования, ограничено. Тем не менее попытки использования таких моделей не прекращаются [73, 74].

#### **Токсикогеномика**

Консорциум Tox21 разрабатывает новые технологии, которые обеспечивают мультиплексное считывание изменений в глобальном транскриптоме. Транскриптомика стала использоваться токсикологами в контексте токсигеномики, представляющей собой совокупность технологий, применяемых в токсикологии для анализа экспрессии генов. Профилирование генов и белков в результате токсигеномных исследований позволяет получить новую информацию о тех частях генома, которые реагируют на повреждение токсическими веществами, а не изучать гены по отдельности. Основная цель токсигеномики – выявление новых биомаркеров и генных сигнатур токсичности химических веществ, которые позволят классифицировать токсиканты в соответствии со степенью риска для здоровья, выявлять потенциальные побочные эффекты задолго до того, как будут обнаружены какие-либо патологические изменения, и проводить мониторинг безопасности применения лекарственных препаратов значительно точнее, чем существующие индикаторы [75].

Ключевой проблемой токсигеномики является низкая воспроизводимость результатов из-за того, что данные получены с использованием разных клеточных линий в разных лабораториях с разными технологиями, используемыми геномными платформами и методами анализа полученных результатов [76]. Организация экономического сотрудничества и развития (Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD) предприняла попытку применить принципы надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice, GLP) в токсигеномике и начала разработку стандартного протокола проведения исследований по скринингу токсичных соединений<sup>12</sup>. Однако даже при стандартном GLP-подобном протоколе дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) могут значительно различаться в зависимости от выбора способа обработки данных

<sup>12</sup> <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/toxicogenomics.htm>

и статистических методов [76]. Эта так называемая проблема «воспроизводимости вычислений» является серьезной для токсикогеномики. Маловероятно, что удастся разработать единый метод анализа, который универсально подходит для каждого исследования и каждого измеряемого гена. Тем не менее можно следовать общему правилу, предложенному консорциумом контроля качества (MicroArray / Sequencing Quality Control, MAQC/SEQC)<sup>13</sup> под руководством FDA — определению воспроизводимого профиля ДЭГ: ранжирование генов по кратности изменения при сравнении с таковыми, не подвергавшимися обработке химическим веществом [77]. Проект MAQC помогает совершенствовать микрочипы и технологии секвенирования нового поколения, а также способствовать их надлежащему применению при обнаружении, разработке и анализе продуктов, регулируемых FDA.

#### **Оценка пригодности методов нового подхода для изучения токсичности**

В 2019 г. EPA взяло на себя обязательство сократить испытания на животных и финансирование на одну треть к 2025 г. и полностью отказаться от них к 2035 г. [78]. Для достижения этой цели они поддерживают разработку так называемых «методов нового подхода» (new approach methods, NAM) — любых методов без использования животных, которые могут применяться для предоставления информации токсичности химических соединений [79].

Участники программы Tox21 и другие федеральные структуры США разрабатывают стратегии, при помощи которых можно оценить пригодность альтернативных методов для конкретных целей, устанавливают критерии оценки эффективности и предиктивности методов. Межведомственный координационный комитет по валидации альтернативных методов (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM)<sup>14</sup> проводит научную проверку и техническую оценку альтернативных методов испытаний и способствует интеграции их в практику регуляторной токсикологии США для сокращения или отказа от использования животных [80, 81].

В начале 2018 г. ICCVAM опубликовал «Стратегическую дорожную карту по установлению новых подходов к оценке безопасности химических веществ и изделий медицинского

назначения в США». Одной из рабочих групп, созданных для ее реализации, является Рабочая группа по острой токсичности (Acute Toxicity Workgroup, ATWG), которая разработала план выявления, оценки и применения новых методологий для замены исследований острой системной токсичности *in vivo*. Был создан прогностический *in silico* метод определения острой пероральной системной токсичности, основанный на большом наборе результатов исследований на грызунах и ориентированный на законодательные требования федеральных агентств к безопасности лекарственных препаратов [82].

Обзор методов без использования животных, предложенных для тестирования безопасности, соответствующего нормативным требованиям, представлен на сайте ресурса Системы отслеживания альтернативных методов (Tracking System for Alternative Methods, TSAR)<sup>15</sup>, предоставленной Справочной лабораторией Европейского союза по альтернативам тестированию на животных (European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM)). TSAR проводит мониторинг статуса альтернативного метода от подачи на валидацию до принятия путем включения в нормативную базу.

