

УДК 615.015.44:612.354
<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-351>

Обзорная статья | Review



Оценка лекарственной гепатотоксичности *in vitro* на клеточных моделях (обзор)

И.А. Мазеркина[✉]

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

✉ Контактное лицо: Мазеркина Ирина Анатольевна mazerkina@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Лекарственная гепатотоксичность составляет 15–18% от общего числа всех причин отзыва лекарственных препаратов из оборота при пострегистрационном применении. Стандартные доклинические исследования *in vivo* на лабораторных животных часто бывают нерелевантны из-за видоспецифичных различий с человеком. Перспективной альтернативой является разработка методов доклинических исследований *in vitro* на клеточных культурах.

Цель работы — обзор современных клеточных моделей для определения лекарственной гепатотоксичности *in vitro*.

Клетки, используемые для изучения механизмов гепатотоксичности *in vitro*, должны обладать специфичным метаболизмом и активностью ферментных и транспортных систем печени. Представлен обзор по основным клеточным культурам (первичные гепатоциты, бессмертные клеточные линии, гепатоцит-подобные клетки, полученные из стволовых клеток, и сокультуры из гепатоцитов и непаренхиматозных клеток) и конфигурациям клеточных систем. Продемонстрировано, что совершенствование клеточных систем происходит в направлении увеличения продолжительности жизни и функциональной сохранности клеток, усложнения конфигурации и клеточного состава с приближением к условиям *in vivo*. Установлено, что лекарственное повреждение печени может происходить вследствие образования химически активных метаболитов, развития оксидативного стресса, митохондриального повреждения, внутриклеточного накопления токсических желчных кислот при ингибировании транспортеров, активации адаптивной иммунной системы. В связи с этим для исследования лекарственной гепатотоксичности применяют различные методики, в том числе инновационные технологии (одновременного многопараметрического скрининга, транскриптомики, протеомики, метаболомики) для получения, хранения и обработки большого объема данных. Клеточные модели могут использоваться не только для выявления лекарственной гепатотоксичности, но и для изучения механизмов повреждения печени. Наиболее перспективными являются омик-технологии, создание сложных моделей с сокультивированием различных типов клеток и органы-на-чипе.

Ключевые слова: гепатотоксичность; лекарственное повреждение печени; исследования *in vitro*; клеточные культуры; клеточные модели; орган-на-чипе; омик-технологии; транскриптомика; протеомика; метаболомика; доклинические исследования

Для цитирования: Мазеркина И.А. Оценка лекарственной гепатотоксичности *in vitro* на клеточных моделях (обзор). *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2023;11(2):131–144. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-351>

In Vitro Assessment of Drug-Induced Liver Injury Using Cell-Based Models: A Review

I.A. Mazerkina✉

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

✉ Corresponding author: Irina A. Mazerkina mazerkina@expmed.ru

ABSTRACT

Drug-induced liver injury (DILI) is the reason for 15–18% of medicinal product recalls from the market. Since interspecies differences often limit the relevance of standard non-clinical tests *in vivo*, a promising alternative is to develop cell-based *in vitro* methods.

The aim of the study was to review current advances in cell modelling for the *in vitro* identification of DILI.

In vitro mechanistic studies of DILI require cells that exhibit activity specific to hepatic metabolising enzymes and transporters. This article reviews the main cell cultures (primary human hepatocytes, immortal cell lines, stem cell-derived hepatocyte-like cells, co-cultures of hepatocytes and non-parenchymal liver cells) and their configurations. The optimisation of cell systems is directed towards enhancing their viability, functionality, compositional and configurational complexity, thus bringing them closer to *in vivo* models. Potential DILI causes include chemically reactive metabolites, oxidative stress, mitochondrial damage, intracellular accumulation of toxic bile acids resulting from transporter inhibition, and adaptive immune system activation. Accordingly, DILI studies rely on various methods, including innovative technologies for acquisition, storage, and analysis of large datasets (e.g. high-content screening, transcriptomics, proteomics, and metabolomics). Cell models are applicable to both DILI identification and mechanistic studies. Currently, the most promising technologies are omics, complex co-culture models, and organ-on-a-chip systems.

Key words: hepatotoxicity; drug-induced liver injury; *in vitro* studies; cell cultures; cell models; organ-on-a-chip; omics; transcriptomics; proteomics; metabolomics; non-clinical studies

For citation: Mazerkina I.A. *In vitro* assessment of drug-induced liver injury using cell-based models: a review. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2023;11(2):131–144. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2023-11-2-351>

Введение

Лекарственная гепатотоксичность (ЛГТ) является одной из ведущих причин отзыва лекарственных препаратов из гражданского оборота на пострегистрационном этапе (15–18% от общего числа отзывов) [1]. Это не только актуальная проблема лекарственной безопасности, но и причина серьезного экономического ущерба для фармацевтической отрасли: разработка нового лекарственного средства (ЛС) занимает до 10–15 лет и в среднем обходится в 1,4 млрд долларов [2, 3].

Доклинические исследования *in vivo* имеют высокую себестоимость, при их проведении необходимо неукоснительное соблюдение принципов этики, но основным их недостатком при исследовании гепатотоксичности является несовпадение метаболизма и транспорта ЛС, связанное с межвидовыми гено- и фенотипическими различиями. Например, важная

изоформа цитохрома P450 CYP3A, участвующая у человека в метаболизме до 50% ЛС, обладает неодинаковой субстратной специфичностью и выраженной вариабельностью индукции, достигающей 20–30-кратных различий у разных видов [4]. По данным разных авторов, от 38 до 51% веществ, оказывающих воздействие на печень у человека, не вызывают сходных эффектов у лабораторных животных [5]. Это стало стимулом поиска альтернативных методов доклинических тестирований, из которых наибольший интерес представляют исследования на клеточных культурах.

Клетки — первый уровень организации, на котором можно оценить нарушение взаимодействия и структуры субклеточных компонентов и определить механизмы повреждений при воздействии различных факторов. Механизм лекарственного повреждения печени может быть связан с непосредственным действием ЛС или его

метаболита, а также с накоплением токсичных веществ или желчных кислот в результате нарушения транспорта при ингибировании транспортеров [6], поэтому клетки для исследования гепатотоксичности *in vitro* должны обладать специфичным метаболизмом и активностью ферментных и транспортных систем.

Цель работы — обзор современных клеточных моделей для определения лекарственной гепатотоксичности *in vitro*.

Сверхтонкие срезы печени

Наиболее физиологически полная модель для исследования печени *in vitro* с воспроизведением ее архитектуры и сохранением всех межклеточных взаимодействий, с экспрессией генов, связанных с всасыванием, распределением, метаболизмом и выведением, — это сверхтонкие срезы печени. На сверхтонких срезах печени проводились исследования последствий ингибирования различных клеточных путей (например, митохондриальное бета-окисление) [7], лекарственного ингибирования/индукции изоферментов CYP [8], функции печеночных транспортеров [9], механизмов ЛГТ, связанных с воспалительным стрессом, и определение потенциальных биомаркеров повреждения печени [10]. Из-за сложности получения, низкой жизнеспособности и неравномерного распределения ЛС в срезах большого распространения данная методика не получила.

Клеточные культуры

Для моделирования ЛГТ используют первичные гепатоциты, бессмертные клеточные линии, гепатоцит-подобные клетки, полученные из стволовых клеток, и совместные культуры (сокультуры) из гепатоцитов и непаренхиматозных клеток (НПК) [11]. Кроме выбора клеток для получения необходимых свойств модели важен способ выращивания или конфигурация модели.

