

Оценка безопасности лекарственных средств в отношении сердечно-сосудистой системы в доклинических исследованиях *in vivo*: обзор

К.Т. Султанова, М.В. Мирошников, А.Ю. Бородина, Е.В. Симонова[✉], Ж.Ю. Устенко, Е.В. Мазукина, К.Л. Крышень, А.А. Матичин, М.Н. Макарова, В.Г. Макаров

Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»,
ул. Заводская, д. 3, к. 245, Всеволожский район, г.п. Кузьмолковский,
Ленинградская обл., 188663, Российская Федерация

✉ Симонова Елизавета Владимировна simonova.ev@doclinika.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Оценка безопасности лекарственных средств в отношении сердечно-сосудистой системы с использованием моделей *in vivo* является необходимым этапом доклинических исследований, которая проводится либо в исследованиях фармакологической безопасности, либо в рамках токсикологических исследований. В дизайне исследований фармакологической безопасности в первую очередь подразумевается оценка потенциала исследуемого вещества замедлять реполяризацию желудочков сердца без углубленного изучения возможного структурного повреждения сердца и сосудов. При этом в токсикологических исследованиях, как правило, не оцениваются электрофизиологические параметры. В нормативной документации Евразийского экономического союза и Международного совета по гармонизации (ICH) отсутствуют подробные указания по использованию специфических маркеров нарушений функционирования сердечно-сосудистой системы.

ЦЕЛЬ. Разработка комплексного подхода по оценке кардио- и васкулотоксичности лекарственных препаратов в доклинических исследованиях *in vivo*.

ОБСУЖДЕНИЕ. Для оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы могут быть использованы как мелкие лабораторные животные (грызуны), так и более крупные, такие как кролики, хорьки, собаки, карликовые свиньи и приматы. Токсические эффекты изучаемых лекарственных препаратов в отношении сердца и сосудов у животных могут проявляться в виде изменений в физиологическом, биохимическом или структурном статусах систем или органов, поэтому оценка функционального состояния сердечно-сосудистой системы должна опираться на совокупность инструментальных, лабораторных и гистологических методов. В первую очередь применимы физиологические и лабораторные исследования. Рекомендовано проводить электрокардиографию, измерение частоты сердечных сокращений и артериального давления, а также количественно оценивать маркеры нарушения функций и структурного повреждения клеток. Для более глубокого анализа рекомендуется применять гистологические и иммуногистохимические исследования тканей сердца и сосудов, чтобы оценить изменения на тканевом и клеточном уровнях.

ВЫВОДЫ. Эффективным способом обнаружения нарушений сердечно-сосудистой системы является применение комплексного подхода, который, с одной стороны, позволяет всесторонне оценить возможные токсические проявления лекарственного средства, а с другой — увеличивает трансляционный потенциал данных, получаемых на доклиническом этапе исследований.

Ключевые слова: функциональная активность; кардиотоксичность; электрокардиография; артериальное давление; кардиомаркеры; тропонины; гистологические исследования; доклинические исследования; дизайн исследования; лабораторные животные

Для цитирования: Султанова К.Т., Мирошников М.В., Бородин А.Ю., Симонова Е.В., Устенко Ж.Ю., Мазукина Е.В., Крышень К.Л., Матичин А.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Оценка безопасности лекарственных средств в отношении сердечно-сосудистой системы в доклинических исследованиях *in vivo*: обзор. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2025. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2025-475>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Cardiovascular Safety Assessment of Medicines in Preclinical *In vivo* Studies: A Review

Kira T. Sultanova, Mihail V. Miroshnikov, Antonina Yu. Borodina, Elizaveta V. Simonova✉, Zhanna Yu. Ustenko, Elizaveta V. Mazukina, Kirill L. Kryshen, Aleksandr A. Matichin, Marina N. Makarova, Valery G. Makarov

Research-and-manufacturing company "HOME OF PHARMACY",
3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky district,
Leningrad Region 188663, Russian Federation

✉ Elizaveta V. Simonova simonova.ev@doclinika.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The cardiovascular safety evaluation of medicines using *in vivo* models is a necessary preclinical step that is performed either in safety pharmacology studies or in toxicity studies. The design of safety pharmacology studies primarily involves assessing the potential of a test substance to prolong cardiac ventricular repolarisation, without in-depth investigation of potential structural damage to the heart and blood vessels. Toxicity studies usually do not include electrophysiological testing. The regulatory standards of the Eurasian Economic Union (EAEU) and the International Council for Harmonisation (ICH) lack detailed guidance on the use of specific markers of cardiovascular dysfunction.

AIM. This study aimed to develop an integrated approach to assessing the cardiac and vascular toxicity of medicinal products in preclinical *in vivo* studies.

DISCUSSION. Cardiovascular function can be assessed in both small laboratory animals (rodents) and larger animals, such as rabbits, ferrets, dogs, minipigs, and primates. The toxic effects of a test medicinal product on the cardiovascular system of animals may be manifested as physiological, biochemical, and structural changes in the systems and organs. Therefore, the assessment of cardiovascular function should be based on a combination of instrumental, laboratory, and histological methods. First of all, physiological and laboratory studies are applicable. It is recommended to perform electrocardiography, heart rate and blood pressure measurements, and quantification of markers of cardiovascular dysfunction and structural cell damage. For more in-depth analysis, histological and immunohistochemical studies of cardiac and vascular tissues are recommended to assess changes at the tissue and cellular levels.

CONCLUSIONS. An effective strategy for detecting cardiovascular disorders is the use of an integrated approach that, on the one hand, facilitates a comprehensive assessment of the possible toxic effects of a medicinal product and, on the other hand, increases the translational potential of the data obtained at the preclinical stage of research.

Keywords: functional activity; cardiotoxicity; electrocardiography; blood pressure; cardiac markers; troponins; histological studies; preclinical studies; study design; laboratory animals

For citation: Sultanova K.T., Miroshnikov M.V., Borodina A.Yu., Simonova E.V., Ustenko Zh.Yu., Mazukina E.V., Kryshen K.L., Matichin A.A., Makarova M.N., Makarov V.G. Cardiovascular safety assessment of medicines in preclinical *in vivo* studies: A review. *Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2025. <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2025-475>

Funding. The study was performed without external funding.

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Необходимым этапом доклинических исследований разрабатываемых лекарственных средств является выявление потенциального токсического действия на организм экспериментальных животных, то есть оценка влияния на функциональное состояние систем и органов. В соответствии с рекомендациями Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) S7A¹, S7B², а также рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 27.10.2020 № 18³ в рамках проведения доклинических исследований необходимо изучить потенциальные нежелательные фармакодинамические эффекты лекарственных препаратов на физиологические функции организма. До начала клинических исследований проводят так называемую «основную батарею» тестов и оценивают влияние разрабатываемого препарата на центральную нервную, дыхательную и сердечно-сосудистую системы, при этом акцент делается на острых функциональных эффектах без тщательного фармакологического профилирования. Так, в дизайне исследований фармакологической безопасности в первую очередь подразумевается оценка потенциала исследуемого вещества замедлять реполяризацию желудочков сердца без углубленного изучения возможного структурного повреждения сердца и сосудов, например, при помощи лабораторных или гистологических исследований. При этом в токсикологических исследованиях не предусмотрено измерение артериального давления, частоты сердечных сокращений или параметров электрокардиограммы.

Токсические эффекты изучаемых лекарственных препаратов у животных могут проявляться в виде изменений в физиологическом, биохимическом или структурном статусе систем или органов [1]. Именно поэтому оценка функционального состояния сердечно-сосудистой системы должна опираться на совокупность инструментальных, лабораторных и гистологических методов.

Ранние исследования по оценке влияния исследуемого вещества на сердечно-сосудистую систему проводят *in vitro*, что позволяет получить сведения о его влиянии на продолжительность потенциала действия и ионные токи в сердце, в частности на ионные каналы hERG (калиевые каналы, кодируемые геном *hERG*, human *Ether-à-go-go*-related gene) [2]. Блокировка hERG-каналов сердца может привести к опасным последствиям: нарушению реполяризации желудочков сердца и желудочковой тахикардии [3]. Данные исследования играют важную роль при оценке потенциала удлинения интервала QT и выяснении клеточных механизмов, влияющих на реполяризацию миокарда. Потребность в исследованиях *in vivo* для определения гемодинамических и электрофизиологических эффектов препаратов сохраняется, поскольку пока отсутствуют альтернативные подходы.

Для оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы могут быть использованы как мелкие лабораторные животные (грызуны), так и более крупные, такие как собаки, карликовые свиньи и приматы [4, 5]. Использование мышей и крыс в качестве модели *in vivo*, вероятно, в наибольшей степени подходит для раннего фармакологического тестирования, так как данные лабораторные животные являются стандартными для проведения токсикологических исследований и могут быть источником первичных данных о тестируемом соединении. Однако необходимо учитывать, что ионные механизмы реполяризации у крыс и мышей отличаются от ионных механизмов более крупных видов животных, а также человека, поэтому для более углубленного изучения используются морские свиньи, кролики, хорьки, собаки, карликовые свиньи и приматы⁴.