#### **Заключение**

Проведенный анализ информации о новых подходах к изучению токсичности химических веществ показал, что специалистами консорциума Tox21 получен, обобщен и проанализирован большой массив данных по альтернативным моделям *in vitro* и новым технологиям для изучения токсичности химических соединений, в том числе лекарственных средств. Данные созданной в рамках программы Tox21 уникальной доступной исследователям библиотеки, содержащей информацию о 10 000 химических веществ с широким спектром химических структур, позволяют осуществлять быстрый и эффективный скрининг токсичности новых веществ и выявлять побочные эффекты уже используемых лекарственных препаратов.

В рамках программы Tox21 разработаны высокопроизводительные скрининговые *in vitro* методы, различные модели с использованием клеточных линий человека, тканевых чипов, органоидов, а также омиксных технологий. Результаты исследований, проведенных специалистами консорциума Tox21, подготовили базу

<sup>13</sup> <https://www.fda.gov/science-research/bioinformatics-tools/microarraysequencing-quality-control-maqcseqc>

<sup>14</sup> <https://ntp.niehs.nih.gov/go/natl-strategy>

<sup>15</sup> <https://tsar.jrc.ec.europa.eu/>

для перехода от изучения токсичности химических веществ *in vivo* к новым *in vitro* методам, обеспеченным новыми инструментами и технологиями. В рамках программы Tox21 разрабатываются стратегии валидации и имплементации альтернативных методов.

Новые подходы для оценки токсического воздействия на человека химических соединений

позволят сократить сроки проведения исследований, а также внедрить методы, дающие возможность значительно уменьшить использование лабораторных животных при разработке лекарственных средств. Однако для полного достижения целей программы Tox21 потребуется еще много времени и усилий международного научного сообщества.

## Литература / References

- Hamm J, Sullivan K, Clippinger AJ, Strickland J, Bell S, Bhatarai B, et al. Alternative approaches for identifying acute systemic toxicity: moving from research to regulatory testing. *Toxicol In Vitro*. 2017;41:245–59. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.004>
- Choudhuri S, Patton GW, Chanderbhan RF, Mattia A, Klaassen CD. From classical toxicology to Tox21: some critical conceptual and technological advances in the molecular understanding of the toxic response beginning from the last quarter of the 20th century. *Toxicol Sci*. 2018;161(1):5–22. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx186>
- Pound P, Ritskes-Hoitinga M. Is it possible to overcome issues of external validity in preclinical animal research? Why most animal models are bound to fail. *J Transl Med*. 2018;16:304. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1678-1>
- McGonigle P, Ruggeri B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation. *Biochem Pharmacol*. 2014;87(1):162–71. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.08.006>
- Felter SP, Boobis AR, Botham PA, Brousse A, Greim H, Hollnagel HM, et al. Hazard identification, classification, and risk assessment of carcinogens: too much or too little? – Report of an ECETOC workshop. *Crit Rev Toxicol*. 2020;50(1):72–95. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1727843>
- Wolf CR, Henderson CJ. Use of transgenic animals in understanding molecular mechanisms of toxicity. *J Pharm Pharmacol*. 1998;50(6):567–74. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1998.tb06889.x>
- Wang P, Shehu AI, Ma X. The opportunities of metabolomics in drug safety evaluation. *Curr Pharmacol Rep*. 2017;3(1):10–5. <https://doi.org/10.1007/s40495-016-0079-5>
- Thomas RS, Paules RS, Simeonov A, Fitzpatrick SC, Crofton KM, Casey WM, et al. The US Federal Tox21 Program: a strategic and operational plan for continued leadership. *ALTEX*. 2018;35(2):163–8. <https://doi.org/10.14573/altex.1803011>
- Roper C, Tanguay RL. Tox21 and adverse outcome pathways. In: Roper C, Tanguay RL, eds. *An introduction to interdisciplinary toxicology. From molecules to man*. Elsevier; 2020. P. 559–68.
- Richard AM, Huang R, Waidyanatha S, Shinn P, Collins BJ, Thillainadarajahet I, et al. The Tox21 10K compound library: collaborative chemistry advancing toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2021;34(2):189–216. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00264>
- Mav D, Shah RR, Howard BE, Auerbach SS, Bushnell PR, Collins JB, et al. A hybrid gene selection approach to create the S1500+ targeted gene sets for use in high-throughput transcriptomics. *PLoS One*. 2018;13(2):e0191105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191105>
- Borrel A, Auerbach SS, Houck KA, Kleinstreuer NC. Tox21BodyMap: a webtool to map chemical effects on the human body. *Nucleic Acids Research*. 2020;48(W1):W472–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa433>
- Attene-Ramos MS, Miller N, Huang R, Michael S, Itkin M, Kavlock RJ, et al. The Tox21 robotic platform for the assessment of environmental chemicals – from vision to reality. *Drug Discov Today*. 2013;18(15–16):716–23. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.05.015>
- Tice RR, Austin CP, Kavlock RJ, Bucher JR. Improving the human hazard characterization of chemicals: a Tox21 update. *Environ Health Perspect*. 2013;121(7):756–65. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205784>
- Sakamuru S, Huang R, Xia M. Use of Tox21 screening data to evaluate the COVID-19 drug candidates for their potential toxic effects and related pathways. *Front Pharmacol*. 2022;13:935399. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.935399>
- Xia M, Huang R, Witt KL, Southall N, Fostel J, Cho MH, et al. Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environ Health Perspect*. 2008;116(3):284–91. <https://doi.org/10.1289/ehp.10727>
- Huang R, Southall N, Cho MH, Xia M, Inglese J, Austin CP. Characterization of diversity in toxicity mechanism using *in vitro* cytotoxicity assays in quantitative high throughput screening. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(3):659–67. <https://doi.org/10.1021/tx700365e>
- Huang R, Xia M, Cho M-H, Sakamuru S, Shinn P, Houck KA, et al. Chemical genomics profiling of environmental chemical modulation of human nuclear receptors. *Environ Health Perspect*. 2011;119(8):1142–8. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002952>
- Andersen ME, McMullen PD, Krewski D. Developing tools for defining and establishing pathways of