Первичные гепатоциты человека считаются «золотым стандартом» для изучения процессов в печени. Первичные гепатоциты получают из резецированных участков печени, из печеночной ткани, не подходящей для трансплантации, или приобретают в коммерческих клеточных банках. При посеве они приобретают полигональную форму и формируют плотные межклеточные контакты. Обладают такими функциональными характеристиками, как синтез альбумина, мочевины, активность цитохромов P450 и транспортеров. Основными

недостатками первичных гепатоцитов человека являются сложный путь получения, непродолжительный срок жизни и быстрая потеря функциональной активности [6].

Для удлинения срока жизни клеток предложена технология Upcyte® — трансдукция генов, вызывающих пролиферацию клеток. Модифицированные по технологии Upcyte® гепатоциты имеют улучшенную способность к пролиферации по сравнению с первичными гепатоцитами и обладают активностью ферментов 1-й и 2-й фаз биотрансформации. Также у них хорошо сохранена функция каналикулярных эффлюксных транспортеров, а при использовании в двухмерной конфигурации «сэндвич» — экспрессия полипептидных транспортеров органических анионов OATP1B1 и OATP2B1 (organic anion-transporting polypeptides, OATP), натрий таурохолат совместно транспортирующего полипептида NTCP (Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide) и транспортера органических катионов OCT1 (organic cation transporters, OCT) [12].

Бессмертные клеточные линии. В отличие от первичных гепатоцитов бессмертные клеточные линии доступны, легко культивируются, обладают стабильным фенотипом и способностью неограниченно размножаться. Используются клеточные линии, полученные из гепатоцеллюлярной карциномы: HepG2, HepaRG, HuH7, Hep3B и THLE [13]. Клетки HepG2 обладают морфологией и некоторыми функциями гепатоцитов, секретируют альбумин и α -фетопроtein, но обладают низкой экспрессией и активностью метаболических ферментов и транспортеров, поэтому не могут использоваться для исследования токсичности метаболитов ЛС [14]. Контролируемую экспрессию цитохрома P450 можно получить векторной трансфекцией, однако избыточная экспрессия может также исказить результат теста. К общим недостаткам бессмертных клеточных линий относится их ограниченная метаболическая и транспортная активность [14]. Есть сообщения, что при длительном выращивании у клеток линии HuH7 проявляется активность некоторых изоферментов P430 и транспортеров, участвующих в переносе желчных кислот [15], но широкого распространения эта линия для исследования лекарственного транспорта и метаболизма не получила.

Гепатоцит-подобные клетки получают из стволовых клеток эмбриона, мезенхимальных стволовых клеток или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Специальные протоколы выращивания

позволяют получить зрелые клетки со свойствами первичных гепатоцитов: синтез мочевины, жиров, секреция альбуминов и лекарственный метаболизм [16, 17].

Совместные культуры (сокультуры). Поскольку токсическое воздействие на печень *in vivo*, как правило, затрагивает не один тип клеток, были разработаны совместные культуры (сокультуры) из нескольких типов клеток. В качестве сокультивируемых вместе с гепатоцитами используют НПК печени (синусоидальные эндотелиальные клетки, клетки Купфера, звездчатые клетки и холангиоциты), фибробласты и иммунные клетки. Было показано, что при сокультивировании с НПК фенотип первичных гепатоцитов становится ближе к таковому *in vivo* [18, 19]. Сокультуры изучены меньше, чем первичные гепатоциты, некоторые клетки, например звездчатые и синусоидальные эпителиальные клетки, плохо растут *in vitro* и теряют свои свойства через несколько дней [20]. Произвольно высеянные совместные культуры разных типов клеток могут содержать монослойные участки с неоптимальным межклеточным взаимодействием, что приводит к нестабильности и низкой функциональности, поэтому для увеличения взаимодействия клеток разработаны протоколы выращивания микроструктурированных сокультур (micropatterned co-cultures) — структурированный последовательный посев культур, например первичных гепатоцитов и НПК [21].

К сокультурам можно отнести клеточную линию НераRG — человеческие бипотентные клетки-предшественники, полученные из опухоли печени, ассоциированной с гепатитом С, которые способны развиваться в два фенотипа клеток — гепатоцит-подобные и билиарные. Клетки НераRG обладают стабильной во времени экспрессией и активностью метаболизирующих ферментов 2-й фазы и транспортеров, как у первичных гепатоцитов, и могут использоваться для исследования повторных доз ЛС. На клетках НераRG проводились исследования механизмов токсического действия ЛС, вызывающих внутрипеченочный холестаз и стеатоз, поскольку клетки НераRG обладают поляризацией, регуляцией экспрессии транспортеров, выработкой желчных кислот (ЖК) и липогенезом [22].

Недавно появился новый способ продления жизни и функционирования первичных клеток — условное репрограммирование (conditional reprogramming). Это сокультивирование первичных клеток с инактивированными фибробластами мыши 3T3-J2 в присутствии ингибитора

Rho-ассоциированной протеинкиназы (ROCK), что приводит к обретению первичными клетками характеристик стволовых при сохранении их способности к дифференцировке [23]. S. Su и соавт. вырастили первичные гепатоциты, взятые от пациентов с различными заболеваниями, используя метод условного репрограммирования, и получили увеличение продолжительности жизни с сохранением активности CYP и продукцией альбумина. Результаты исследования также показали, что клетки более молодых пациентов имели большую продолжительность жизни и пролиферативную активность, а экспрессия альбумина в клетках, полученных от пациентов старшего возраста, была ниже [24].

Конфигурации клеточных систем для исследования гепатотоксичности

Продолжительность жизни и функциональная активность клеток зависят от конфигурации системы. Это обусловлено тем, что *in vivo* клетки находятся в постоянном многофакторном взаимодействии непосредственно с соседними клетками, а также посредством сигнальных путей — с другими клетками и системами организма.

Двухмерные (2D) системы. 2D-система — это самая простая конфигурация, представляет собой слой клеток, высеянный на плотный субстрат, обработанный белками экстрацеллюлярного матрикса (коллаген, фибронектин или матригель). Свойства первичных клеток при посеве в монослой очень быстро угасают. Для предотвращения быстрых изменений используют конфигурацию «сэндвич», в которой плотный монослой гепатоцитов расположен между слоями коллагена или специальной прослойки. Наличие с двух сторон каркаса стабилизирует клетки, происходит поляризация клеток с образованием базолатеральной, апикальной и каналикулярной поверхностей, улучшается секреция органических соединений, активность ферментов и транспортеров, имитируется билиарная экскреция, а также удлиняется продолжительность жизни первичных гепатоцитов по сравнению с обычным монослоем. Такая конфигурация позволяет изучать гепатобилиарный транспорт ЛС, регуляцию транспортных белков, межлекарственное взаимодействие и гепатотоксичность [25–28].

Модификацией системы «сэндвич» является микроструктурированное сокультивирование. D.R. Berger и соавт. [29] предложили систему, в которой между мембранами были высеяны

островки из гепатоцит-подобных клеток в окружении фибробластов. Такая сокультура имела преимущества в плане созревания гепатоцит-подобных клеток, активности и продолжительности их функционирования по сравнению с теми же клетками, высеянными обычным методом.

Трехмерные (3D) системы. Дальнейшее совершенствование клеточных систем привело к созданию трехмерных моделей: сфероидов, систем, построенных с помощью биопечати, и органов-на-чипе.