Комплексная стратегия по оценке безопасности разрабатываемых лекарственных средств *in vivo*, выходящая за общепринятые подходы к изучению токсических и фармакологических свойств, позволит с большей вероятностью выявить и изучить нежелательные эффекты, которые могут иметь значение для безопасного применения препарата.

Цель работы — разработка комплексного подхода по оценке кардио- и васкулотоксично-

¹ ICH S7A Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. CPMP/ICH/539/00. ICH; 2001.

² ICH S7B Non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals. CPMP/ICH/423/02. ICH; 2005.

³ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 27.10.2020 № 18 «О Руководстве по исследованию фармакологической безопасности лекарственных препаратов для медицинского применения».

⁴ Там же.

сти лекарственных препаратов в доклинических исследованиях *in vivo*.

В ходе работы были систематизированы и проанализированы методы оценки токсического воздействия лекарственных препаратов на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы лабораторных животных. Обобщены научные публикации о предпосылках к проведению, методологии, преимуществах, недостатках и перспективах оценки кардио- и васкулотоксичности в доклинических исследованиях. Поиск публикаций выполняли в базах данных PubMed, eLIBRARY.RU и поисковой системе Google Scholar. В обзор включали полнотекстовые публикации, доступные для поиска по состоянию на 20.08.2024. В приоритете были статьи, опубликованные за последние 5 лет. Ключевые слова для поиска на русском и английском языках: «функциональная активность», «кардиотоксичность», «артериальное давление», «кардиомаркеры», «тропонины», «гистологические исследования», «доклинические исследования», «лабораторные животные».

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Инструментальные методы

При оценке фармакологической безопасности лекарственных средств в отношении сердечно-сосудистой системы в рамках основной батареи тестов необходимо измерить артериальное давление (АД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС), провести электрокардиографию⁵ [6]. В качестве дополнительных (утрачивающих) исследований рассматривают проведение эхокардиографии с оценкой сердечного выброса и сократимости желудочков сердца [6, 7]. При проведении исследований *in vivo* рекомендовано использовать бодрствующих животных⁶, в отношении которых не выполнялась анестезия. Одним из главных условий при использовании животных, в отношении которых не выполнялась анестезия, является предотвращение развития у животных дискомфорта и боли. Для этого необходимо проводить предварительное длительное приучение животных к этим процедурам. В связи с этим допустимо и даже целесообразно для регистрации параметров вводить животных в состояние наркоза. Это позволит снизить межиндивидуальную вариативность параметров, обусловленную стрессом, двигательной актив-

ностью животных, а также сократит временные затраты на выполнение манипуляций. При этом для учета возможного влияния средств для наркоза на оцениваемые параметры необходимо проводить регистрацию их исходных значений (до вмешательства) и включать в эксперимент контрольную группу животных.

Электрокардиография. Электрокардиограммы (ЭКГ), полученные от лабораторных животных, находящихся в сознании, часто сопровождаются высокой частотой сердечных сокращений, электрическим шумом, вызванным движением животных. Все эти переменные увеличивают сложность проведения точного и последовательного анализа ЭКГ, который изначально затруднен у лабораторных животных ввиду нечетких сигналов при снятии ЭКГ [8]. Анестезия или седация нивелируют эти переменные и дают некоторые преимущества по сравнению с использованием животных, находящихся в сознании. Для определения потенциальных индивидуальных особенностей животного важно проводить регистрацию исходных значений анализируемых параметров. При выборе доз анестезирующих средств, имеющих достаточную эффективность при наименее выраженном влиянии на регистрируемые параметры, необходимо ориентироваться на референтные интервалы, собственные данные или данные литературы. Кроме того, в руководстве ICH S7A отражена целесообразность использования групп отрицательного и положительного контроля при проведении исследований, что поможет определить чувствительность модельной системы и отличить патологию, возникающую в результате применения тестируемого вещества, от индивидуальных особенностей животного и артефактов [9].

Для проведения электрофизиологических исследований наиболее подходящими видами лабораторных животных считаются собаки, приматы и карликовые свиньи, допустимо использовать морских свинок, кроликов, хорьков. Мышей и крыс часто используют в токсикологических и фармакодинамических исследованиях, а также «гибридных» вариантах — при включении части конечных точек исследований фармакологической безопасности в их дизайн. При этом необходимо учитывать специфические электрокардиографические характеристики мелких грызунов, в частности трудноразличимые зубец Q и сег-

⁵ ICH S7A Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. CPMP/ICH/539/00. ICH; 2001.

⁶ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 27.10.2020 № 18 «О Руководстве по исследованию фармакологической безопасности лекарственных препаратов для медицинского применения».

мент ST или наличие J-волны (идентифицируется как наклонная часть сегмента ST) [10].

ЭКГ, несмотря на трудоемкость процесса ее регистрации и анализа, признана наиболее важным показателем и основным биомаркером оценки безопасности в отношении сердечно-сосудистой системы при проведении доклинических исследований⁷. В нормативной документации⁷ отражена необходимость оценки такого показателя проводимости сердца, как интервал QT (время от начала комплекса QRS до конца волны T). При задержке реполяризации желудочков и удлинении интервала QT у людей повышается риск развития желудочковых тахикардий. В связи с этим большое значение придается изучению потенциальных проаритмических эффектов лекарственных препаратов, которые связаны с удлинением интервала QT⁸. Помимо интервала QT наиболее часто определяют продолжительность интервалов PR, продолжительность и морфологию зубца P, комплекса QRS, зубцов T и U, что позволяет получить представление об анатомической области, которая может быть изменена под действием исследуемого препарата [11].

Учитывая важность данного метода, следует указать, что даже небольшие несоответствия в размещении меток на ЭКГ увеличивают вариабельность анализируемых значений и могут повлиять на интерпретацию данных ЭКГ, а впоследствии и на чувствительность статистического анализа, который имеет решающее значение для обнаружения небольших, но значимых изменений.

Еще один неинвазивный метод регистрации ЭКГ – мониторинг по Холтеру – суточная непрерывная регистрация ЭКГ, которая может проводиться как в покое, так и при физической нагрузке. Данный электрофизиологический метод ввиду размеров самого оборудования пригоден для крупных животных, таких как собаки, свиньи. Для обезьян мониторинг может быть технически затруднен ввиду высокой подвижности животных, не информативна также запись суточного ЭКГ у кошек в связи с большим количеством регистрируемых помех [12–14]. Перед установкой электродов необходимо подготовить кожу животного: выбрать шерсть и обезжирить поверхность. После этого на кожу грудной клетки крепятся одноразовые самоклеящиеся электроды, которые обеспечивают надежное соединение с регистрирующим

устройством. Также для удобства и комфорта животного используются жилетки или эластичные бинты, которые помогают скрыть провода от животного и обеспечивают более плотное прилегание электродов к коже. Холтеровское мониторирование в ветеринарии используется для диагностики нарушений ритма и проводимости, кардиомиопатии, а также для оценки эффективности антиаритмической терапии. В доклинических же исследованиях данный метод пока не получил широкого распространения из-за высокой стоимости оборудования.

Частота сердечных сокращений – еще один электрофизиологический показатель сердечной деятельности, который используется для первичной дифференциации нормального ритма сердца и его разнообразных нарушений. Зачастую регистрацию ЧСС у лабораторных животных проводят в комплексе с измерением ЭКГ. Во временной области непосредственную ЧСС можно определить в любой момент времени или в интервалах между последовательными комплексами QRS, то есть между двумя основными волнами депolarизации (интервалы R–R), а затем преобразовать эти данные в значения ЧСС [15].

Артериальное давление. В то время как проведение и анализ данных ЭКГ сопряжен с некоторыми трудностями, измерение АД требует относительно простых стратегий регистрации и интерпретации данных. Наиболее распространенным методом измерения АД является манжетная сфигмоманометрия, когда измерение проводится при помощи видоспецифичных тонометров с использованием методики наложения манжеты (аускультация) вокруг периферической артерии конечности или хвоста животного. Соответствующий размер и положение манжеты являются важными факторами для получения точных результатов. При использовании слишком узкой или слишком свободной манжеты наблюдается тенденция к завышению значений АД, слишком широкой или слишком тугой манжеты – тенденция к занижению значений АД [16].

Значения АД, регистрируемые у лабораторных животных, могут варьировать в зависимости от анатомического участка, на котором располагается манжета. Систолическое АД увеличивается к периферии в результате отражения волн давления от меньших артериол из-за более прочной мышечной стенки и более высокого сопротивления, тогда как диастолическое АД не-

⁷ ICH S7B Non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals. CPMP/ICH/423/02. ICH; 2005.

⁸ Там же.

значительно снижается, а среднее АД остается практически постоянным [11]. Если измерение проводится на крупном виде животных, то есть возможность оценить систолическое, диастолическое и вычислить среднее АД, а на грызунах, как правило, определяют только систолическое АД с использованием хвостовой манжеты [17].

Разработаны методы инвазивного измерения АД, в частности использование артериального периферического катетера. Однако прямое измерение АД сопряжено с трудоемкостью процесса установки и рисками, связанными с размещением катетера в периферической артерии, включая ишемическое повреждение, кровоотечение, артериальную эмболизацию и инфекцию. Также отметим, что подобный метод может быть использован преимущественно на крупных животных [18].

