



Кардиотропные свойства соединения ZMEI-3 — потенциального ингибитора белков Ерас

Крыжановский С. А., Мокров Г. В., Цорин И. Б., Ионова Е. О., Вититнова М. Б.,
Столярук В. Н., Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Дурнев А. Д.

ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий»,
Москва, Российская Федерация

Аннотация

Введение. Известно, что аллостерическим эффектором цАМФ, помимо протеинкиназы А, являются регуляторные белки Ерас, которые в кардиомиоцитах играют ключевую роль в контроле электромеханического сопряжения и их ритмической активности. Однако в условиях патологии аномальная активность белков Ерас ответственна за гипертрофию и фиброз кардиомиоцитов и инициацию нарушений сердечного ритма.

Цель исследования. Изучение кардиотропной активности соединения N,2,4,6-тетраметил-N-(пиридин-4-ил)бензолсульфонамида (шифр ZMEI-3), потенциально обладающего свойствами антагонистов белков Ерас, на моделях нарушений ритма сердца и алкогольной кардиомиопатии (АКМП).

Материалы и методы. Эксперименты проводили на беспородных крысах-самцах. Антиаритмическую активность соединения ZMEI-3 оценивали на моделях аконитиновой и реперфузионной аритмий, а кардиопротективную активность на трансляционной модели АКМП, которая формируется через 24 недели принудительного приёма 10 % раствора этанола.

Результаты. На модели реперфузионных аритмий у крыс показано, что соединение ZMEI-3 (2 мг/кг/сут. в течение 7 дней в/б) уменьшает частоту возникновения опасных для жизни аритмий, в том числе фибрилляций желудочков. В условиях сформировавшейся АКМП изучаемое соединение (2 мг/кг/сут. в течение 28 дней в/б) увеличивало инотропную функцию сердца, о которой судили по величине фракции выброса левого желудочка. Гистологический анализ показал, что в условиях сформировавшейся АКМП соединение ZMEI-3 уменьшает выраженность морфологических признаков алкогольного поражения сердца.

Выводы. Соединение ZMEI-3 при курсовом применении оказывает выраженное антиаритмическое действие и уменьшает тяжесть течения алкоголь-обусловленной сердечной недостаточности.

Ключевые слова: белки Ерас; антагонисты белков Ерас; соединение ZMEI-3; нарушения ритма сердца; алкогольная кардиомиопатия; сократимость миокарда; крысы

Для цитирования:

Крыжановский С. А., Мокров Г. В., Цорин И. Б., Ионова Е. О., Вититнова М. Б., Столярук В. Н., Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Дурнев А. Д. Кардиотропные свойства соединения ZMEI-3 — потенциального ингибитора белков Ерас. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2024;(4):39–48. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-39-48>. EDN: KITWGE

Поступила: 01.11.2024. В доработанном виде: 01.12.2024. Принята к печати: 15.12.2024. Опубликовано: 30.12.2024.

The cardiotropic properties of ZMEI-3 compound — a potential inhibitor of Epac proteins

Sergey A. Kryzhanovskii, Grigory V. Mokrov, Iosif B. Tsorin, Ekaterina O. Ionova, Marina B. Vititnova,
Valeriy N. Stolyaruk, Irina A. Miroshkina, Alexandra V. Sorokina, Andrei D. Durnev

Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. It is known that the allosteric effector of cAMP, in addition to protein kinase A, is the Epac regulatory proteins, which in cardiomyocytes play a key role in the electromechanical coupling control and their rhythmic activity. However, under pathological conditions, abnormal activity of Epac proteins is responsible for the hypertrophy and fibrosis of cardiomyocytes and the initiation of cardiac arrhythmias.

Objective. To study the cardiotropic activity of the compound N,2,4,6-tetramethyl-N-(pyridin-4-yl)benzolsulfonamide (code ZMEI-3), which potentially has the properties of Epac protein antagonists, in models of cardiac arrhythmias and alcoholic cardiomyopathy (ACMP).

Materials and methods. Experiments were carried out on outbred male rats. The antiarrhythmic activity of the ZMEI-3 compound was assessed in models of aconitine and reperfusion arrhythmias, and the cardioprotective activity in a translational model of ACM, which is formed after 24 weeks of forced intake of 10 % ethanol.