Сфероиды — это округлые конгломераты, образующиеся из гепатоцитов, помещенных в гелевую среду при определенных условиях. Сфероиды получают из клеточных линий — производных гепатомы, первичных гепатоцитов или гепатоцит-подобных клеток, полученных из стволовых. Чтобы преодолеть некроз, развивающийся в центре сфероида из-за нарушения диффузии питательных веществ, кислорода, а также накопления ЖК при большом размере, используются методы унификации размеров сфероидов, например система «подвешенной капли» [30]. С.С. Bell и соавт. [31] провели в 6 лабораториях сравнение моделей из первичных гепатоцитов, выращенных в конфигурациях «сэндвич» и сфероид. Были получены сходные результаты между лабораториями, показавшие более длительную стабильность экспрессии белков и большую чувствительность к гепатотоксичным ЛС в сфероидах по сравнению с двухмерной культурой. R. Kostadinova и соавт. [32] создали трехмерные модели печени человека и крысы из гепатоцитов и НПК, включая эндотелиальные клетки сосудов и желчных протоков, клетки Купфера и звездчатые клетки. Архитектура и взаимодействие между разными типами клеток способствовали сохранению функции не только гепатоцитов, но и НПК до 3 месяцев (секреция альбумина, синтез мочевины, активность изоферментов CYP, транспортеров, синтез гликогена, ответ на воспалительные стимулы). Системы отличались более высокой чувствительностью к токсическим веществам по сравнению с двухмерными, что позволяло использовать дозы ЛС, близкие к терапевтическим, и проводить исследование повторных доз. Ответ на воздействие видоспецифичных гепатотоксикантов (фенофибрат — для грызунов, троглитазон — для человека) показал, что такие системы также могут использоваться для исследований видоспецифичной лекарственной токсичности. S.U. Vorrink и соавт. [33] определяли

количественное изменение АТФ на сфероидах из первичных гепатоцитов при воздействии 123 ЛС с наличием/отсутствием гепатотоксических свойств; были показаны 69% чувствительность и 100% специфичность данной модели для определения ЛГТ.

Биопечать — построение на 3D-принтере трехмерной каркасной конструкции из матрикса и клеток. I. Ide и соавт. [34] создали с помощью биопринтера сфероиды из сокультуры гепатоцитов и звездчатых клеток человека. Функциональность системы, определявшаяся по уровню АТФ, альбумина и мочевины, сохранялась более 25 суток. В работе K. Schmidt и соавт. [35] трехмерная матрица, распечатанная из дифференцированных клеток HepaRG, альгинат-желатинового гидрогеля, жидкого матрикеля и среды William's E, использовалась для сравнительной оценки токсичности афлатоксина В1. Модель показала более длительное выживание и устойчивость клеток к токсину по сравнению с двухмерной системой, а также лучшее восстановление синтеза альбумина после 1 и 2 недель токсического действия.

Большая продолжительность жизни и повышенная чувствительность к токсическим веществам позволяют рекомендовать системы трехмерной конфигурации для исследования хронической гепатотоксичности [31–35].

Печень-на-чипе. Достижения микрофлюидной инженерии позволили создавать миниатюрные клеточные системы *in vitro* — органы-на-чипе. В этих чипах, или микрофизиологических печеночных системах, отделения с различными тканями могут взаимодействовать друг с другом посредством секреции молекул. Перфузия культур обеспечивает обмен питательными веществами, лучшее снабжение кислородом и напряжение сдвига потока. В системе образуются агрегации округлых клеток, сходных по строению с гепатоцитами *in vivo*, с улучшенными и поддерживаемыми специфическими функциями печени. Для микрофлюидных систем используются первичные гепатоциты, гепатоцит-подобные клетки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs) и клетки HepG2 [36]. A. Rubiano и соавт. сравнивали гепатотоксические эффекты тровафлоксацина (фторхинолон) на сокультуру первичных гепатоцитов и клеток Купфера, выращенную в разных конфигурациях: «сэндвич», сфероиды и микрофизиологическая система [37]. Функциональность систем сравнивалась по активности цитохрома CYP3A4 и продукции альбумина, токсичность определялась

по высвобождению лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и снижению активности цитохрома. В микрофизиологической системе отмечена более высокая и длительная функциональная стабильность, а также более высокая чувствительность к токсическому действию по сравнению с другими моделями.

Полиорганные чипы. Микрофизиологические системы с клетками разных органов — это следующий шаг в моделировании, приближающий условия *in vitro* к живому организму. Комбинация органов в модели зависит от целей исследования: фармакокинетика, метаболизм, токсичность, метастазирование опухолей и др. Полиорганные системы для исследования токсичности обычно включают модель печени, поскольку многие ЛС метаболизируются печенью [38]. Т. Bricks и соавт. [39] для исследования метаболизма и транспорта фенаcetина использовали систему из клеток печени HepG2 и кишечника Caco-2. С. Oleaga и соавт. [40] в системе из клеток сердца, мышц, печени и нейронов исследовали ответ на воздействие ЛС с известным токсическим потенциалом: доксирубина, аторвастатина, вальпроевой кислоты, парацетамола, N-ацетил-m-аминофенола, — и показали соответствие реакции разных типов клеток известным данным по воздействию этих веществ на органы. Основные проблемы в использовании систем орган-на-чипе — высокая стоимость и сложность масштабирования для моделирования релевантного взаимодействия между тканями.

Показатели гепатотоксичности *in vitro*

При определении повреждающего действия ЛС на печень проводят тесты *in vitro* по оценке общей цитотоксичности либо устанавливают конечные точки с учетом повреждающих механизмов: образование химически активных метаболитов и активных форм кислорода, ингибирование транспортных белков или ферментов, повреждение митохондрий, эндоплазматический ретикулярный стресс, оксидативный стресс и др.

Показатели цитотоксичности. Оценка цитотоксичности обычно используется как скрининг, позволяющий определить собственную токсичность вещества как представителя определенного класса, а также для исследования взаимосвязи химической структуры и активности/токсичности вещества. К методам оценки цитотоксичности относят простой подсчет клеток, биохимическую оценку основных клеточных процессов или продуктов, оценку целостности

мембраны как признака некроза или апоптоза, определение лизосомальной функции, клеточной морфологии, пролиферации, гепатоцеллюлярных маркеров (продукция мочевины и альбуминов, микроРНК122) [13, 41].

Цитотоксичность показывает высокую корреляцию с системной толерантностью и общей токсичностью ЛС в исследованиях на лабораторных животных [42]. Определение цитотоксичности является простым, недорогим и быстрым способом определения потенциально гепатотоксичных ЛС, но не позволяет установить молекулярные процессы при ЛГТ и не дает информации касательно непрямого идиосинкратического ЛГТ [13, 43, 44].

Образование активных метаболитов. Химически активные метаболиты образуются в печени в 1-ю фазу биотрансформации и могут стать причиной истощения гепатопротекторных механизмов, что, в свою очередь, приводит к развитию оксидативного стресса. Кроме того, ковалентно связываясь с белками, метаболиты могут вызывать их модификацию с появлением антигенных свойств, что приводит к каскаду событий с включением комплексного иммунного ответа при развитии идиосинкратического ЛГТ [44]. Химически активные метаболиты обычно определяют в тесте ковалентного связывания (количественная оценка радиоактивно меченого вещества, связавшегося с белками микросом) [45] или в тестах-ловушках, в которых используют вещества, способные утилизировать электрофильные метаболиты путем связывания с образованием аддуктов, определяемых методом масс-спектрометрии [46].

Оксидативный стресс. Оксидативный стресс развивается при дисбалансе образования активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантной активности клетки. Определяется оценкой количества АФК, уровня перекисного окисления липидов, истощения глутатиона и/или активации путей стресса, например пути фактора NRF2 [47, 48].

Митохондриальная токсичность. Митохондрией производят более 90% клеточной энергии в форме АТФ и регулируют некоторые сигнальные пути, в том числе некроза и апоптоза. Для выявления митохондриальной токсичности оценивают митохондриальный мембранный потенциал, резервную емкость окислительно-фосфорилирования, активность различных комплексов электронно-транспортной цепи митохондрий, бета-окисление жирных кислот, уровень митохондриальной ДНК (мтДНК) и синтеза митохондриальных белков, митохондриальный

оксидативный стресс, изменение синтеза АТФ в глюкозо-галактозном тесте и др. [49].