Эхокардиография является еще одним неинвазивным методом оценки сердечной деятельности, который дает информацию о морфологии сердца с оценкой его структурных изменений (например, гипертрофии и дилатационной кардиомиопатии) и о функциональных возможностях (сократимости левого желудочка, ударном объеме и др.) [7, 19]. При проведении эхокардиографии у грызунов и некрупных животных возможно использование неонатальных фазированных датчиков, для более крупных видов, например собак, обезьян, карликовых свиней, возможно использование педиатрического датчика.

Лабораторные методы

Кардиоспецифические маркеры, определяемые в сыворотке или плазме крови, — группа показателей, которые можно оценивать при изучении воздействия препарата на сердечно-сосудистую систему [20]. Важно отметить, что использование лабораторных методов для оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы в ходе доклинических исследований или изучения влияния эндогенных/экзогенных веществ, не является обязательным. Они могут использоваться в качестве дополнительных или уточняющих исследований (ICH S7A).

Идеальный сердечный биомаркер должен обладать высокой специфичностью, его уровень должен быстро повышаться и снижаться после повреждения и коррелировать с его величиной, не зависеть от функционирования других органов, а также определяться стандартными и экономически доступными методами [21]. В контексте доклинических исследований должна быть как возможность определения кардиомаркеров

у лабораторных животных, так и целесообразность их использования в клинической практике, что обеспечит высокую трансляционность данных. Однако маркера, который сочетал бы в себе все перечисленные критерии, в настоящее время не существует.

Все используемые маркеры кардиотоксичности имеют определенные недостатки, наиболее частые из которых — низкая органоспецифичность, а также их белковая природа и, следовательно, видоспецифичность, что, в свою очередь, определяет высокую стоимость исследований. Сдерживающими факторами использования маркеров специфической токсичности также являются их короткое время жизни, сложность прогнозирования времени забора крови и ограниченный трансляционный потенциал [22].

Биомаркеры, используемые для выявления и идентификации повреждений сердца, подразделяются на характеризующие структурное (непосредственное) повреждение и некроз кардиомиоцитов (например, тропонины, сердечный белок, связывающий жирные кислоты) и указывающие на нарушения функциональной активности сердца (например, натрийуретические пептиды).

Маркеры структурных повреждений и некроза кардиомиоцитов. Тропонин — регуляторный глобулярный белок, состоящий из трех субъединиц, который участвует в процессе мышечного сокращения. Тропонин содержится в скелетных и сердечной мышцах, но отсутствует в гладкой мускулатуре [23].

Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) одобрило использование в доклинических исследованиях сердечных тропонинов (cardiac-specific troponins, cTn) T и I (cTnI и cTnT) при оценке потенциального повреждения миокарда у крыс, собак и обезьян [24]. Белки cTnI и cTnT обнаруживаются только в сердечной мышце, что определяет их высокую органоспецифичность, они способны высвобождаться в кровь при повреждении миокарда (некроз кардиомиоцитов), а повышение их содержания в крови коррелирует с объемом поражения [25]. Уровень тропонинов в ответ на повреждение увеличивается, в целом, схожим образом у разных видов лабораторных животных: в первые 2–3 ч после повреждения, коррелируя с гистопатологическими изменениями в миокарде [26–29]. В зависимости от модели патологического состояния сердечно-сосудистой системы повышенная концентрация

тропонинов у экспериментальных животных может сохраняться до 10 сут. Это обеспечивает довольно продолжительный период диагностической значимости их уровня (диагностическое окно), который включает в себя периоды выведения креатинкиназы и лактатдегидрогеназы.

Несмотря на описанные возможности, использование сТп в качестве маркеров кардиотоксичности лекарственных препаратов предусматривает и некоторые ограничения. Так, методы обнаружения разработаны и оптимизированы в основном для людей, а не для лабораторных животных [30]. Кроме того, сТп быстро выводится из крови некоторых видов лабораторных животных, например таких, как мыши и крысы, что требует корректировки временных точек отбора крови [31].

Наряду с тропонинами при повреждении миокарда в крови появляются и другие цитоплазматические белки, сигнализирующие об ишемии и некрозе кардиомиоцитов — например миоглобин (Mb) и белок, связывающий жирные кислоты (heart-type fatty-acid-binding protein, H-FABP). Mb и H-FABP являются ранними и чувствительными маркерами повреждения миокарда у человека, поступают в кровь в течение первых часов после повреждения. Однако оба этих показателя сами по себе недостаточно специфичны в качестве маркеров повреждений миокарда, достигают пика содержания в крови через 3–5 ч и к концу 24-часового периода обычно приходят в норму, кроме того, они представлены и в других тканях. Таким образом, измерение Mb и H-FABP целесообразнее проводить в составе мультимаркерной панели [32, 33].

Для выявления повреждения кардиомиоцитов у людей и животных используется целый ряд маркеров: ферменты аспарагиновая трансаминаза (АСТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), креатинкиназа (изоформа МВ, СК–МВ). Однако эти ферменты локализуются не только в клетках миокарда, они присутствуют и в других тканях организма. Так, АСТ находится во всех клетках организма, главным образом в клетках сердца и печени и, в меньшей степени, в почках и мышцах [34]. ЛДГ также содержится практически во всех клетках организма, наиболее активна в скелетной мускулатуре, сердечной мышце, почках, печени и эритроцитах [35]. Существует пять разных изоформ данного фермента, которые отличаются молекулярной структурой и расположением в организме. Для миокарда основными являются изоформы 1 и 2, однако они также присутствуют в эритроцитах и кор-

ковом веществе почек. Изоформа креатинкиназы МВ почти полностью находится в сердечной мышце, однако этот изофермент также обнаруживается в скелетных мышцах [36].

Отсутствие тканевой специфичности имеет большее значение для использования этих ферментов в качестве биомаркеров у животных, поскольку стресс и ограничения физической подвижности животных во время выполнения манипуляций могут вызывать легкое или умеренное высвобождение мышечных компонентов. Кроме того, кардиотоксичные препараты часто бывают миотоксичны, что в совокупности усложняет выявление органов-мишеней токсического действия. Но, несмотря на все ограничения, данные ферменты можно использовать как вспомогательные маркеры в доклинических экспериментах.

Маркеры функциональных изменений сердца.

Потенциальными биомаркерами для идентификации кардиотоксичных соединений могут служить предсердный и мозговой натрийуретические пептиды — ANP и BNP, предшественники которых, proANP и proBNP соответственно, синтезируются в кардиомиоцитах предсердий и желудочков сердца и высвобождаются в ответ на их растяжение, вызванное повышением давления или нейрогормональными стимулами. В процессе секреции молекулы proANP и proBNP расщепляются на активные ANP и BNP и N-терминальные фрагменты (NT-proANP и NT-proBNP соответственно), при этом их секретируемые количества находятся в тесной корреляционной связи, а период полураспада у NT-proANP и NT-proBNP (~2,5 и 15,5 мин соответственно) более длителен, чем у ANP и BNP (~0,5 и 6 мин соответственно) [37].

Пептид NT-proBNP — биомаркер, наиболее часто используемый в доклинических токсикологических исследованиях. NT-proBNP является чувствительным и специфичным биомаркером при диагностике сердечной недостаточности у людей и животных. Уровень BNP также повышен при дилатационной и гипертрофической кардиомиопатии, диастолической дисфункции и системной гипертензии. Потенциальная ценность сывороточных натрийуретических пептидов как биомаркеров для дифференциации путей развития гипертрофии сердца при доклинической оценке безопасности лекарственных средств показана в исследованиях на крысах [37]. Так, повышение уровней NT-proANP и NT-proBNP наблюдалось при лекарственно-индуцированной гипертрофии сердца,

но не при гипертрофии, вызванной физической нагрузкой у крыс.

Следует отметить, что уровень натрийуретических пептидов значительно повышается и при ряде некардиальных состояний, связанных с увеличением объема циркулирующей в сосудах крови и артериального давления. Если в организме задерживается жидкость, то левый желудочек работает с большей нагрузкой и его стенки растягиваются, в результате этого концентрация в крови BNP и NT-proBNP значительно увеличивается. Чаще всего такие изменения происходят при сердечной недостаточности, но могут наблюдаться при тромбоэмболии легочной артерии, циррозе печени, заболеваниях почек [38].

В результате анализа источников литературы было выявлено, что у большинства лабораторных животных детекция рассматриваемых маркеров происходит в течение 5–24 ч после моделирования повреждения. При моделировании сердечных заболеваний у лабораторных животных для получения общей характеристики как структурных, так и функциональных воздействий на сердце целесообразно проводить совместное определение как натрийуретических пептидов, так и специфических маркеров структурного повреждения сердца (табл. 1).

Схема детекции кардиомаркеров в крови лабораторных животных в ответ на острое повреждение, отражающая ориентировочные временные диапазоны повышения и снижения маркеров (рис. 1), составлена по результатам анализа большого количества источников литературы и является усредненной [20, 24–44]. Данная схема подготовлена на основании данных, полученных из исследований с использованием крыс, собак и приматов, для других видов ее можно рассматривать как ориентировочную.