Results. Using a model of reperfusion arrhythmias in rats, it was shown that the ZMEI-3 compound (2 mg/kg/day for 7 days i.p.) reduces the incidence of life-threatening arrhythmias, including ventricular fibrillation. In conditions of formed ACMP, the studied compound (2 mg/kg/day for 28 days i.p.) increased the inotropic function of the heart, which was judged by the value of the left ventricular ejection fraction. Histological analysis showed that in conditions of formed ACMP, the ZMEI-3 compound reduces the severity of morphological signs of alcoholic heart damage.

Conclusions. Compound ZMEI-3, when used in a course, has a pronounced antiarrhythmic effect and reduces the severity of alcohol-related heart failure.

Keywords: Epac proteins; Epac protein antagonists; compound ZMEI-3; cardiac arrhythmias; alcoholic cardiomyopathy; myocardial contractility; rats

For citations:

Kryzhanovskii SA, Mokrov GV, Tsorin IB, Ionova EO, Vititnova MB, Stolyaruk VN, Miroshkina IA, Sorokina AV, Durnev AD. The cardiotropic properties of ZMEI-3 compound — a potential inhibitor of Epac proteins. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2024;(4):39–48. (In Russ.). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2024-4-39-48>. EDN: KITWGE

Received: 01.11.2024. Revision received: 01.12.2024. Accepted: 15.12.2024. Published: 30.12.2024.

Введение / Introduction

Практически до конца XX века полагали, что единственным аллостерическим эффектором цАМФ является открытый в 1968 году Дональдом Уолшем фермент — цАМФ-зависимая протеинкиназа или протеинкиназа А (РКА) [1]. Однако в конце XX века появились публикации, свидетельствующие о том, что не все клеточные эффекты цАМФ могут быть опосредованы исключительно РКА, и было высказано предположение, что в клетках экспрессируется «неизвестная РКА-подобная молекула» [2, 3]. В декабре 1998 года голландские учёные из университета Утрехта в культивируемых эмбриональных фибробластах линии NIH/3T3 впервые идентифицировали цАМФ-зависимый белок, который без участия РКА активировал малые GEFазы (сAMP-GEFs) Rap суперсемейства белков Ras и назвали его цАМФ-регулируемый фактор обмена гуанидиновых нуклеотидов (сAMP-GEF) или обменный белок, напрямую активируемый цАМФ (exchange protein directly activated by cAMP, Ерас) [4]. Таким образом, было показано, что в клетках существует альтернативный, не зависящий от РКА, сопряжённый с цАМФ каскад регуляции внутриклеточных сигнальных путей.

Белки Ерас по своей структуре представляют единую полипептидную молекулу, тогда как РКА состоит из отдельных R- и C-субъединиц. Белки Ерас по сравнению с РКА эволюционно являются более «молодой» сигнальной молекулой, поскольку показано, что РКА экспрессируется и в организме одноклеточных эукариотов, например грибов (дрожжей) из класса сахаромикетов (*Saccharomyces cerevisiae*), тогда как белки Ерас идентифицированы только у многоклеточных организмов, преимущественно у млекопитающих [5]. РКА и белки Ерас в одной и той же клетке могут действовать как синергисты и/или инициировать не зависящие друг от друга, в том числе и противоположные эффекты [6, 7].

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что белки Ерас играют ключевую роль в регуляции базисных внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за поддержание внутриклеточного гомеостаза, а их гипер/гипоэкспрессия лежит в основе патогенеза многих патологических процессов, что позволяет рассматривать их как принципиально новую биомишень для создания оригинальных, высокоэффективных лекарственных средств [8].

Выделяют две изоформы сигнальных белков Ерас — Ерас1 или сAMP-GEF-I и Ерас2 или сAMP-GEF-II [9]. Обе эти изоформы экспрессируются в кардиомиоцитах, клетках гладкой мышцы и эндотелия сосудов [10, 11].

К настоящему времени накоплены убедительные данные, свидетельствующие о том, что белки Ерас играют существенную роль в регуляции деятельности

сердца, ангиогенеза, сосудистого тонуса и проницаемости сосудистой стенки, а также в поддержании целостности эндотелиального барьера [12, 13].