Механизмы лекарственной митохондриальной токсичности разнообразны: тиазолидиндионы, например, нарушают функцию митохондрий прямым ингибированием цепи транспорта электронов, а нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) могут прервать транспорт электрона при синтезе АТФ. При этом рассеивается митохондриальный мембранный потенциал и снижается или прекращается образование АТФ. Парацетамол, доксирубицин и этанол индуцируют оксидативный стресс через окислительно-восстановительный цикл или образование АФК [50]. Прямое или не прямое ингибирование бета-окисления жирных кислот может вызвать накопление капель жира в гепатоцитах — микровезикулярный стеатоз [51]. Лекарственная митохондриальная токсичность также может быть результатом повреждающего действия некоторых ЛС на репликацию мтДНК [52] или ингибирования синтеза митохондриальных белков, например оксазолидинонами [53].

Глюкозо-галактозный тест проводят с использованием клеточной линии HepG2. В отличие от первичных гепатоцитов в клетках HepG2 АТФ образуется двумя путями: гликолизом и окислительным фосфорилированием. В глюкозо-галактозном тесте на клетках HepG2 определяют токсическое воздействие ЛС на митохондрии, сравнивая образование АТФ в богатой галактозой среде, в которой запускается путь окислительного фосфорилирования с образованием АТФ в клетках в богатой глюкозой среде, в которой преобладает гликолиз [54].

Повреждение митохондрий также оценивают по изменению митохондриального дыхания и высвобождению молочной кислоты при гликолизе. Митохондриальное дыхание оценивается по изменению скорости потребления кислорода, а гликолиз — по высвобождению молочной кислоты, которое определяется скоростью внеклеточного закисления [55]. В стресс-тестах могут измеряться другие показатели, связанные с механизмом действия, например определение резервной биоэнергетической емкости [56]. Клеточные модели с длительным сроком жизни позволяют определять нарушения репликации мтДНК или синтеза белков, кодирующихся мтДНК. S. Nadanaciva и соавт. [57] определяли нарушение синтеза белков митохондрий по соотношению комплекс IV / фратаксин методом иммунохроматографического анализа, которое уменьшается при подавлении репликации мтДНК и синтеза белка.

Несмотря на имеющиеся сведения о токсическом действии многих ЛС на функцию митохондрий *in vitro*, информации о корреляции действия митохондриальных токсикантов с изменениями *in vivo* не так много, возможно, в связи с высоким уровнем ложноположительных результатов в тестах из-за использования высоких концентраций ЛС [58].

Лекарственный холестаз. Лекарственное холестатическое повреждение печени связано с нарушением транспорта и накоплением ЖК в клетке. Высокие концентрации ЖК обладают клеточной токсичностью и морфологически вызывают гепатоцеллюлярное повреждение в отличие от классического клинического холестатического поражения вследствие нарушения оттока [59].

Транспорт ЖК регулируется АТФ-зависимыми транспортерами, в частности транспортным белком BSEP (bile salt export pump). Предполагается, что ингибирование или подавление BSEP является основным механизмом развития лекарственного холестаза [60]. Для изучения взаимодействия ЛС с BSEP определяют изменения захвата производных таурохолевой кислоты в мембранные везикулы с экспрессией BSEP при воздействии ЛС [61], однако это исследование не позволяет оценить активность метаболитов ЛС и взаимодействие с другими транспортерами. Поэтому более физиологически релевантным является исследование транспорта на культурах в конфигурации «сэндвич», в которых по клиренсу тестового субстрата определяют уровень ингибирования транспортеров, при этом наличие работающих ферментов позволяет также учитывать влияние активных метаболитов [62]. В частности, было показано, что метаболит троглитазона (препарат отозван с фармацевтического рынка из-за способности вызвать идиосинкратическую ЛГТ) является более мощным ингибитором BSEP, чем сам троглитазон [63].

Следует отметить, что данные о связи ингибирования BSEP с идиосинкратической ЛГТ получены в исследованиях *in vitro*, в которых использовались концентрации ЛС, значительно превышающие концентрации в сыворотке *in vivo*, поэтому существуют сомнения относительно их прогностической ценности. Более вероятно, что ингибирование BSEP является одним из факторов стресса, способствующих иммуноопосредованному повреждению печени у пациентов с имеющейся предрасположенностью [64].

Активация иммунной системы. Адаптивной иммунной системе придается важное значение в развитии идиосинкратической ЛГТ, поэтому

продолжается разработка систем, позволяющих оценить взаимодействие клеток печени с клетками, участвующими в формировании иммунного ответа. Для исследования активации иммунной системы в ответ на действие ЛС предлагается использовать сокультуру клеток печени с эндотелиальными клетками печеночных синусов, клетками Купфера или звездчатыми клетками, поскольку известно, что они участвуют в иммунном ответе в качестве антигенпрезентирующих клеток [32, 65]. М.О. Ogege и соавт. [66] изучали влияние на дендритные клетки надосадочной жидкости (супернатанта), полученной после воздействия гепатотоксичных ЛС на первичные гепатоциты. Результаты исследования показали, что супернатант, содержащий молекулярные фрагменты, связанные с повреждением, стимулировал секрецию дендритными клетками провоспалительных цитокинов.

Инновационные технологии

Биотехнологические инновации в исследовании ЛГТ *in vitro* включают технологии, позволяющие осуществлять получение, хранение и обработку большого количества данных (Big Data).

Одновременный многопараметрический скрининг (*high-content screening, HCS*). HCS — это комбинация автоматизированной микроскопии с анализом изображений, позволяющая одновременно оценить комплекс параметров благодаря использованию флуоресцентных зондов-красителей. HCS позволяет одновременно оценивать целый спектр показателей: от клеточной жизнеспособности, накопления активных форм кислорода или повреждения эндоплазматического ретикулума до признаков развития холестаза, стеатоза или фосфолипидоза. Для теста HCS используют первичные гепатоциты человека, клеточные линии, полученные из опухолей, или гепатоцит-подобные клетки, полученные из стволовых клеток, а также сокультивированные клеточные системы [67]. Получение разнообразной информации на уровне отдельной клетки помогает углубить представление о механизме токсического действия ЛС. Р.Д. O'Brien и соавт. одними из первых применили одновременный многопараметрический скрининг на клетках HepG2, исследуя 243 ЛС с разной степенью гепатотоксичности [68]. Использовались 4 флуоресцентных красителя, позволявших оценивать площадь ядра, митохондриальный мембранный потенциал, проницаемость митохондриальной мембраны и внутриклеточную концентрацию кальция.

Определение токсического потенциала ЛС для человека показало 80% чувствительность и 90% специфичность при концентрации *in vitro*, равной 30-кратной максимальной эффективной концентрации.

Обычно HCS применяют на культурах в двухмерной конфигурации (монослой или «сэндвич»), но есть опыт получения и анализа изображений для HCS в трехмерной клеточной культуре [69]. HCS используется в фармацевтической индустрии для скрининга потенциальных ЛС на предмет гепатотоксичности и показал себя мощным инструментом прогнозирования ЛГТ на ранних этапах разработки благодаря высокой чувствительности по сравнению с общепринятыми методами [70, 71].

Для улучшения прогностической силы в плане потенциальной гепатотоксичности и повышения чувствительности HCS применяют в комбинации с другими методами, такими как транскриптомика или метаболомика.

Омик-технологии. В последнее время привлекают внимание и бурно развиваются новые подходы оценки гепатотоксичности в клеточных системах *in vitro* на основании омик-технологий: транскриптомики (исследование совокупности транскриптов), протеомики (исследование совокупности белков) и метаболомики (исследование совокупности метаболитов). Омик-технологии генерируют огромное количество данных, которые отражают комплексность происходящих в биологическом объекте процессов в ответ на воздействие ЛС.