- toxicity. *Arch Toxicol.* 2015;89(5):809–12.  
<https://doi.org/10.1007/s00204-015-1512-y>
20. Zhao J, Xia M. Cell-based hERG channel inhibition assay in high-throughput format. *Methods Mol Biol.* 2022;2474:21–8.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2213-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2213-1_3)
21. Lee H-M, Yu M-S, Kazmi SR, Oh SY, Rhee K-H, Bae M-A, et al. Computational determination of hERG-related cardiotoxicity of drug candidates. *BMC Bioinformatics.* 2019;20(Suppl 10):250.  
<https://doi.org/10.1186/s12859-019-2814-5>
22. Farzam K, Tivakaran VS. *QT Prolonging Drugs*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. PMID: 30521285.
23. Nachimuthu S, Assar MD, Schussler JM. Drug-induced QT interval prolongation: mechanisms and clinical management. *Ther Adv Drug Saf.* 2012;3(5):241–53.  
<https://doi.org/10.1177/2042098612454283>
24. Mulla W, Murninkas M, Levi O, Etzion Y. Incorrectly corrected? QT interval analysis in rats and mice. *Front Physiol.* 2022;13:1002203.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1002203>
25. Joukar S. A comparative review on heart ion channels, action potentials and electrocardiogram in rodents and human: extrapolation of experimental insights to clinic. *Lab Anim Res.* 2021;37(1):25.  
<https://doi.org/10.1186/s42826-021-00102-3>
26. Olasińska-Wiśniowska A, Olasiński J, Grajek S. Cardiovascular safety of antihistamines. *Postepy Dermatol Alergol.* 2014;31(3):182–6.  
<https://doi.org/10.5114/pdia.2014.43191>
27. Lazzara R. Antiarrhythmic drugs and torsade de pointes. *Eur Heart J.* 1993;14:88–92.  
[https://doi.org/10.1093/eurheartj/14.suppl\\_H.88](https://doi.org/10.1093/eurheartj/14.suppl_H.88)
28. Chohan PS, Mittal R, Javed A. Antipsychotic medication and QT prolongation. *Pak J Med Sci.* 2015;31(5):1269–71.  
<https://doi.org/10.12669/pjms.315.8998>
29. Traebert M, Dumotier B. Antimalarial drugs: QT prolongation and cardiac arrhythmias. *Expert Opin Drug Saf.* 2005;4(3):421–31.  
<https://doi.org/10.1517/14740338.4.3.421>
30. Mason JW. Antimicrobials and QT prolongation. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(5):1272–4.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkw591>
31. Keller GA, Di Girolamo G. Prokinetic agents and QT prolongation: a familiar scene with new actors. *Curr Drug Saf.* 2010;5(1):73–8.  
<https://doi.org/10.2174/157488610789869166>
32. Onakpoya IJ, Heneghan CJ, Aronson JK. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature. *BMC Med.* 2016;14:10.  
<https://doi.org/10.1186/s12916-016-0553-2>
33. Roy M, Dumaine R, Brown AM. HERG, a primary human ventricular target of the non-sedating antihistamine terfenadine. *Circulation.* 1996;94(4):817–23.  
<https://doi.org/10.1161/01.cir.94.4.817>
34. Wang Z, Mussa HY, Lowe R, Glen RC, Yan A. Probability based hERG blocker classifiers. *Mol Inform.* 2012;31(9):679–85.  
<https://doi.org/10.1002/minf.201200011>
35. Garrido A, Lepailleur A, Mignani SM, Dallemagne P, Rochais C. hERG toxicity assessment: useful guidelines for drug design. *Eur J Med Chem.* 2020;195:112290.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112290>
36. Attene-Ramos MS, Huang R, Michael S, Witt KL, Richard A, Tice RR, et al. Profiling of the Tox21 chemical collection for mitochondrial function to identify compounds that acutely decrease mitochondrial membrane potential. *Environ Health Perspect.* 2015;123(1):49–56.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.1408642>
37. Brodaczevska KK, Szczylik C, Fiedorowicz M, Porta C, Czarnecka AM. Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Mol Cancer.* 2016;15(1):83.  
<https://doi.org/10.1186/s12943-016-0565-8>
38. Guo L, Dial S, Shi L, Branham W, Liu J, Fang JL, et al. Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2011;39(3):528–38.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.110.035873>
39. Lübberstedt M, Müller-Vieira U, Mayer M, Biemel KM, Knöspel F, Knobloch D, et al. HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment *in vitro*. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2011;63(1):59–68.  
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.04.013>
40. Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Conde I, Donato MT. Competency of different cell models to predict human hepatotoxic drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014;10(11):1553–68.  
<https://doi.org/10.1517/17425255.2014.967680>
41. Elaut G, Henkens T, Papeleu P, Snykers S, Vinken M, Vanhaecke T, Rogiers V. Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures. *Curr Drug Metab.* 2006;7(6):629–60.  
<https://doi.org/10.2174/138920006778017759>
42. Schwartz RE, Fleming HE, Khetani SR, Bhatia SN. Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Biotechnol Adv.* 2014;32(2):504–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.01.003>
43. Baxter M, Withey S, Harrison S, Segeritz CP, Zhang F, Atkinson-Dell R, et al. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J Hepatol.* 2015;62(3):581–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.016>
44. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol.* 2017;27(21):R1147–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
45. Esch EW, Bahinski A, Huh D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(4):248–60.  
<https://doi.org/10.1038/nrd4539>
46. Cho S, Yoon J-Y. Organ-on-a-chip for assessing environmental toxicants. *Curr Opin Biotechnol.*