В кардиомиоцитах экспрессируются как белки Ерас1, так и белки Ерас2. В кардиомиоцитах локализация белков Ерас различна, с чем во многом и связаны различия в их функциональной активности: белки Ерас1 располагаются вблизи внутренней поверхности клеточной мембраны, на мембране митохондрий, на перинуклеарной мембране и, возможно, в ядре клетки, тогда как белки Ерас2 локализуются в области Z-линий рядом с Т-трубочками, вблизи которых сосредоточено скопление цистерн саркоплазматического ретикула [14]. Показано, что экспрессия белков Ерас1 у взрослых животных по сравнению с новорождёнными увеличивается на 42 %, тогда как белков Ерас2 — в 3,7 раза, что позволяет полагать, что с возрастом белки Ерас2 в миокарде становятся доминирующей изоформой [15].

В нормальных физиологических условиях белки Ерас1 и сопряжённые с ними сигнальные каскады регулируют инотропную и луситропную функции сердечной мышцы, межклеточное взаимодействие и апоптоз кардиомиоцитов [14, 16–18].

Однако белкам Ерас1 принадлежит существенная роль и в генезе патологии кардиомиоцитов. Так, в условиях острой ишемии миокарда гиперактивность белков Ерас1, локализованных не в цитозоле кардиомиоцитов, а в области внутренней мембраны и матрикса митохондрий (митохондриальная изоформа белка Ерас1 — MitЕрас1), влечёт за собой ишемия-обусловленную гибель кардиомиоцитов [19].

Аномальная активность белков Ерас1 в условиях хронической патологии сердечной мышцы ответственна за формирование гипертрофии, ремоделирования и фиброза миокарда [20–22].

Выше было отмечено, что белки Ерас2 локализуются в области Z-линий рядом с Т-трубочками, вблизи которых сосредоточено скопление цистерн саркоплазматического ретикула, в силу чего они играют одну из ключевых ролей в регуляции ритмической активности сердечной мышцы [23, 24]. Вместе с тем, избыточная активация белков Ерас2 и сопряжённых с ними сигнальных путей вызывает развитие нарушений ритма сердца [25, 26].

Таким образом, накопленные к настоящему времени данные позволяют рассматривать белки Ерас в качестве новой биомишени для разработки новых высокоэффективных лекарственных средств для лечения пациентов с нарушениями ритма сердца, хронической сердечной недостаточности, инфарктом миокарда и др. [27, 28].

В ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий» был проведён направленный синтез ряда производных арилсульфониламинопиридина, предположительно обладающих свойствами ингибиторов

белков Ерас. В результате проведённого скрининга было выявлено активное соединение лидер — гидрохлорид N,2,4,6-тетраметил-N-(пиридин-4-ил) бензолсульфонамида, получившее шифр ZMEI-3 (рис. 1) [29].

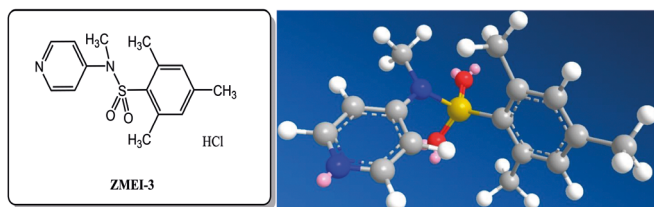


Рис. 1. Структурная формула и пространственная конфигурация соединения ZMEI-3
Fig. 1. Structural formula and spatial configuration of compound ZMEI-3

Цель исследования / Objective

Изучение кардиотропной активности соединения ZMEI-3 на моделях нарушений ритма сердца и алкогольной кардиомиопатии.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Опыты проводили на белых беспородных крысах самцах с изначальной массой 180–200 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин (15 дней) в виварии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий». Животных содержали с предоставлением брикетированного корма *ad libitum* при регулируемом 12/12 световом режиме (light off at 08-00 am). Условия содержания животных соответствовали ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Переиздание) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Переиздание). Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных

биомедицинских и фармацевтических технологий» (Протокол №1 от 27 сентября 2016 г.). Эксперименты разрешены биоэтической комиссией (протокол №3 28 января 2022 г.).

Рандомизация. Животных рандомизировали на 7 групп: 1-я ($n = 9$) — аконитиновая аритмия, контроль; 2-я ($n = 6$) — крысы, у которых аконитиновую аритмию вызывали после введения соединения ZMEI-3; 3-я группа ($n = 13$) — реперфузионные нарушения ритма сердца, контроль; 4-я группа ($n = 13$) — реперфузионные нарушения ритма после 7 суток введения соединения ZMEI-3; 5-я группа ($n = 9$) — интактные крысы — контроль для АКМП; 6-я группа ($n = 8$) — АКМП контроль; 7-я группа ($n = 17$) — АКМП + ZMEI-3 в течение 28 суток алкогольной депривации.