Транскриптомика. Многие клеточные процессы контролируются на уровне экспрессии генов, поэтому изменение совокупности транскриптов РНК в клетке позволяет судить об изменении экспрессии генов, то есть об активации процессов в ответ на воздействие различных веществ. Определение матричных РНК (мРНК) является инструментом прогнозирования синтеза и активности белков. Для обработки большого количества мРНК используются несколько методов: РНК-секвенирование, методы сериального и экзического анализа экспрессии генов SAGE/CAGE (serial analysis of gene expression/cap analysis of gene expression), метод микрочипов. Метод SAGE основан на определении сотен фрагментов мРНК с последующим подсчетом специфических фрагментов в образце. Микрочипы — фиксированные на плотном субстрате молекулы олигонуклеотидов или комплементарных ДНК, имеющие участки, способные гибридизироваться с определенными РНК, что позволяет проводить сортировку РНК

и оценку уровня их экспрессии. Тестируемые образцы предварительно окрашиваются флуорохромами, и количественная оценка проводится по интенсивности свечения с использованием флуоресцентной микроскопии. С помощью одного чипа могут определяться сотни различных генов. Существуют также высокопроизводительные секвенаторы нового поколения, позволяющие быстро секвенировать большое количество генов [72]. Профиль экспрессии генов может использоваться для сравнения фенотипа различных клеточных культур [73] или для классификации механизма действия новых экспериментальных ЛС путем сравнения с характеристиками, полученными в других исследованиях [74].

K.N. De Abrew и соавт., исследуя изменения транскриптома под влиянием препаратов с различным механизмом токсического действия, показали, что изменение транскриптома отражает специфичность механизма повреждающего действия [75]. B.R. Ware и соавт. сравнивали изменение профилей экспрессии генов первичных гепатоцитов, выращенных в микроструктурированной сокультуре с фибробластами, при воздействии гепатотоксичных и негепатотоксичных ЛС аналогичных фармакологических групп. Воздействие троглитазона и росиглитазона показало на 14 сутки инкубации различие экспрессии 628 генов по сравнению с контролем. При этом >75% транскриптов, участвующих в таких путях, как метаболизм жирных кислот и ЛС, оксидативный стресс, воспалительный ответ и коагуляционный каскад, были изменены под действием гепатотоксичного троглитазона.

Сходные изменения транскриптома были получены для других пар гепатотоксичных и негепатотоксичных аналогов [76]. Описаны модели *in vitro* для прогнозирования ЛГТ, основанные на токсигеномных данных. H.J. Cha и соавт., основываясь на изменении профилей экспрессии генов при воздействии гепатотоксичных и негепатотоксичных НПВП, использовали клетки HepG2 для создания модели прогноза гепатотоксичности на основе избранных генов, показавших максимальные изменения при токсическом воздействии. Валидация модели была проведена на 4 НПВП и показала 100% чувствительность и специфичность [77].

Протеомика. мРНК является промежуточным звеном между геном и синтезом белка, изменения транскриптома отражают реакцию на воздействие, но не всегда коррелируют с уровнем экспрессии белков. Посттрансляционная модификация белка может повлиять на его активацию, локализацию,

стабильность, взаимодействие и передачу сигналов. Протеомика, изучая совокупность белков в клетке в данный момент, дополняет данные транскриптомики в плане определения и оценки процессов, происходящих при токсическом действии. Для идентификации и количественной оценки белков используют иммунохимические методики, электрофорез, хроматографию и современные технологии с высокой пропускной способностью: микрочипы и масс-спектрометрию [78, 79]. M. Alvergnas и соавт., изучая изменение протеома первичных гепатоцитов человека при воздействии гепатотоксичного препарата безафибрат, определили изменение экспрессии белков, участвующих в печеночном канцерогенезе и воспалительном ответе, при этом дополнительное воздействие предшественника глутатиона N-ацетилцистеина модифицировало набор белков, регулируемых безафибратом [80].

Метабомика. Метабомика изучает биохимический профиль организма на уровне малых молекул: промежуточных и конечных продуктов обмена веществ, гормонов, сигнальных молекул. Метаболизм — нижний уровень биомолекулярной организации системы, его динамика может меняться при минимальном воздействии, и данные, отражающие эти изменения, еще больше детализируют механизм токсического действия и ответную реакцию организма [81]. Для определения метаболитов используют комбинацию хроматографических методов с масс-спектрометрией либо ядерный магнитный резонанс [82]. Идентификация метаболитов проводится на основании данных собственных или общедоступных баз данных по метабомике.

A. Ruiz-Aracama и соавт. [83], исследуя на клетках HepG2 изменение метаболома *in vitro* в ответ на гепатотоксичный 2,3,7,8-тетрахлородибензодиоксин, показали соответствие метаболических изменений данным ранее проведенных исследований *in vivo* и *in vitro*. E. Krajnc и соавт. [84] при исследовании метаболома на клетках HuH7 и первичных гепатоцитах мышей определили, что гепатотоксичный антидепрессант нефазодон нарушал глюконеогенез, анаэробный гликолиз и окислительное фосфорилирование, что указывало на наличие нескольких путей подавляющего действия ЛС на синтез АТФ.

Комбинирование метабомики с другими омик-технологиями позволяет в еще большей степени детализировать пути и механизмы, активирующиеся в ответ на токсическое воздействие. R.M. Rodrigues и соавт. [85] использовали транскриптомику и метабомику для оценки

холестатической токсичности бозентана на клетках HepaRG и определили генные изменения, связанные с активацией рецептора ядерного фарнезоида X, и метаболические изменения, указывающие на митохондриальное повреждение.

Информация по токсической активности различных веществ, влиянию на геном, транскриптом, метаболом, получаемая из разных лабораторий, собирается в общедоступных базах данных — MetabolomeXchange¹, Human Metabolome Database², GenomeNet³, NCBI⁴, Protein Information Resource (PIR)⁵ и др.

Рекомендации регуляторных органов по доклиническим исследованиям гепатотоксичности

Согласно руководству Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) по доклиническим исследованиям лекарственно-индуцированной гепатотоксичности (редакция 2010 г.)⁶ исследования *in vitro* рекомендуется проводить как дополнительные для уточнения механизма после выявления сигналов о гепатотоксичности ЛС *in vivo* на лабораторных животных или в дорегистрационных клинических испытаниях. В последней редакции отмечена значимость показателей ответа на клеточный стресс, данных многопараметрического исследования клеток, изменений экспрессии генов и белков, а также биомаркеров клеточного повреждения или восстановления. В то же время эти методики не стандартизированы, имеют различный экспериментальный дизайн и не валидированы в плане чувствительности и/или специфичности для прогноза клинической безопасности. Также отмечена перспективность интегрированного анализа данных омик-технологий.

Отсутствие более позднего обновления рекомендаций, возможно, обусловлено наличием нескольких нерешенных вопросов, связанных с исследованиями *in vitro*. Это проблема валидации и стандартизации методик, поскольку существует большой разброс данных между лабораториями. Другое затруднение состоит в том, что большинство клеточных систем подходят для скрининга дозозависимой токсичности, то есть эффективно выявляют прямую

гепатотоксичность, но не отражают межлекарственные взаимодействия и индивидуальные особенности человека. Также сохраняется проблема количественного переноса результатов тестов *in vitro* на условия *in vivo*.

Заключение

За последние десятилетия достигнут значительный прогресс в разработке клеточных моделей для исследования ЛГТ *in vitro*. Клеточные культуры совершенствуются в направлениях увеличения продолжительности жизни и сохранности функций, повышения экспрессии ферментов и транспортеров, усложнения конфигураций систем с имитацией канальцев и возможности сокультивирования паренхиматозных и непаренхиматозных клеток.