- 2017;45:34–42.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.019>
47. Wu Q, Liu J, Wang X, Feng L, Wu J, Zhu X, et al. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *Biomed Eng Online*. 2020;19(1):9.  
<https://doi.org/10.1186/s12938-020-0752-0>
  48. Cong Y, Han X, Wang Y, Chen Z, Lu Y, Liu T, et al. Drug toxicity evaluation based on organ-on-a-chip technology: a review. *Micromachines (Basel)*. 2020;11(4):381.  
<https://doi.org/10.3390/mi11040381>
  49. Jang KJ, Otieno MA, Ronxhi J, Lim HK, Ewart L, Kodella KR, et al. Reproducing human and cross-species drug toxicities using a Liver-Chip. *Sci Transl Med*. 2019;11(517):eaax5516.  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aax5516>
  50. Tavares RSN, Tao TP, Maschmeyer I, Maria-Engler SS, Schäfer-Korting M, Winter A, et al. Toxicity of topically applied drugs beyond skin irritation: static skin model vs. two organs-on-a-chip. *Int J Pharm*. 2020;589:119788.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119788>
  51. Vriend J, Vormann MK, Lanz HL, Joore J, Trietsch SJ, Russel FGM, et al. Nephroscreen: a robust and versatile renal tubule-on-a-chip platform for nephrotoxicity assessment. *Curr Opin Toxicol*. 2021;25:42–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2021.03.001>
  52. Vormann MK, Vriend J, Lanz HL, Gijzen L, van den Heuvel A, Hutter S, et al. Implementation of a human renal proximal tubule on a chip for nephrotoxicity and drug interaction studies. *J Pharm Sci*. 2021;110(4):1601–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.01.028>
  53. Richter W, Xie M, Scheitrum C, Krall J, Movsesian MA, Conti M. Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. *Comparative Study Basic Res Cardiol*. 2011;106(2):249–62.  
<https://doi.org/10.1007/s00395-010-0138-8>
  54. Walweel K, Li J, Molenaar P, Imtiaz MS, Quail A, dos Remedios CG, et al. Differences in the regulation of RyR2 from human, sheep, and rat by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> in the cytoplasm and in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol*. 2014;144(3):263–71.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.201311157>
  55. Jasníc-Savović J, Nestorović A, Savić S, Karasek S, Vitulo N, Valle G, et al. Profiling of skeletal muscle Ankrd2 protein in human cardiac tissue and neonatal rat cardiomyocytes. *Histochem Cell Biol*. 2015;143(6):583–97.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-015-1307-5>
  56. Kujala VJ, Pasqualini FS, Goss JA, Nawroth JC, Parker KK. Laminar ventricular myocardium on a microelectrode array-based chip. *J Mater Chem B*. 2016;4(20):3534–43.  
<https://doi.org/10.1039/C6TB00324A>
  57. Zhang YS, Arneri A, Bersini S, Shin SR, Zhu K, Goli-Malekabad Z, et al. Bioprinting 3D microfibrous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip. *Biomaterials*. 2016;110:45–59.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.003>