Наибольшее диагностическое окно характерно для тропонинов, которые чаще всего у лабораторных животных можно детектировать как в течение первых 24 ч, так и позже. Натрийуретические пептиды также детектируются в крови на протяжении нескольких суток. H-FABP, CK-MB и Mb являются ранними маркерами сердечной патологии как у человека, так и у многих видов лабораторных животных, поэтому пик их активности приходится на первые 1–6 ч с момента воздействия кардиотоксиканта. Пик повышения концентрации АСТ и ЛДГ у многих лабораторных животных — 5–12 ч. В целом на скорость появления и увеличение концентрации кардиомаркеров в крови большое

влияние будет оказывать конкретный дизайн исследования, выбранный способ моделирования патологического состояния (в случае фармакодинамических исследований), а при лекарственно-индуцированном поражении — класс препарата, его доза и кратность введения. Оптимальный вариант отбора образцов крови в определенные промежутки времени, например через 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 ч и так далее. Это позволит оценить изменение концентрации исследуемого маркера в динамике и не пропустить повышение и снижение его уровня. При многократном введении кардиотоксичных веществ длительность периода определения кардиомаркеров в крови должна быть увеличена.

Маркеры повреждения сосудов. Оценка потенциального повреждения сосудов является важной частью исследования безопасности в процессе разработки лекарственных препаратов. Система крово- и лимфообращения обеспечивает в организме процессы метаболизма, в частности транспорт различных веществ, что подвергает сосуды высокому риску воздействия лекарственных агентов. Выявление лекарственно-индуцированного повреждения сосудов (ЛИПС) — важная, но очень сложная задача, поскольку специфические циркулирующие биомаркеры раннего повреждения сосудов у человека на сегодняшний день не определены [45].

Консорциум по тестовому прогнозированию безопасности (Predictive Safety Testing Consortium, PSTC) создал рабочую группу по сосудистому повреждению (Vascular Injury Working Group, VIWG) для разработки и квалификации трансляционных биомаркеров ЛИПС [46], которая выделила несколько наиболее перспективных из них.

ЛИПС обычно характеризуется повреждением эндотелия и гладкомышечных клеток сосудов, а также воспалением. В связи с этим выявление васкулотоксичности может основываться на оценке специфических биомаркеров, связанных с высвобождением молекул адгезии эндотелиальных клеток и/или маркеров их активации (ангиопоэтин-2, эндотелин-1, E-селектин, тромбоспондин-1 и VEGF- α), а также определении неспецифических белков острой фазы воспаления (Timp-1, липокалин-2, KC/GRO (Cxcl1), α -1 кислый гликопротеин 1 и общий оксид азота) [38].

Целесообразно также проведение клинического анализа крови и оценка уровня электролитов (калия, натрия и хлора) в сыворотке крови. Клинический анализ крови позволяет диагностировать большинство заболеваний, связан-

Таблица 1. Биомаркеры, используемые для выявления и идентификации повреждений сердца в доклинических исследованиях (по [20, 24–38])

Table 1. Biomarkers used to detect and identify cardiac damage in preclinical studies (adapted from [20, 24–38])

Свойство <i>Parameter</i>	Tn	ANP	BNP	H-FABP	СК-МВ <i>CK-MB</i>	Миогло- бин <i>Myoglobin</i>	АСТ <i>AST</i>	ЛДГ1/ ЛДГ2 <i>LDH1/ LDH2</i>
Специфичность ткани <i>Tissue specificity</i>	Абсолют- ная <i>Absolute</i>	Абсолют- ная <i>Absolute</i>	Абсолют- ная <i>Absolute</i>	Умерен- ная <i>Moderate</i>	Умерен- ная <i>Moderate</i>	Низкая <i>Low</i>	Низкая <i>Low</i>	Умерен- ная <i>Moderate</i>
Циркуляция в крови в норме <i>Presence in circu- lating blood under normal conditions</i>	Отсутству- ет <i>No</i>	Отсутству- ет <i>No</i>	Отсутству- ет <i>No</i>	Присут- ствует <i>Yes</i>	Присут- ствует <i>Yes</i>	Присут- ствует <i>Yes</i>	Присут- ствует <i>Yes</i>	Присут- ствует <i>Yes</i>
Стабильность в крови <i>Stability in blood</i>	Высокая <i>High</i>	Высокая <i>High</i>	Высокая <i>High</i>	Низкая <i>Low</i>	Умерен- ная <i>Moderate</i>	Низкая <i>Low</i>	Высокая <i>High</i>	Высокая <i>High</i>
Активность использования в доклинических исследованиях <i>Frequency of use in preclinical studies</i>	Высокая <i>High</i>	Высокая или уме- ренная <i>High or moderate</i>	Высокая или уме- ренная <i>High or moderate</i>	Низкая <i>Low</i>	Умерен- ная <i>Moderate</i>	Низкая <i>Low</i>	Высокая <i>High</i>	Умерен- ная <i>Moderate</i>
Предпочтитель- ная тест-система в доклинических исследованиях <i>Pr linical studies</i>	Крысы, собаки, приматы <i>Rats, dogs, primates</i>	Крысы, кролики, кошки, со- баки, кар- ликовые свиньи, приматы <i>Rats, cats, rabbits, cats, dogs, minipigs, primates</i>	Крысы, кошки, со- баки, кар- ликовые свиньи, приматы <i>Rats, cats, dogs, minipigs, primates</i>	Мыши, крысы <i>Mice, rats</i>	Мыши, крысы, кошки, со- баки, кар- ликовые свиньи, приматы <i>Mice, rats, cats, dogs, minipigs, primates</i>	Мыши, крысы <i>Mice, rats</i>	Мыши, крысы, кролики, хорьки, кошки, со- баки, кар- ликовые свиньи, приматы <i>Mice, rats, rabbits, ferrets, cats, dogs, minipigs, primates</i>	Мыши, крысы, кролики, хорьки, кошки, со- баки, кар- ликовые свиньи, приматы <i>Mice, rats, rabbits, ferrets, cats, dogs, minipigs, primates</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. Tn – тропонины; ANP – предсердный натрийуретический пептид; BNP – мозговой натрийуретический пептид; H-FABP – белок, связывающий жирные кислоты; СК-МВ – изоформа креатинкиназы МВ; АСТ – аспарагиновая трансаминаза; ЛДГ1/ЛДГ2 – изоформы лактатдегидрогеназы 1 и 2.

Note. Tn, troponins; ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; H-FABP, heart-type fatty-acid-binding protein; CK-MB, creatine kinase-myocardial band; AST, aspartate aminotransferase; LDH1/LDH2, lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 2.

ных с сердечно-сосудистой системой, включая инфаркт миокарда, инсульт, воспалительные процессы и многие другие патологии. Баланс электролитов является важным показателем общего состояния здоровья, в частности функционирования почек и сердца [38].

Морфологические методы

Морфологические методы исследования применимы, если лекарственный препарат способен опосредовать дегенерацию и некроз кардиомиоцитов. Если кардиотоксичное соединение влияет только на процессы проводимости и сократимости, как правило, значимых морфо-

логических изменений в миокарде не обнаруживается [47].

Наиболее распространенными подходами для оценки кардиотоксичности являются регистрация массы сердца, оценка морфологии путем стандартного гистологического исследования (с окраской гематоксилином и эозином) или в сочетании с гистохимическими методами, а также иммуногистохимическое исследование [47].

Введение некоторых препаратов может приводить к изменению массы сердца из-за гипертрофии или атрофии кардиомиоцитов [47, 48]. Изменение массы сердца может быть единственным признаком, указывающим на гипер-