Использование современных клеточных моделей позволяет не только выявлять токсичность, но также изучать механизмы цитотоксичности, митохондриальной токсичности, нарушения обмена желчных кислот, клеточного стресса и других процессов повреждения печени. Сделаны шаги в плане создания сложных клеточных систем для изучения иммунных сигналов и путей, которым отводится большая роль в патогенезе идиосинкратической ЛГТ.

Широкое внедрение одновременного многопараметрического скрининга (HCS) для изучения ЛГТ позволило быстро и производительно обрабатывать большие объемы данных. Высокая технологичность омик-технологий открывает большие возможности в плане стандартизации методик, что позволит получать сопоставимые данные в разных лабораториях и более конкретно трактовать полученные результаты. Перспективными направлениями моделей для исследований *in vitro* представляются создание сложных систем сокультивирования и органов-на-чипе, максимально приближающих условия к таковым *in vivo*, а также создание моделей *in silico*.

Увеличение количества и разнообразия получаемой в тестах *in vitro* информации и наличие инструментов для ее обработки представляются предвестниками если не прорыва, то существенного шага вперед в плане детализации механизмов и определения релевантных биомаркеров для доклинической диагностики гепатотоксичности.

¹ <http://www.metabolomexchange.org>

² <https://hmdb.ca>

³ <https://www.genome.jp>

⁴ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

⁵ <https://proteininformationresource.org>

⁶ Reflection paper on non-clinical evaluation of drug-induced liver injury (DILI). EMEA/CHMP/SWP/150115/2006. EMA; 2010.

Литература / References

- 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;4(14):10. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0553-2>
- Wouters OJ, McKee M, Luyten J. Estimated research and development investment needed to bring a new medicine to market, 2009–2018. *JAMA.* 2020;323(9):844–53. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1166>
- DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. *J Health Econ.* 2016;47:20–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>
- Sakai C, Iwano S, Yamazaki Y, Ando A, Nakane F, Kouno M, et al. Species differences in the pharmacokinetic parameters of cytochrome P450 probe substrates between experimental animals, such as mice, rats, dogs, monkeys, and microminipigs, and humans. *Drug Metab Toxicol.* 2014;5:6. <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000173>
- Spanhaak S, Cook D, Barnes J, Reynolds J. Species concordance for liver injury. In: *Safety Intelligence Program Board*. Cambridge, UK: BioWisdom, Ltd; 2008.
- Hewitt NJ, Gómez Lechón MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev.* 2007;39(1):159–234. <https://doi.org/10.1080/03602530601093489>
- Vickers AE, Bentley P, Fisher RL. Consequences of mitochondrial injury induced by pharmaceutical fatty acid oxidation inhibitors is characterized in human and rat liver slices. *Toxicol In Vitro.* 2006;20(7):1173–82. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.01.021>
- Edwards RJ, Price RJ, Watts PS, Renwick AB, Tredger JM, Boobis AR, Lake BG. Induction of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(3):282–8. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.3.282>
- Starokozhko V, Vatakuti S, Schievink B, Merema MT, Asplund A, Synnergren J, et al. Maintenance of drug metabolism and transport functions in human precision-cut liver slices during prolonged incubation for 5 days. *Arch Toxicol.* 2017;91(5):2079–92. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1865-x>
- Hadi M, Westra IM, Starokozhko V, Dragovic S, Merema MT, Groothuis GM. Human precision-cut liver slices as an ex vivo model to study idiosyncratic drug-induced liver injury. *Chem Res Toxicol.* 2013;26(5):710–20. <https://doi.org/10.1021/tx300519p>
- Khetani SR, Kanchagar C, Ukairo O, Krzyzewski S, Moore A, Shi J, et al. Use of micropatterned cocultures to detect compounds that cause drug-induced liver injury in humans. *Toxicol Sci.* 2013;132(1):107–17. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs326>
- Burkard A, Dähn C, Heinz S, Zutavern A, Sonntag-Buck V, Maltman D, et al. Generation of proliferating human hepatocytes using Upcyte® technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica.* 2012;42(10):939–56. <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.675093>
- Segovia-Zafra A, Di Zeo-Sánchez DE, López-Gómez C, Pérez-Valdés Z, García-Fuentes E, Andrade RJ, et al. Preclinical models of idiosyncratic drug-induced liver injury (iDILI): moving towards prediction. *Acta Pharm Sin B.* 2021;11(12):3685–726. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.11.013>
- Sison-Young RL, Mitsa D, Jenkins RE, Mottram D, Alexandre E, Richert L, et al. Comparative proteomic characterization of 4 human liver-derived single cell culture models reveals significant variation in the capacity for drug disposition, bioactivation, and detoxication. *Toxicol Sci.* 2015;147(2):412–24. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv136>
- Saran C, Fu D, Ho H, Klein A, Fallon JK, Honkakoski P, et al. A novel differentiated HuH-7 cell model to examine bile acid metabolism, transport and cholestatic hepatotoxicity. *Sci Rep.* 2022;12(1):14333. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18174-z>
- 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>
- Imagawa K, Takayama K, Isoyama S, Tanikawa K, Shinkai M, Harada K, et al. Generation of a bile salt export pump deficiency model using patient-specific induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Sci Rep.* 2017;7:41806. <https://doi.org/10.1038/srep41806>
- Nguyen TV, Ukairo O, Khetani SR, McVay M, Kanchagar C, Seghezzi W, et al. Establishment of a hepatocyte-Kupffer cell coculture model for assessment of proinflammatory cytokine effects on metabolizing enzymes and drug transporters. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(5):774–85. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.061317>
- Baze A, Parmentier C, Hendriks DFG, Hurrell T, Heyd B, Bachellier P, et al. Three-dimensional spheroid primary human hepatocytes in monoculture and coculture with nonparenchymal cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2018;24(9):534–45. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2018.0134>
- Olsen AL, Bloomer SA, Chan EP, Gaça MD, Georges PC, Sackey B, et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(1):110–8. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00412.2010>
- Khetani SR, Berger DR, Ballinger KR, Davidson MD, Lin C, Ware BR. Microengineered liver tissues for drug testing. *J Lab Autom.* 2015;20(3):216–50. <https://doi.org/10.1177/2211068214566939>
- Yokoyama Y, Sasaki Y, Terasaki N, Kawataki T, Takekawa K, Iwase Y, et al. Comparison of drug metabolism and its related hepatotoxic effects in HepaRG, cryopreserved human hepatocytes, and HepG2 cell cultures. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(5):722–32. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00913>
- Wu X, Wang S, Li M, Li J, Shen J, Zhao Y, et al. Conditional reprogramming: next generation cell culture. *Acta Pharm Sin B.* 2020;10(8):1360–81. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.01.011>