  58. Park TE, Mustafaoglu N, Herland A, Hasselkus R, Mannix R, FitzGerald EA, et al. Hypoxia-enhanced blood–brain barrier chip recapitulates human barrier function and shuttling of drugs and antibodies. *Nat Commun*. 2019;10(1):2621.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10588-0>
  59. Vatine GD, Barrile R, Workman MJ, Sances S, Bariga BK, Rahnama M, et al. Human iPSC-derived blood–brain barrier chips enable disease modeling and personalized medicine applications. *Cell Stem Cell*. 2019;24(6):995–1005.e6.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.05.011>
  60. Padiaditakis I, Kodella KR, Manatakis DV, Le CY, Hinojosa CD, Tien-Street W, et al. Modeling  $\alpha$ -synuclein pathology in a human brain-chip to assess blood–brain barrier disruption. *Nat Commun*. 2021;12:5907.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-26066-5>
  61. Jang KJ, Mehr AP, Hamilton GA, McPartlin LA, Chung S, Suh KY, Ingber DE. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integr Biol (Camb)*. 2013;5(9):1119–29.  
<https://doi.org/10.1039/c3ib40049b>
  62. Dai M, Xiao G, Shao M, Zhang YS. The synergy between deep learning and organs-on-chips for high-throughput drug screening: a review. *Biosensors (Basel)*. 2023;13(3):389.  
<https://doi.org/10.3390/bios13030389>
  63. Xavier J, Venugopal A, Ashok A, Mohanan PV. 23 – Organ-on-a-chip for toxicity evaluation. In: Mohanan PV, ed. *Biomedical product and materials evaluation. Standards and ethics*. Elsevier; 2022. P. 611–33.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823966-7.00017-7>
  64. Ingber DE. Human organs-on-chips for disease modelling, drug development and personalized medicine. *Nat Rev Genet*. 2022;23(8):467–91.  
<https://doi.org/10.1038/s41576-022-00466-9>
  65. Chang SY, Weber EJ, Sidorenko VS, Chapron A, Yeung CK, Gao C, et al. Human liver-kidney model elucidates the mechanisms of aristolochic acid nephrotoxicity. *JCI Insight*. 2017;2(22):e95978.  
<https://doi.org/10.1172/jci.insight.95978>
  66. Bovard D, Sandoz A, Luettich K, Frentzel S, Iskandar A, Marescotti D, et al. A lung/liver-on-a-chip platform for acute and chronic toxicity studies. *Lab Chip*. 2018;18(24):3814–29.  
<https://doi.org/10.1039/c8lc01029c>
  67. Ferrari E, Rasponia M. Liver–heart on chip models for drug safety. *APL Bioeng*. 2021;5(3):031505.  
<https://doi.org/10.1063/5.0048986>
  68. Piergiovanni M, Leite SB, Corvi R, Whelan M. Standardisation needs for organ on chip devices. *Lab Chip*. 2021;21(15):2857–68.  
<https://doi.org/10.1039/d1lc00241d>
  69. Bartfeld S, Clevers H. Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *J Mol Med (Berl)*. 2017;95(7):729–38.  
<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1531-7>
  70. Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an *in vitro* model of human development and disease. *Nat*