Метод воспроизведения аконитиновой аритмии. Наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг, в/б) фиксировали в положении на спине на подогреваемом операционном столике. Катетеризировали левую бедренную вену для введения аконитина и изучаемого соединения. Перед началом эксперимента у животных регистрировали ЭКГ (стандартные отведения, калибровочный сигнал 20 мВ, скорость записи 100 мм/сек, продолжительность записи 60 секунд). В качестве регистратора использовали компьютерный электрокардиограф «Поли-Спектр 8/В» (Россия). Затем подбирали дозу аконитина ($n = 9$, в/в, болюсом), которая во всех экспериментах в пределах 1–2 минут после окончания его введения вызывает смешанную предсердно-желудочковую экстрасистолию; величина подобранной дозы — 30 мкг/кг. Соединение ZMEI-3 вводили в дозе 2 мг/кг в/в за 2 минуты до аконитина. Контрольным животным вводили изотонический 0,9 % раствор натрия хлорида в эквивалентном объёме. Непрерывную регистрацию ЭКГ начинали за 2 минуты до начала введения аконитина или исследуемого соединения и продолжали в течение 20 минут от момента окончания в/в введения аконитина.

В каждой экспериментальной группе подсчитывали количество животных, у которых возникала политопная экстрасистолия (ПЭС) в первые 10 минут после введения аконитина.

Метод воспроизведения реперфузионных нарушений ритма сердца. Наркотизированных (хлоралгидрат 350 мг/кг, в/б) крыс переводили на искусственное дыхание при помощи аппарата искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия), после чего производили тороко- и перикардотомию и под левую нисходящую коронарную артерию сразу же после её выхода из-под ушка подводили лавсановую лигатуру. Ишемию миокарда вызывали одномоментной перевязкой коронарной артерии. Через 7 минут лигатуру снимали. Оценивали наличие/отсутствие фибрилляции желудочков сердца (ФЖ) и других нарушений ритма сердца в течение

3 минут от момента начала реперфузии. Соединение ZMEI-3 вводили в/в в дозе 2 мг/кг/сут в течение 7 дней в изотоническом 0,9 % растворе натрия хлорида, в контрольной серии — эквивалентный объём растворителя. Регистрацию ЭКГ (II стандартное отведение) начинали за минуту до перевязки коронарного сосуда и продолжали в течение всего эксперимента. В работе использовали цифровой электрокардиограф Поли-Спектр-8В (Нейрософт, Россия). Для оценки противофибрилляторного и антиаритмического действия в каждой группе подсчитывали количество животных, у которых возникали: фибрилляции желудочков сердца (ФЖ), опасные для жизни аритмии (ОЖА: фибрилляция желудочков или желудочковая тахикардия), экстрасистолия.

Трансляционная модель АКМП. Алкогольная кардиомиопатия моделируется на крысах. Животные содержатся в индивидуальных клетках стандарта Т/3 в условиях вивария (температура 21–23 °С, относительная влажность воздуха 40–60 %) при регулируемом 12 ч/12 ч световом режиме (свет/темнота) с предоставлением брикетированного стандартного корма *ad libitum*. Животные подвергаются принудительной алкоголизации, основанной на предоставлении в качестве единственного источника жидкости 10 % раствора этанола. Среднесуточное потребление алкоголя в пересчёте на чистый этанол колебалось в пределах 5,0–6,5 г/кг. Показано, что через 24 недели принудительной алкоголизации у животных развивается алкогольная кардиомиопатия, воспроизводящая основные клинико-диагностические признаки этого заболевания — дилатация правого и левого желудочков сердца, снижение инотропной функции сердца, жировая дистрофия миокарда, снижение электрической стабильности кардиомиоцитов [30].

После 24 недель алкоголизации животным заменяли этанол на воду и регистрировали эхокардиограмму. Соединение ZMEI-3 вводили в/в в течение 28 суток алкогольной депривации в дозе 2 мг/кг/сут. Крысам контрольных групп вводили эквивалентный объём изотонического 0,9 % раствора натрия хлорида. Все вводимые растворы были стерильными. Через сутки после последнего введения изучаемого соединения у животных регистрировали эхокардиограмму. Крыс подвергали эвтаназии, осуществляли забор сердец для морфогистологического исследования.