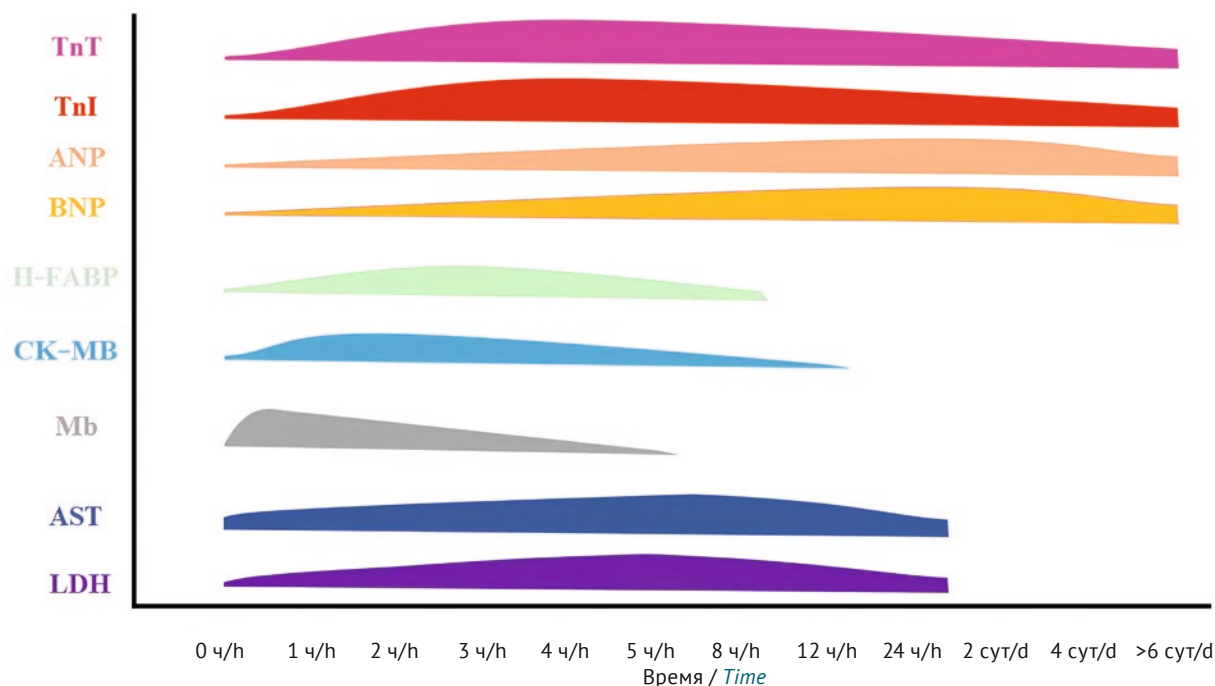


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис. 1. Сводная информация об изменении уровня сердечных маркеров в крови лабораторных животных в ответ на острое повреждение [20, 24–44]. TnT – тропонин Т; TnI – тропонин I; ANP – предсердный натрийуретический пептид; BNP – мозговой натрийуретический пептид; H-FABP – белок, связывающий жирные кислоты; CK-MB – изоформа креатинкиназы MB; Mb – миоглобин; AST – аспарагиновая трансаминаза; LDH – лактат-дегидрогеназа

Fig. 1. Summary of changes in the levels of cardiac markers in the blood of laboratory animals in response to acute injury [20, 24–44]. TnT, troponin T; TnI, troponin I; ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; H-FABP, heart-type fatty-acid-binding protein; CK-MB, creatine kinase-myocardial band; Mb, myoglobin; AST, aspartate aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase.

трофию или атрофию, однако эти данные могут быть сложно интерпретировать ввиду наличия биологической вариабельности определяемого параметра, отсутствия точных видовых референтных интервалов массовых коэффициентов органов, что определяет необходимость установления внутрилабораторных референтных интервалов масс органов и их массовых коэффициентов [49–54].

Стандартное гистологическое исследование позволяет выявить морфологические изменения, связанные с действием препарата, и их характер, а также предоставить информацию о взаимосвязи этих изменений с дозой и продолжительностью введения [48, 55].

Для обеспечения наилучшей оценки изменений сердца в токсикологических исследованиях важно стандартизировать отбор проб [56, 57]. Так, например, у крыс и мышей рекомендуется рассекать сердце продольно, через оба желу-

дочка, что обеспечивает попадание всех необходимых структур в область среза [58].

Основными морфофункциональными структурами, представляющими интерес при морфологическом изучении влияния препарата на сердечно-сосудистую систему, считаются сосочковые мышцы, субэндокардиальная область, клапаны и коронарные артерии [56]. Для крупных животных рекомендуют проводить оценку состояния стенки обоих предсердий и желудочков, межжелудочковой перегородки, атриовентрикулярных и аортального клапанов. Дополнительно в списке могут присутствовать синоатриальный и атриовентрикулярный узел для оценки проводящей системы сердца [56, 57].

Морфологические критерии изменений миокарда включают в себя обнаружение дегенерации/некроза кардиомиоцитов, вакуолизации кардиомиоцитов, кровоизлияний, отложения пигментов и белковых веществ, очагов мине-

рации, фиброза, воспалительных очагов (рис. 2–6, опубликованы на сайте журнала⁹) [47, 48, 55, 56, 59–62]. При оценке морфологических изменений крайне важно отличать их от спонтанных и фоновых изменений, характерных для животных [55, 56].

Немаловажным этапом является не просто регистрация самого факта наличия микроскопических находок — следует отмечать степень тяжести поражений и их распределение (очаговые, многоочаговые, диффузные), локализацию (правый желудочек, левый желудочек, межжелудочковая перегородка и т.д.), а также дополнительные модификаторы патологии, если они имеются (например, тип воспаления) [63]. Кроме того, степень тяжести поражения можно оценить путем количественного измерения площади очага дегенерации/некроза или фиброза. Для оценки размера очага поражения оптимальным считается исследование 6–8 гистологических препаратов от животного [64].

Трифенилтетразолия хлорид (ТТС) — один из широко используемых и доступных индикаторов для визуализации ишемических повреждений и оценки поражения сердца, в частности инфаркта, у животных. Анализ с применением ТТС в исследованиях кардиотоксичности препаратов имеет преимущество перед стандартным гистологическим исследованием, позволяя выявлять структурно не измененные, но функционально скомпрометированные кардиомиоциты [65]. Бесцветный ТТС ферментативно восстанавливается в живых тканях при участии различных дегидрогеназ до окрашенного в красный цвет соединения 1,3,5-трифенилформазан, в результате чего неповрежденные ткани миокарда окрашиваются в темно-красный цвет, в то время как в зонах некроза ТТС остается в исходной форме, и эти участки миокарда будут более бледными (рис. 7, опубликован на сайте журнала¹⁰).

Иммуногистохимическое исследование может применяться для определения маркеров, которые обнаруживаются в интересующей ткани и утрачиваются при разрушении клеток (например, тропонины cTnI и cTnT), часто используют мембранные CD-маркеры, отражающие течение воспалительного процесса, а также маркеры, которые накапливаются в поврежденной ткани, например комплемент и фибрин [66].

Поражение сосудов (рис. 8, опубликован на сайте журнала¹¹) — также часто встречаю-

щаяся находка при оценке безопасности лекарственных средств [66]. Интерпретация найденных сосудистых изменений осложняется наличием спонтанной сосудистой патологии у лабораторных животных (узелковый полиартериит, спонтанный полиартериит биглей и др.) [66, 67].

Несмотря на разнообразие механизмов развития ЛИПС, клеточный ответ в целом развивается одинаково во всех случаях. Независимо от последовательности событий и их патофизиологии активация и повреждение эндотелиальных клеток, повреждение мышечной стенки и воспаление, характеризующиеся сосудистой утечкой, инфильтратами воспалительных клеток, являются постоянными признаками всех основных типов ЛИПС [66]. Таким образом, стандартное гистологическое исследование может успешно применяться для установления факта наличия повреждения сосудов, но не позволит выяснить механизмы его развития.

Для успешной идентификации ЛИПС рабочей группой по сосудистому повреждению (VIWG) разработаны рекомендации по отбору органов. Стандартный набор органов для рутинной оценки включает в себя аорту, сердце, место введения, почки, печень, скелетную мышцу, брыжейку и семенники. При этом брыжейку рекомендуют отбирать методом валика, аорту и скелетную мускулатуру — в продольном и поперечном сечении, а для сердца рекомендуется изготовить несколько срезов, чтобы повысить вероятность обнаружения поражения коронарных артерий [66]. Список может быть расширен при необходимости.

Среди микроскопических находок, которые характеризуют ЛИПС, отмечают медиальный некроз, воспалительную инфильтрацию меди и адвентиции, а также кровоизлияния [59].

Строго специфичных иммуногистохимических маркеров для ЛИПС на данный момент также не обнаружено, однако некоторые маркеры используются для оценки сосудистого повреждения и в совокупности с другими данными могут позволить сделать суждение о ЛИПС. Среди них CD31 — трансмембранный гликопротеин, являющийся маркером эндотелиальных клеток и участвующий в миграции лейкоцитов в воспалительный очаг, а также фактор фон Виллебранда, который демонстрирует обильное внеклеточное иммунопозитивное окрашивание