24. Su S, Di Poto C, Roy R, Liu X, Cui W, Kroemer A, Res-som HW. Long-term culture and characterization of patient-derived primary hepatocytes using conditional reprogramming. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2019;244(11):857–64.
<https://doi.org/10.1177/1535370219855398>
25. De Bruyn T, Chatterjee S, Fattah S, Keemink J, Nicolaï J, Augustijns P, et al. Sandwich-cultured hepatocytes: utility for *in vitro* exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(5):589–616.
<https://doi.org/10.1517/17425255.2013.773973>
26. Yanni SB, Augustijns PF, Benjamin DK Jr, Brouwer KL, Thakker DR, Annaert PP. *In vitro* investigation of the hepatobiliary disposition mechanisms of the antifungal agent micafungin in humans and rats. *Drug Metab Dispos*. 2010;38(10):1848–56.
<https://doi.org/10.1124/dmd.110.033811>
27. Matsunaga N, Suzuki K, Nakanishi T, Ogawa M, Ima-waka H, Tamai I. Modeling approach for multiple transporters-mediated drug-drug interactions in sandwich-cultured human hepatocytes: effect of cyclosporin A on hepatic disposition of mycophenolic acid phenyl-glucuronide. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2015;30(2):142–8.
<https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2014.10.006>
28. Fu D, Cardona P, Ho H, Watkins PB, Brouwer KLR. Novel mechanisms of valproate hepatotoxicity: impaired Mrp2 trafficking and hepatocyte depolarization. *Toxicol Sci*. 2019;171(2):431–42.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz154>
29. Berger DR, Ware BR, Davidson MD, Allsup SR, Khetani SR. Enhancing the functional maturity of induced pluripotent stem cell-derived human hepatocytes by controlled presentation of cell-cell interactions *in vitro*. *Hepatology*. 2015;61(4):1370–81.
<https://doi.org/10.1002/hep.27621>
30. Takahashi Y, Hori Y, Yamamoto T, Urashima T, Ohara Y, Tanaka H. 3D spheroid cultures improve the metabolic gene expression profiles of HepaRG cells. *Biosci Rep*. 2015;35(3):e00208.
<https://doi.org/10.1042/BSR20150034>
31. Bell CC, Dankers ACA, Lauschke VM, Sison-Young R, Jenkins R, Rowe C, et al. Comparison of hepatic 2D sandwich cultures and 3D spheroids for long-term toxicity applications: a multicenter study. *Toxicol Sci*. 2018;162(2):655–66.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx289>
32. Kostadinova R, Boess F, Applegate D, Suter L, Weiser T, Singer T, et al. A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;268(1):1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.012>
33. Vorrink SU, Zhou Y, Ingelman-Sundberg M, Lauschke VM. Prediction of drug-induced hepatotoxicity using long-term stable primary hepatic 3D spheroid cultures in chemically defined conditions. *Toxicol Sci*. 2018;163(2):655–65.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy058>
34. Ide I, Nagao E, Kajiyama S, Mizoguchi N. A novel evaluation method for determining drug-induced hepatotoxicity using 3D bio-printed human liver tissue. *Toxicol Mech Methods*. 2020;30(3):189–96.
<https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1686795>
35. Schmidt K, Berg J, Roehrs V, Kurreck J, Al-Zeer MA. 3D-bioprinted HepaRG cultures as a model for testing long term aflatoxin B1 toxicity *in vitro*. *Toxicol Rep*. 2020;7:1578–87.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.11.003>
36. Deng J, Wei W, Chen Z, Lin B, Zhao W, Luo Y, et al. Engineered liver-on-a-chip platform to mimic liver functions and its biomedical applications: a review. *Micromachines (Basel)*. 2019;10(10):676.
<https://doi.org/10.3390/mi10100676>
37. Rubiano A, Indapurkar A, Yokosawa R, Miedzki A, Rosenzweig B, Arefin A, et al. Characterizing the reproducibility in using a liver microphysiological system for assaying drug toxicity, metabolism, and accumulation. *Clin Transl Sci*. 2021;14(3):1049–61.
<https://doi.org/10.1111/cts.12969>
38. Picollet-D'hahan N, Zuchowska A, Lemeunier I, Le Gac S. Multiorgan-on-a-chip: a systemic approach to model and decipher inter-organ communication. *Trends in Biotechnology*. 2021;39(8):788–810.
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.11.014>
39. Bricks T, Paullier P, Legendre A, Fleury MJ, Zeller P, Merlier F, et al. Development of a new microfluidic platform integrating co-cultures of intestinal and liver cell lines. *Toxicol Vitro*. 2014;28(5):885–95.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.02.005>
40. Oleaga C, Bernabini C, Smith AS, Srinivasan B, Jackson M, McLamb W, et al. Multi-organ toxicity demonstration in a functional human *in vitro* system composed of four organs. *Sci Rep*. 2016;6(1):20030.
<https://doi.org/10.1038/srep20030>
41. Weaver RJ, Betts C, Blomme EAG, Gerets HHJ, Gjervig Jensen K, Hewitt PG, et al. Test systems in drug discovery for hazard identification and risk assessment of human drug-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017;13(7):767–82.
<https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1341489>
42. Benbow JW, Aubrecht J, Banker MJ, Nettleton D, Aleo MD. Predicting safety toleration of pharmaceutical chemical leads: cytotoxicity correlations to exploratory toxicity studies. *Toxicol Lett*. 2010;197(3):175–82.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.05.016>
43. Roth AD, Lee MY. Idiosyncratic drug-induced liver injury (IDILI): potential mechanisms and predictive assays. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9176937.
<https://doi.org/10.1155/2017/9176937>
44. Jee A, Sernoskie SC, Uetrecht J. Idiosyncratic drug-induced liver injury: mechanistic and clinical challenges. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):2954.
<https://doi.org/10.3390/ijms22062954>
45. Devi SS, Palkar PS, Mehendale HM. Measuring covalent binding in hepatotoxicity. *Curr Protoc Toxicol*. 2007;14:Unit14.6.
<https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1406s32>
46. Wang Q, Liu H, Slavsky M, Fitzgerald M, Lu C, O'Shea T. A high-throughput glutathione trapping assay with combined high sensitivity and specificity in high-resolution mass spectrometry by applying product ion extraction and data-dependent neutral loss. *J Mass Spectrom*. 2019;54(2):158–66.
<https://doi.org/10.1002/jms.4320>
47. Ramachandran A, Jaeschke H. Oxidative stress and acute hepatic injury. *Curr Opin Toxicol*. 2018;7:17–21.
<https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.011>
48. Chen S, Zhang Z, Qing T, Ren Z, Yu D, Couch L, Ning B,