Эхокардиография. Наркотизированных крыс (кетамин 100 мг/кг, в/б) фиксировали на операционном столике в положении на спине. Измерения производили в условиях закрытой грудной клетки и спонтанного дыхания в одномерном М- и двухмерном В-модальных режимах при положении датчика эхокардиографа в парастеральной позиции по длинной оси сердца. В М-модальном режиме оценивали конечно-систолический (КСР) и конечно-

диастолический (КДР) размеры левого желудочка сердца, затем по методу *Teicholz LE* [31] рассчитывали такие показатели насосной функции сердца, как фракция выброса (ФВ) и фракция укорочения (ФУ) левого желудочка.

Оценку эхокардиографических показателей проводили, как минимум, по пяти последовательным сердечным циклам. Все измерения выполняли в соответствии с Рекомендациями Американского общества и Европейской ассоциации по эхокардиографии [32]. В работе использовали цифровой ультразвуковой эхокардиограф DP-6600 с электронным микроконвексным датчиком 65C15EA (6,5/8,0 МГц).

Морфогистологические исследования. В процессе патологоанатомического вскрытия и изучения состояния внутренних органов осуществляли вскрытие и забор сердца. Сердце извлекали и помещали в фиксирующий раствор — забуференный формалин в 10 % концентрации при соблюдении объёмного соотношения 1:20. По окончании фиксации из сердца вырезали фронтальные сегменты, захватывающие желудочки. Вырезанные фрагменты помещали в заливочные кассеты, затем осуществляли гистологическую проводку по стандартному протоколу с помощью Автоматического тканевого процессора карусельного типа (Leica TP 1020, Leica Microsystems, ФРГ). По завершении проводки участки миокарда заливали в гомогенизированную парафиноподобную среду Paraplast (Leica Biosystems Richmond, США). Для заливки в парафин использовали модульную Систему заливки тканей с графическим дисплеем (Tissue-Tek® TEK, Sakura, Япония). Гистологические срезы толщиной 5–6 микрон получали с помощью специально оборудованного Рабочего места для микротомии (Bio-Optica Milano SPA, Италия) и ротационного микротом (Accu-Cut SRM 200, Sakura, Япония). Предметные стекла с помещёнными на них срезами просушивали. В дальнейшем депарафинированные и окрашенные галлоцианин-эозином срезы помещали под покровные стекла, используя при этом синтетическую монтирующую среду Bio Mount (Bio-Optica Milano SPA, Италия).

Готовые микропрепараты представленных фрагментов желудочков исследовали в проходящем свете с помощью микроскопа Nikon Eclipse 55 I (Япония) при увеличении 40, 100, 200 и 400. Документировали изображения фотокамерой Nikon DS-Filc с применением программы визуализации изображений NIS Elements BR для Nikon.

Статистический анализ. Данные, измеренные в категориальных шкалах, обрабатывали с помощью критерия точной вероятности Фишера. Нормальность распределения и гомогенность дисперсий данных, измерённых в количественных шкалах, проверяли с помощью критериев Шапиро–Уилка и Левена, соответственно. Так как распределение выборок было близко к нормальному, а выборки

гомогенны, то статистическую значимость различий определяли с помощью дисперсионного анализа повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Дункану.

Использованные вещества. Кетамин ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия; уретан «Acros organics», Индия; хлоралгидрат «Merck», Швейцария; раствор натрия хлорида 0,9 % изотонический, ООО «Мосфарм», Россия; соединение ZMEI-3 (гидрохлорид N,2,4,6-тетраметил-N-(пиридин-4-ил) бензосульфонамида, т.пл. 140–142 °С (из этанола); Rf (этилацетат-гексан (1:3), алюминиевые силикагелевые пластины DC-Kieselgel 60 G/F254 (Merck, Германия) с обнаружением в УФ-свете) = 0,08), ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Россия.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Анализ результатов экспериментов на модели нарушений ритма сердца, вызываемых аконитина у наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг в/б), показал, что в этих условиях соединение ZMEI-3 (однократно, 2,0 мг/кг, в/в, за 2 мин до в/в введения аконитина) не обладало антиаритмическим действием. Так, в контрольной серии опытов аконитина вызывал ПЭС в 100 % случаев (у 9 крыс из 9), у животных, получавших изучаемое соединение за 2 минуты до введения аконитина, нарушения ритма сердца также возникали в 100 % случаев (у 6 крыс из 6, $p = 1,0$).