- Cell Biol.* 2016;18(3):246–54.  
<https://doi.org/10.1038/ncb3312>
71. Kim J, Koo BK, Knoblich JA. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(10):571–84.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-020-0259-3>
  72. Shinozawa T, Kimura M, Cai Y, Saiki N, Yoneyama Y, Ouchi R, et al. High-fidelity drug-induced liver injury screen using human pluripotent stem cell-derived organoids. *Gastroenterology.* 2021;160(3):831–46. e10.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.10.002>
  73. Matsui T, Shinozawa T. Human organoids for predictive toxicology research and drug development. *Front Genet.* 2021;12:767621.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.767621>
  74. Ooka M, Zhao J, Shah P, Travers J, Klumpp-Thomas C, Xu X, et al. Identification of environmental chemicals that activate p53 signaling after *in vitro* metabolic activation. *Arch Toxicol.* 2022;96(7):1975–87.  
<https://doi.org/10.1007/s00204-022-03291-5>
  75. Merrick BA, Paules RS, Tice RR. Intersection of toxicogenomics and high throughput screening in the Tox21 program: an NIEHS perspective. *Int J Biotechnol.* 2015;14(1):7–27.  
<https://doi.org/10.1504/IJBT.2015.074797>
  76. Liu Z, Huang R, Roberts R, Tong W. Toxicogenomics – a 2020 vision. *Trends Pharmacol Sci.* 2019;40(2):92–103.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.12.001>
  77. MAQC Consortium; Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol.* 2006;24(9):1151–61.  
<https://doi.org/10.1038/nbt1239>
  78. Grimm D. U.S. EPA to eliminate all mammal testing by 2035. *Science.* 10.09.2019.  
<https://doi.org/10.1126/science.aaz4593>
  79. Escher B, Neale P, Leusch F. Chapter 9: *In vitro* assays for the risk assessment of chemicals. In: Escher B, Neale P, Leusch F. *Bioanalytical tools in water quality assessment.* IWA Publishing; 2021. P. 143–68.
  80. Spielmann H, Kandárova H. Integration of advanced technologies into regulatory toxicology. In: Reichl FX, Schwenk M, eds. *Regulatory Toxicology.* Springer; 2021. P. 149–61.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-36206-4\\_34-2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-36206-4_34-2)
  81. Karmaus AL, Bialk H, Fitzpatrick S, Krishan M. State of the science on alternatives to animal testing and integration of testing strategies for food safety assessments: workshop proceedings. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2020;110:104515.  
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104515>
  82. Kleinstreuer NC, Karmaus A, Mansouri K, Allen DG, Fitzpatrick JM, Patlewicz G. Predictive models for acute oral systemic toxicity: a workshop to bridge the gap from research to regulation. *Comput Toxicol.* 2018;8(11):21–4.  
<https://doi.org/10.1016/j.comtox.2018.08.002>

**Вклад авторов.** Автор подтверждает соответствие своего авторства критериям ICMJE.

**Authors' contributions.** The author confirms that she meets the ICMJE criteria for authorship.

## ОБ АВТОРЕ / AUTHOR

**Перфилова Валентина Николаевна**, д-р биол. наук, профессор  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2457-8486>  
[vnperfilova@mail.ru](mailto:vnperfilova@mail.ru)

Поступила 06.06.2023  
После доработки 28.08.2023  
Принята к публикации 30.08.2023  
Online first 26.09.2023

**Valentina N. Perfilova**, Dr. Sci. (Biol.), Professor  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2457-8486>  
[vnperfilova@mail.ru](mailto:vnperfilova@mail.ru)

Received 6 June 2023  
Revised 28 August 2023  
Accepted 30 August 2023  
Online first 26 September 2023