- Mei N, Shi L, Tolleson WH, Guo L. Activation of the Nrf2 signaling pathway in usnic acid-induced toxicity in HepG2 cells. *Arch Toxicol.* 2017;91(3):1293–307. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1775-y>
49. Mihajlovic M, Vinken M. Mitochondria as the target of hepatotoxicity and drug-induced liver injury: molecular mechanisms and detection methods. *Int J Mol Sci.* 2022;23:3315. <https://doi.org/10.3390/ijms23063315>
 50. Nadanaciva S, Will Y. The role of mitochondrial dysfunction and drug safety. *IDrugs.* 2009;12(11):706–10. PMID: 19844857
 51. Begriche K, Massart J, Robin M, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J Hepatol.* 2011;54(14):773–94. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.006>
 52. Fromenty B. Alteration of mitochondrial DNA homeostasis in drug-induced liver injury. *Food Chem Toxicol.* 2020;135:110916. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110916>
 53. McKee E, Ferguson M, Bentley A, Marks T. Inhibition of mammalian mitochondrial protein synthesis by oxazolidinones. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2006;50(16):2042–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01411-05>
 54. Kamalian L, Douglas O, Jolly CE, Snoeys J, Simic D, Monshouwer M, et al. Acute metabolic switch assay using glucose/galactose medium in HepaRG cells to detect mitochondrial toxicity. *Curr Protoc Toxicol.* 2019;80(1):76. <https://doi.org/10.1002/cptx.76>
 55. Nadanaciva S, Willis J, Barker M, Gharaibeh D, Capaldi R, Marusich M, et al. Assessment of drug-induced mitochondrial dysfunction via altered cellular respiration and acidification measured in a 96-well platform. *J Bioenerg Biomembr.* 2012;44(14):421–37. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9446-z>
 56. Marchetti P, Fovez Q, Germain N, Khamari R, Kluza J. Mitochondrial spare respiratory capacity: mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *FASEB J.* 2020;34(10):13106–24. <https://doi.org/10.1096/fj.202000767R>
 57. Nadanaciva S, Willis JH, Barker ML, Gharaibeh D, Capaldi RA, Marusich MF, et al. Lateral-flow immunoassay for detecting drug-induced inhibition of mitochondrial DNA replication and mtDNA-encoded protein synthesis. *J Immunol Methods.* 2009;343(1):1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.12.002>
 58. Porceddu M, Buron N, Rustin P, Fromenty B, Borgne-Sanchez A. In vitro assessment of mitochondrial toxicity to predict drug-induced liver injury. In: Chen M, Will Y, eds. *Drug-induced liver toxicity*. New York: Springer New York; 2018. P. 283–300. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7677-5_14
 59. Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol.* 2009;15(14):1677–89. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.1677>
 60. Garzel B, Yang H, Zhang L, Huang SM, Polli JE, Wang H. The role of bile salt export pump gene repression in drug-induced cholestatic liver toxicity. *Drug Metab Dispos.* 2014;42(3):318–22. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.054189>
 61. Stieger B, Mahdi ZM. Model systems for studying the role of canalicular efflux transporters in drug-induced cholestatic liver disease. *J Pharm Sci.* 2017;106(9):2295–301. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.03.023>
 62. Schaefer M, Morinaga G, Matsui A, Schänzle G, Bischoff D, Süssmuth RD. Quantitative expression of hepatobiliary transporters and functional uptake of substrates in hepatic two-dimensional sandwich cultures: a comparative evaluation of upcyte and primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2018;46(2):166–77. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.078238>
 63. Funk C, Pantze M, Jehle L, Ponelle C, Scheuermann G, Lazendic M, et al. Troglitazone-induced intrahepatic cholestasis by an interference with the hepatobiliary export of bile acids in male and female rats. Correlation with the gender difference in troglitazone sulfate formation and the inhibition of the canalicular bile salt export pump (Bsep) by troglitazone and troglitazone sulfate. *Toxicology.* 2001;167(1):83–98. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00460-7](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00460-7)
 64. Chan R, Benet LZ. Measures of BSEP inhibition *in vitro* are not useful predictors of DILI. *Toxicol Sci.* 2018;162(2):499–508. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx284>
 65. LeCluyse EL, Witek RP, Andersen ME, Powers MJ. Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol.* 2012;42(6):501–48. <https://doi.org/10.3109/10408444.2012.682115>
 66. Ogebe MO, Faulkner L, Jenkins RE, French NS, Copple IM, Antoine DJ, et al. Characterization of drug-specific signaling between primary human hepatocytes and immune cells. *Toxicol Sci.* 2017;158(1):76–89. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx069>
 67. Persson M. High content screening for prediction of human drug-induced liver injury. In: Chen M, Will Y, eds. *Drug-induced liver toxicity*. New York: Springer New York; 2018. P. 331–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7677-5_16
 68. O'Brien PJ, Irwin W, Diaz D, Howard-Coffield E, Krejsa CM, Slaughter MR, et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with *in vitro* cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Arch Toxicol.* 2006;80(9):580–604. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0091-3>
 69. Hong S, Song JM. A 3D cell printing-fabricated HepG2 liver spheroid model for high-content *in situ* quantification of drug-induced liver toxicity. *Biomater Sci.* 2021;9(17):5939–50. <https://doi.org/10.1039/d1bm00749a>
 70. Donato M, Tolosa L. High-content screening for the detection of drug-induced oxidative stress in liver cells. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(1):106. <https://doi.org/10.3390/antiox10010106>
 71. Kozak K, Rinn B, Leven O, Emmenlauer M. Strategies and solutions to maintain and retain data from high content imaging, analysis, and screening assays. *Methods Mol Biol.* 2018;1683:131–48. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7357-6_9
 72. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(5):1005457. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>

73. Gupta R, Schrooders Y, Hauser D, van Herwijnen M, Albrecht W, Ter Braak B, et al. Comparing *in vitro* human liver models to *in vivo* human liver using RNA-Seq. *Arch Toxicol*. 2021;95(2):573–89.
<https://doi.org/10.1007/s00204-020-02937-6>
74. Russo MW, Steuerwald N, Norton HJ, Anderson WE, Foureau D, Chalasani N, et al. Profiles of miRNAs in serum in severe acute drug induced liver injury and their prognostic significance. *Liver Int*. 2017;37(5):757–64.
<https://doi.org/10.1111/liv.13312>
75. De Abrew KN, Overmann GJ, Adams RL, Tiesman JP, Dunavent J, Shan YK, Carr GJ, et al. A novel transcriptomics based *in vitro* method to compare and predict hepatotoxicity based on mode of action. *Toxicology*. 2015;328:29–39.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.11.008>
76. Ware BR, McVay M, Sunada WY, Khetani SR. Exploring chronic drug effects on microengineered human liver cultures using global gene expression profiling. *Toxicol Sci*. 2017;157(2):387–98.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx059>
77. Cha HJ, Ko MJ, Ahn SM, Ahn JI, Shin HJ, Jeong HS, et al. Identification of classifier genes for hepatotoxicity prediction in non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Mol Cell Toxicol*. 2010;6:247–53.
<https://doi.org/10.1007/s13273-010-0034-1>
78. Ölander M, Wiśniewski JR, Artursson P. Cell-type-resolved proteomic analysis of the human liver. *Liver Int*. 2020;40(7):1770–80.
<https://doi.org/10.1111/liv.14452>
79. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*. 2016;537(7620):347–55.
<https://doi.org/10.1038/nature19949>
80. Alvergnas M, Rouleau A, Lucchi G, Heyd B, Ducoroy P, Richert L, et al. Proteomic mapping of bezafibrate-treated human hepatocytes in primary culture using two-dimensional liquid chromatography. *Toxicol Lett*. 2011;201(2):123–9.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.015>
81. Ramirez T, Daneshian M, Kamp H, Bois FY, Clench MR, Coen M et al. Metabolomics in toxicology and pre-clinical research. *ALTEX*. 2013;30(2):209–25.
<https://doi.org/10.14573/altex.2013.2.209>
82. Cuykx M, Rodrigues RM, Laukens K, Vanhaecke T, Covaci A. *In vitro* assessment of hepatotoxicity by metabolomics: a review. *Arch Toxicol*. 2018;92(10):3007–29.
<https://doi.org/10.1007/s00204-018-2286-9>
83. Ruiz-Aracama A, Peijnenburg A, Kleinjans J, Jennen D, van Delft J, Hellfrisch C, et al. An untargeted multi-technique metabolomics approach to studying intracellular metabolites of HepG2 cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *BMC Genomics*. 2011;12:251.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-251>
84. Krajnc E, Visentin M, Gai Z, Stieger B, Samodelov SL, Häusler S, Kullak-Ublick GA. Untargeted metabolomics reveals anaerobic glycolysis as a novel target of the hepatotoxic antidepressant nefazodone. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020;375(2):239–46.
<https://doi.org/10.1124/jpet.120.000120>
85. Rodrigues RM, Kollipara L, Chaudhari U, Sachinidis A, Zahedi RP, Sickmann A, et al. Omics-based responses induced by bosentan in human hepatoma HepaRG cell cultures. *Arch Toxicol*. 2018;92(6):1939–52.
<https://doi.org/10.1007/s00204-018-2214-z>

Вклад авторов. Автор подтверждает соответствие своего авторства критериям ICMJE.

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

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

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

ОБ АВТОРЕ / AUTHOR

Мазеркина Ирина Анатольевна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3733-6822>
mazerkina@expmed.ru

Поступила 20.12.2022

После доработки 20.02.2023

Принята к публикации 10.03.2023

Online first 19.04.2023

Irina A. Mazerkina, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3733-6822>
mazerkina@expmed.ru

Received 20 December 2022

Revised 20 February 2023

Accepted 10 March 2023

Online first 19 April 2023