⁹ <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2025-475-fig>

¹⁰ <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2025-475-fig>

¹¹ <https://doi.org/10.30895/2312-7821-2025-475-fig>

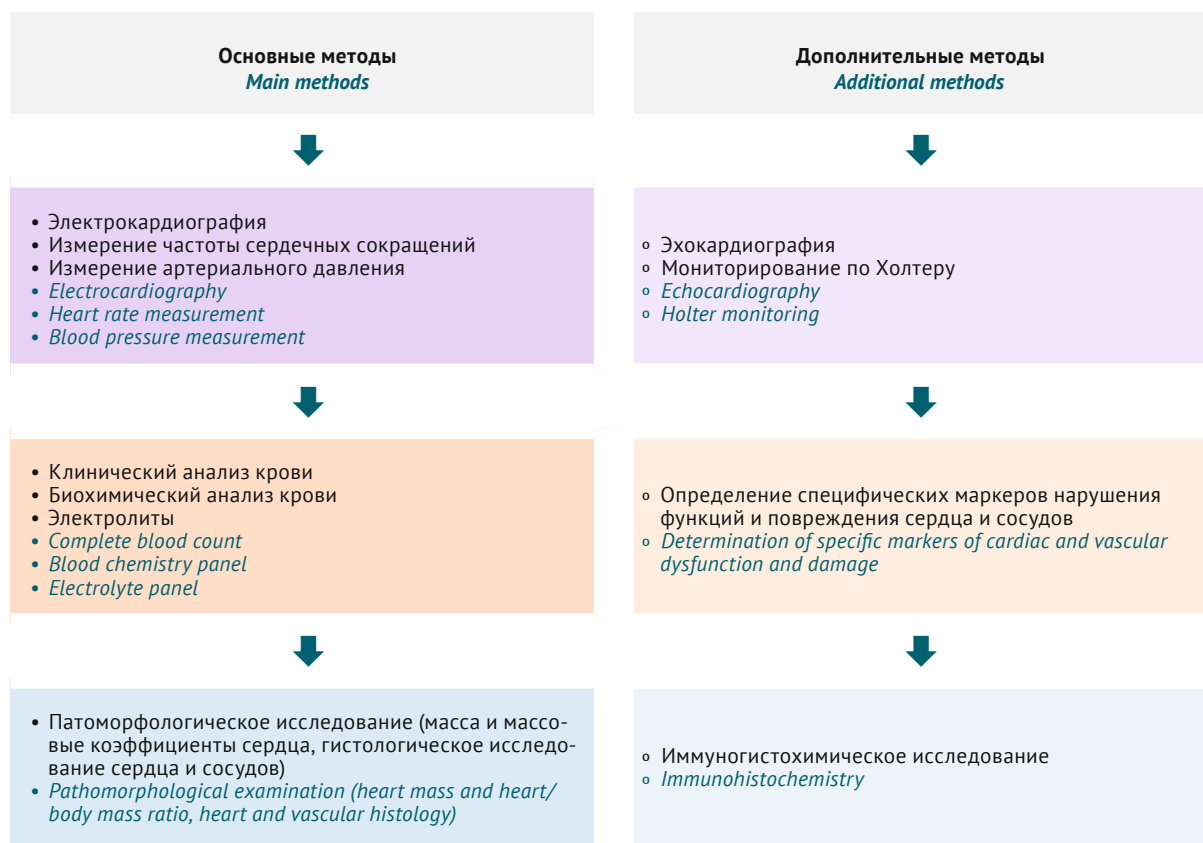


Рисунок подготовлен авторами / The figure is prepared by the authors

Рис 9. Схема комплексной оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы лабораторных животных

Fig 9. Schematic representation of comprehensive cardiovascular function assessment in laboratory animals

при прогрессировании повреждения сосудов и свидетельствует о разрушении эндотелиальных клеток [68].

Кавеолин-1 (caveolin-1, CAV-1) и антитела к гладкой мускулатуре (smooth muscle antibodies, SMA) являются иммуногистохимическими маркерами повреждения гладкомышечных клеток сосудов, так как они присутствуют в нормальных клетках и отсутствуют в поврежденных [68, 69]. Как маркеры нарушения межклеточных контактов в клетках стенки сосуда часто используются ZO-1, claudin, connexin 43. Иммунореактивность этих белков снижается или пропадает в местах повреждения сосудов [69]. Кроме того, иммуногистохимический метод позволяет обнаружить в стенке сосуда депозиты веществ, накапливающихся при патологии стенки сосудов или окружающих тканей, таких как комплемент C3, фибрин/фибриноген, иммунные комплексы [69–71].

Все перечисленные иммуногистохимические маркеры могут помочь подтвердить повреждение сосудов и установить морфологические

особенности, однако не являются строго специфичными для ЛИПС и требуют комплексной оценки. Следует отметить, что при использовании данного метода возможна только полуколичественная оценка выраженности иммуногистохимического окрашивания, что накладывает ограничения на его использование.

Оценка функционального состояния сердечно-сосудистой системы в доклинических исследованиях является важнейшей составляющей изучения фармакологической безопасности. Ввиду структурной и функциональной сложности, а также значимости рассматриваемой системы невозможно составить всеобъемлющий и универсальный план оценки ее состояния, но возможно выделить основные (критические) значимые паттерны (блоки), на которые по мнению авторов следует обратить внимание. Обобщенный перечень методов оценки функционального состояния сердечно-сосудистой системы на доклиническом этапе представлен на рисунке 9.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка влияния лекарственных средств на сердечно-сосудистую систему представляет собой один из ключевых аспектов доклинических исследований, требующий всестороннего и детального подхода. Оценку кардиотоксичности целесообразно начинать с использования инструментальных методов, наиболее информативными среди которых являются электрокардиография, измерение ЧСС и АД, что входит в минимальный перечень обязательных тестов для оценки фармакологической безопасности (ICH S7A, ICH S7B). В дополнение к инструментальным методам диагностики рекомендуется проводить лабораторные исследования. Оптимальным решением будет использование одного специфического маркера, например тропонина I или T, а также нескольких дополнительных маркеров на выбор, таких как ЛДГ, АСТ, СК-МВ. Кроме того, целесообразно провести общий

анализ крови и оценить электролитный состав крови. В то же время следует принимать во внимание временной промежуток, в течение которого происходит нарастание концентрации интересующих показателей.

Для более углубленного анализа рекомендуется применять гистологические и иммуногистохимические исследования сердца и сосудов, что позволит оценить изменения на тканевом и клеточном уровнях.

Таким образом, предложенный подход позволяет оценить возможные токсические проявления лекарственного средства на биохимическом, структурном или физиологическом уровнях, что делает возможным проведение полной и корректной оценки потенциальной кардио- и васкулотоксичности новых лекарственных средств, а также увеличивает трансляционный потенциал данных, получаемых на доклиническом этапе исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mladěna P, Applová L, Patočka J, Costa VM, Remiao F, Pourová J. Comprehensive review of cardiovascular toxicity of drugs and related agents. *Med Res Rev*. 2018;38(4):1332–403. <https://doi.org/10.1002/med.21476>
- Guth BD. Preclinical cardiovascular risk assessment in modern drug development. *Toxicol Sci*. 2007;97(1):4–20. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm026>
- Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*. 2006;440(7083):463–9. <https://doi.org/10.1038/nature04710>
- Gralinski MR. The dog's role in the preclinical assessment of QT interval prolongation. *Toxicol Pathol*. 2003;31(Suppl):11–6. <https://doi.org/10.1080/0192623039017488>
- Heyen JR, Vargas HM. The use of nonhuman primates in cardiovascular safety assessment. In: Bluemel J, Schenck E, Korte S, Weinbauer GF, eds. *The nonhuman primate in nonclinical drug development and safety assessment*. Academic Press; 2015. P. 551–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417144-2.00029-9>
- Енгальчева ГН, Сюбаев РД, Горячев ДВ. Исследования фармакологической безопасности лекарственных средств: экспертная оценка полученных результатов. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2017;7(2):92–7. Engalycheva GN, Syubaev RD, Goryachev DV. Safety pharmacology studies of medicinal products: Evaluation of results. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2017;7(2):92–7 (In Russ.). EDN: YSDMLV
- Sarazan RD, Mittelstadt S, Guth B, Koerner J, Zhang J, Pettit S. Cardiovascular function in nonclinical drug safety assessment: Current issues and opportunities. *Int J Toxicol*. 2011;30(3):272–86. <https://doi.org/10.1177/1091581811398963>
- Ross RA, Foley CM, Jones HM, Osinski MA. A method for assessing and monitoring consistency of nonclinical ECG analysis. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2022;116:107189. <https://doi.org/10.1016/j.jvascn.2022.107189>
- Ewart L, Milne A, Adkins D, Benjamin A, Bialecki R, Chen Y, et al. A multi-site comparison of *in vivo* safety pharmacology studies conducted to support ICH S7A & B regulatory submissions. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;68(1):30–43. <https://doi.org/10.1016/j.jvascn.2013.04.008>
- Arini PD, Liberczuk S, Mendieta JG, Santa María M, Bertrán GC. Electrocardiogram delineation in a Wistar rat experimental model. *Comput Math Methods Med*. 2018;2018(1):2185378. <https://doi.org/10.1155/2018/2185378>
- Authier S, Pugsley MK, Troncy E, Curtis MJ. Arrhythmogenic liability screening in cardiovascular safety pharmacology: Commonality between non-clinical safety pharmacology and clinical thorough QT (TQT) studies. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010;62(2):83–8. <https://doi.org/10.1016/j.jvascn.2010.06.005>
- Mavropoulou A, Oliveira P, Willis R. Holter monitoring in dogs: 24 h vs. 48 h. *Vet J*. 2021;272:105628. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105628>
- Lyhne MK, Debes KP, Helgogaard T, Vegge A, Kildegaard J, Pedersen-Bjergaard U, et al. Electrocardiography and heart rate variability in Göttingen minipigs: Impact of diurnal variation, lead placement, repeatability and streptozotocin-induced diabetes. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2022;118:107221. <https://doi.org/10.1016/j.jvascn.2022.107221>
- Nakayama S, Koie H, Kato-Tateishi M, Pai C, Ito-Fujishiro Y, Kana-yama K, et al. Establishment of a new formula for QT interval correction using a large colony of cynomolgus monkeys. *Exp Anim*. 2020;69(1):18–25. <https://doi.org/10.1538/expanim.19-0009>
- Kahankova R, Kolarik J, Brablik J, Barnova K, Simkova I, Martinek R. Alternative measurement systems for recording cardiac activity in animals: A pilot study. *Animal Biotelemetry*. 2022;10(1):15. <https://doi.org/10.1186/s40317-022-00286-y>
- Skelding A, Valverde A. Non-invasive blood pressure measurement in animals: Part 1 – techniques for measurement and validation of non-invasive devices. *Can Vet J*. 2020;61(4):368–74. PMID: 32255821
- Wang Y, Thatcher SE, Cassis LA. Measuring blood pressure using a noninvasive tail cuff method in mice. *Methods Mol Biol*. 2017;1614:69–73. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7030-8_6
- Tuohy PP, Rasis AL, Drynan EA. Agreement of invasive and non-invasive blood pressure measurements in anaesthetised pigs using the SurgiVet V9203. *Res Vet Sci*. 2017;115:250–4. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.022>
- Terzi OS, Toksöz C, Akbaba M, Emrealp G. The use of two dimensional speckle tracking echocardiography in veterinary cardiology. *Atatürk Üniv Vet Bilim Derg*. 2021;16(2):176–81. <https://doi.org/10.17094/ataunivbd.828343>
- Kim K, Chini N, Fairchild DG, Engle SK, Reagan WJ, Summers SD, et al. Evaluation of cardiac toxicity biomarkers in rats from different laboratories. *Toxicol Pathol*. 2016;44(8):1072–83. <https://doi.org/10.1177/0192623316668276>

21. Oyama MA. Using cardiac biomarkers in veterinary practice. *Clin Lab Med.* 2015;35(3):555–66.
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.005>
22. Walker DB. Serum chemical biomarkers of cardiac injury for non-clinical safety testing. *Toxicol Pathol.* 2006;34(1):94–104.
<https://doi.org/10.1080/01926230500519816>
23. Wang Z, Raunser S. Structural biochemistry of muscle contraction. *Annu Rev Biochem.* 2023;92(1):411–35.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052521-042909>
24. O'Brien PJ, Reagan WJ, York MJ, Jacobsen MC. Review of qualification data for cardiac troponins. FDA, CDER; 2011.
25. Pan DS, Li B, Wang SL. Evaluation of biomarkers for doxorubicin-induced cardiac injury in rats. *Exp Ther Med.* 2022;24(6):1–13.
<https://doi.org/10.3892/etm.2022.11648>
26. York M, Scudamore C, Brady S, Chen C, Wilson S, Curtis MJ, et al. Characterization of troponin responses in isoproterenol-induced cardiac injury in the Hanover Wistar rat. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):606–17.
<https://doi.org/10.1080/01926230701389316>
27. Clements P, Brady S, York M, Berridge B, Mikaelian I, Nicklaus R, et al. Time course characterization of serum cardiac troponins, heart fatty acid-binding protein, and morphologic findings with isoproterenol-induced myocardial injury in the rat. *Toxicol Pathol.* 2010;38(5):703–14.
<https://doi.org/10.1177/0192623310374969>
28. O'Brien PJ. Blood cardiac troponin in toxic myocardial injury: Archetype of a translational safety biomarker. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006;6(5):685–702.
<https://doi.org/10.1586/14737159.6.5.685>
29. Reagan WJ, Barnes R, Harris P, Summers S, Lopes S, Stubbs M, et al. Assessment of cardiac troponin I responses in nonhuman primates during restraint, blood collection, and dosing in preclinical safety studies. *Toxicol Pathol.* 2017;45(2):335–43.
<https://doi.org/10.1177/0192623316663865>
30. Apple FS, Murakami MM, Ler R, Walker D, York M; HESI Technical Committee of Biomarkers Working Group on Cardiac Troponins. Analytical characteristics of commercial cardiac troponin I and T immunoassays in serum from rats, dogs, and monkeys with induced acute myocardial injury. *Clin Chem.* 2008;54(12):1982–9.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.097568>
31. Muslimovic A, Fridén V, Tenstad O, Starnberg K, Nyström S, Wesén E, et al. The liver and kidneys mediate clearance of cardiac troponin in the rat. *Sci Rep.* 2020;10(1):6791.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-63744-8>
32. Alhadi HA, Fox KA. Do we need additional markers of myocyte necrosis: The potential value of heart fatty-acid-binding protein. *QJM.* 2004;97(4):187–98.
<https://doi.org/10.1093/qjmed/hch037>
33. O'Brien PJ, Smith DE, Knechtel TJ, Marchak MA, Pruimboom-Brees I, Brees DJ, et al. Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Lab Anim.* 2006;40(2):153–71.
<https://doi.org/10.1258/002367706776319042>
34. Gavazza A, Fruganti A, Turinelli V, Marchegiani A, Spaterna A, Tesi B, et al. Canine traditional laboratory tests and cardiac biomarkers. *Front Vet Sci.* 2020;7:320.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00320>
35. Klein R, Nagy O, Tóthová C, Chovanova F. Clinical and diagnostic significance of lactate dehydrogenase and its isoenzymes in animals. *Vet Med Int.* 2020;2020:5346483.
<https://doi.org/10.1155/2020/5346483>
36. Kolmanova E, Bartosova L, Khazneh E, Parak T, Suchy P. Comparison of the specificity of cardiac troponin I and creatine kinase MB in isoproterenol-induced cardiotoxicity model in rats. *Acta Veterinaria Brno.* 2015;84(4):343–50.
<https://doi.org/10.2754/avb201584040343>
37. Dunn ME, Manfredi TG, Agostinucci K, Engle SK, Powe J, King NM, et al. Serum natriuretic peptides as differential biomarkers allowing for the distinction between physiologic and pathologic left ventricular hypertrophy. *Toxicol Pathol.* 2017;45(2):344–52.
<https://doi.org/10.1177/0192623316634231>
38. Aulbach AD, Amuzie CJ. Biomarkers in nonclinical drug development. In: Faqi AS, ed. A comprehensive guide to toxicology in non-clinical drug development. Academic Press; 2024. P. 463–87.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85704-8.00035-9>
39. Tümer KÇ, Özdemir H, Eröksüz H. Evaluation of cardiac troponin I in serum and myocardium of rabbits with experimentally induced polymicrobial sepsis. *Exp Anim.* 2020;69(1):54–61.
<https://doi.org/10.1538/expanim.19-0046>
40. Tonomura Y, Mori Y, Torii M, Uehara T. Evaluation of the usefulness of biomarkers for cardiac and skeletal myotoxicity in rats. *Toxicology.* 2009;266(1–3):48–54.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.10.014>
41. Engle SK, Jordan WH, Pritt ML, Chiang AY, Davis MA, Zimmermann JL, et al. Qualification of cardiac troponin I concentration in mouse serum using isoproterenol and implementation in pharmacology studies to accelerate drug development. *Toxicol Pathol.* 2009;37(5):617–28.
<https://doi.org/10.1177/0192623309339502>
42. Brady SM. The assessment of cardiac biomarkers in rat models of cardiotoxicity. London: University of London; 2008.
43. Dunn ME, Coluccio D, Hirkaler G, Mikaelian I, Nicklaus R, Lipshultz SE, et al. The complete pharmacokinetic profile of serum cardiac troponin I in the rat and the dog. *Toxicol Sci.* 2011;123(2):368–73.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr190>
44. Minomo H, Torikai Y, Furukawa T, Uchino H, Kadokura H, Nakama K, et al. Characteristics of troponins as myocardial damage biomarkers in cynomolgus monkeys. *J Toxicol Sci.* 2009;34(6):589–601.
<https://doi.org/10.2131/jts.34.589>
45. Bendjama K, Guionaud S, Aras G, Arber N, Badimon L, Bamberger U, et al. Translation strategy for the qualification of drug-induced vascular injury biomarkers. *Toxicol Pathol.* 2014;42(4):658–71.
<https://doi.org/10.1177/0192623314527644>
46. Sauer J-M, Walker EG, Porter AC. The predictive safety testing consortium: Safety biomarkers, collaboration, and qualification. *J Med Dev Sci.* 2016;1(1):34–45.
<https://doi.org/10.18063/jmds.2015.01.007>
47. McInnes E, ed. *Pathology for toxicologists: Principles and practices of laboratory animal pathology for study personnel.* Chichester: John Wiley & Sons; 2017.
48. Reagan WJ, York M, Berridge B, Schultze E, Walker D, Pettit S. Comparison of cardiac troponin I and T, including the evaluation of an ultrasensitive assay, as indicators of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Pathol.* 2013;41(8):1146–58.
<https://doi.org/10.1177/0192623313482056>
49. Луговик ИА, Макарова МН. Токсикологические исследования. Референтные интервалы массовых коэффициентов внутренних органов на выборке, состоящей из 1000 аутбредных крыс. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2021;(1):3–11.
50. Луговик ИА, Макарова МН. Toxicological studies. Reference intervals of mass coefficients of internal organs in a sample of 1000 rats. *Laboratory Animals for Science.* 2021;(1):3–11 (In Russ.).
<https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-01-01>
51. Рощина ЕА. Референтные интервалы по массовым коэффициентам органов кроликов и их абсолютным значениям. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2022;(1):3–42.
52. Roshchina EA. Reference intervals of rabbits organs mass coefficients and absolute weight. *Laboratory Animals for Science.* 2022;(1):34–42 (In Russ.).
<https://doi.org/10.29296/2618723X-2022-01-05>
53. Бородин АЮ. Референтные интервалы массовых коэффициентов внутренних органов морских свинок. *Лабораторные животные для научных исследований.* 2023;(3):68–73.
54. Borodina AYU. Reference intervals of mass coefficients of internal organs of guinea pigs. *Laboratory Animals for Science.* 2023;(3):68–73 (In Russ.).
<https://doi.org/10.57034/2618723X-2023-03-05>
55. Бородин АЮ, Султанова КТ. Референтные интервалы массовых коэффициентов внутренних органов хорьков и их абсолютные значения. *Ветеринарный фармакологический вестник.* 2024;(2):8–20.
56. Borodina AYU, Sultanova KT. Reference intervals of mass coefficients of internal organs of ferret and their absolute values. *Bulletin of Veterinary Pharmacology.* 2024;(2):8–20 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17238/issn2541-8203.2024.2.8>
57. Симонова ЕВ, Савватейкина АИ, Султанова КТ, Макарова МН, Мазукина ЕВ. Референтные интервалы по массовым коэффициентам органов карликовых свиней и их абсолютным значениям. *Ветеринарная патология.* 2024;23(2):41–50.
58. Simonova EV, Savvateikina AI, Sultanova KT, Makarova MN, Mazukina EV. Reference intervals of mass coefficients and absolute weight of mini pigs' organs. *Russian Journal of Veterinary Pathology.* 2024;23(2):41–50 (In Russ.).
<https://doi.org/10.23947/2949-4826-2024-23-2-41-50>

54. Симонова ЕВ, Султанова КТ. Референтные интервалы по массовым коэффициентам органов хомячков и их абсолютным значениям. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2024;(2):66–72.
Simonova EV, Sultanova KT. Reference intervals of mass coefficients of internal organs of hamster organs and their absolute values. *Laboratory Animals for Science*. 2024;(2):66–72 (In Russ.).
<https://doi.org/10.57034/2618723X-2024-02-06>
55. Jokinen MP, Lieuallen WG, Boyle MC, Johnson CL, Malarkey DE, Nyska A. Morphologic aspects of rodent cardiotoxicity in a retrospective evaluation of National Toxicology Program studies. *Toxicol Pathol*. 2011;39(5):850–60.
<https://doi.org/10.1177/0192623311413788>
56. Keenan CM, Vidal JD. Standard morphologic evaluation of the heart in the laboratory dog and monkey. *Toxicol Pathol*. 2006;34(1):67–74.
<https://doi.org/10.1080/01926230500369915>
57. Constantin I, Tăbăran AF. Dissection techniques and histological sampling of the heart in large animal models for cardiovascular diseases. *J Vis Exp*. 2022;(184):e63809.
<https://doi.org/10.3791/63809>
58. Morawietz G, Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Bube A, Keane K, Halm S, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice. Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol*. 2004;55(6):433–49.
<https://doi.org/10.1078/0940-2993-00350>
59. Gopinath C, Mowat V. *Atlas of toxicological pathology*. NY: Springer; 2014.
60. McKenzie WF, Alison R. Heart. In: Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery Jr CA, MacKenzie WF, eds. *Pathology of the Fischer rat: Reference and atlas*. San Diego: Academic Press; 1990. P. 461–72.
61. Elwell MR, Mahler JF. Heart, blood vessels and lymphatic vessels. In: Maronpot RR, Boorman GA, Gaul BW, eds. *Pathology of the mouse: Reference and atlas*. Vienna: Cache River Press; 1999. P. 361–80.
62. Berridge BR, Van Vleet JF, Herman E, eds. Cardiac, vascular, and skeletal muscle systems. In: Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, eds. *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology*. San Diego: Academic Press; 2013. P. 1567–665.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00046-7>
63. Johnson CL, Nyska A. Cardiovascular system – Heart. In: Cesta MF, Herbert RA, Brix A, Malarkey DE, Sills RC. *The National Toxicology Program Web-based nonneoplastic lesion atlas: A global toxicology and pathology resource*.
https://ntp.niehs.nih.gov/nnl/hematopoietic/bone_marrow/fibrosis/index.htm
64. Takagawa J, Zhang Y, Wong ML, Sievers RE, Kapasi NK, Wang Y, et al. Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: Comparison of area- and length-based approaches. *J Appl Physiol (1985)*. 2007;102(6):2104–11.
<https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00033.2007>
65. Csonka C, Kupai K, Kocsis GF, Novák G, Fekete V, Bencsik P, et al. Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010;61(2):163–70.
<https://doi.org/10.1016/j.jascn.2010.02.014>
66. Mikaelian I, Cameron M, Dalmas DA, Enerson BE, Gonzalez RJ, Guionaud S, et al. Nonclinical safety biomarkers of drug-induced vascular injury: Current status and blueprint for the future. *Toxicol Pathol*. 2014;42(4):635–57.
<https://doi.org/10.1177/0192623314525686>
67. Enerson BE, Lin A, Lu B, Zhao H, Lawton MP, Floyd E. Acute drug-induced vascular injury in beagle dogs: Pathology and correlating genomic expression. *Toxicol Pathol*. 2006;34(1):27–32.
<https://doi.org/10.1080/01926230500512068>
68. Brott D, Gould S, Jones H, Schofield J, Prior H, Valentin JP, et al. Biomarkers of drug-induced vascular injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;207(2):441–5.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.04.028>
69. Brott DA, Richardson RJ, Loudon CS. Evidence for the nitric oxide pathway as a potential mode of action in fenoldopam-induced vascular injury. *Toxicol Pathol*. 2012;40(6):874–86.
<https://doi.org/10.1177/019262331244402>
70. Yang JJ, Jennette JC, Falk RJ. Immune complex glomerulonephritis is induced in rats immunized with heterologous myeloperoxidase. *Clin Exp Immunol*. 1994;97(3):466–73.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1994.tb06111.x>
71. Miller DL, Dou C, Sorenson D, Liu M. Histological observation of islet hemorrhage induced by diagnostic ultrasound with contrast agent in rat pancreas. *PLoS One*. 2011;6(6):e21617.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021617>

Дополнительная информация. Рисунки 2–8 размещены на сайте журнала «Безопасность и риск фармакотерапии».

<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2025-475-fig>

Additional information. Figures 2–8 are posted on the website of *Safety and Risk of Pharmacotherapy*.

<https://doi.org/10.30895/2312-7821-2025-475-fig>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: К.Т. Султанова — концепция работы, написание текста рукописи, формулировка выводов; М.В. Мирошников — работа с источниками литературы, написание текста рукописи, формулировка выводов; А.Ю. Бородина, Е.В. Симонова, Ж.Ю. Устенко — работа с источниками литературы, написание текста рукописи; Е.В. Мазукина, К.Л. Крышень, А.А. Матичин — подготовка финальной версии текста рукописи, формулировка выводов; М.Н. Макарова — участие в формулировке выводов, критический пересмотр содержания рукописи; В.Г. Макаров — утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Kira T. Sultanova conceptualised the study, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. Mihail V. Miroshnikov worked with literature sources, drafted the manuscript, and formulated the conclusions. Antonina Yu. Borodina, Elizaveta V. Simonova, and Zhanna Yu. Ustenko worked with literature sources and drafted the manuscript. Elizaveta V. Mazukina, Kirill L. Kryshen, and Aleksandr A. Matichin prepared the final version of the manuscript and formulated the conclusions. Marina N. Makarova formulated the conclusions and critically revised the manuscript. Valery G. Makarov approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Султанова Кира Тимуровна, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9846-8335>
Мирошников Михаил Владимирович, канд. мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9828-3242>
Бородин Антонина Юрьевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5386-7551>
Симонова Елизавета Владимировна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8379-0279>
Устенко Жанна Юрьевна, канд. вет. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1299-0200>
Мазукина Елизавета Владимировна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1448-921X>
Крышень Кирилл Леонидович, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
Матичин Александр Алексеевич
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7478-4942>
Макарова Марина Николаевна, д-р мед. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
Макаров Валерий Геннадьевич, д-р мед. наук, профессор
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

Поступила 12.11.2024
После доработки 20.01.2025
Принята к печати 21.03.2025
Online first 21.05.2025

Kira T. Sultanova, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9846-8335>
Mihail V. Miroshnikov, Cand. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9828-3242>
Antonina Yu. Borodina
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5386-7551>
Elizaveta V. Simonova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8379-0279>
Zhanna Yu. Ustenko, Cand. Sci. (Vet.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1299-0200>
Elizaveta V. Mazukina
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1448-921X>
Kirill L. Kryshen, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
Aleksandr A. Matichin
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7478-4942>
Marina N. Makarova, Dr. Sci. (Med.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3176-6386>
Valery G. Makarov, Dr. Sci. (Med.), Professor
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2447-7888>

Received 12 November 2024
Revised 20 January 2025
Accepted 21 March 2025
Online first 21 May 2025