Такой результат представляется предсказуемым: известно, что аномальная проаритмическая активность белков Ерас2 реализуется посредством нарушения функциональной активности специфичных для кардиомиоцитов рианодиновых рецепторов 2 типа (RyR2), результатом чего является перегрузка цитоплазмы ионами Ca^{2+} вследствие их утечки из цистерн саркоплазматического ретикулаума во время диастолы, что и является источником аритмий [33, 34]. Также известно, что для нарушения функциональной активности RyR2, опосредованного белками Ерас2, необходима активация сопряжённого с ними Ерас2/PI3K/Akt/NOS1/CaMKII δ /RyR2 сигнального каскада [35].

Поскольку трудно предположить, что блокада этого сигнального каскада произойдёт практически мгновенно после однократного введения соединения ZMEI-3, в следующей серии экспериментов была предпринята попытка гарантировано заблокировать и/или белки Ерас2, и/или сопряжённые с ними проаритмогенные сигнальные каскады: мы попытались оценить антиаритмическую активность соединения ZMEI-3 на фоне его курсового применения в течение 7 дней (2,0 мг/кг, в/б). В качестве приемлемой модели была выбрана модель реперфузионных арит-

мий у крыс, патогенез которых во многом связан с перегрузкой цитозоля кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} [36, 37].

Как следует из полученных данных, соединение ZMEI-3 (2 мг/кг/сут в течение 7 дней, в/б) в условиях 7-минутной окклюзии и последующей реперфузии коронарной артерии проявляет выраженную противофибрилляторную и антиаритмическую активность. Так, если в контроле фибрилляции желудочков возникали у 9 из 13 животных (70 % случаев), а опасные для жизни аритмии у 13 из 13, то у крыс, получавших соединение ZMEI-3, только у 3 из 13 (23 % случаев, $p = 0,047$) и у 8 из 13 ($p = 0,039$), соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Антиаритмическая и противофибрилляторная активность соединения ZMEI-3 (2 мг/кг/сут в течение 7 дней в/б) в условиях модели реперфузионных аритмий у наркотизированных крыс (хлоралгидрат 350 мг/кг в/б)

Table 1

Antiarrhythmic and antifibrillatory activity of the compound ZMEI-3 (2 mg/kg/day for 7 days i.p.) in a model of reperfusion arrhythmias in anesthetized rats (chloralhydrate 350 mg/kg i.p.)

Вещество	Количество животных в группе	Количество животных с опасными для жизни аритмиями	Количество животных с фибрилляциями желудочков
Контроль	13	13	9
ZMEI-3	13	8 $p = 0,039$	3 $p = 0,047$

Примечание: p указано по отношению к контролю.
Note: p is indicated in relation to control.

Таким образом, результаты предыдущих экспериментов свидетельствуют о том, что для реализации целевой активности соединения ZMEI-3 необходимо его курсовое применение.

Исходя из этих данных, для оценки кардиопротективных эффектов соединения ZMEI-3 на разработанной нами трансляционной модели АКМП у крыс мы использовали его курсовое применение (2 мг/кг/сут в течение 28 дней, в/б). Экспериментальную терапию соединением ZMEI-3 начинали у крыс с подтверждённой полномасштабной АКМП, которая формируется через 24 недели принудительного приёма 10 % алкоголя, и продолжали на фоне алкогольной депривации в течение 28 дней.

Согласно данным эхокардиографии, у крыс, которые в течение 24 недель потребляли в качестве единственного источника жидкости 10 % раствор этанола, по сравнению с интактными крысами такого же возраста, значительно снижена инотропная функция левого желудочка сердца, о чем свидетельствует статистически значимое снижение его фракции укорочения (ФУ) и фракции выброса (ФВ)

(табл. 2). Так, например, если у интактных крыс ФВ в среднем составляла $87,4 \pm 1,4$ %, то у крыс с АКМП этот показатель составлял $66,4 \pm 1,5$ % ($p = 0,0001$). Хорошо известно, что снижение сократительной функции сердца свидетельствует о развитии хронической сердечной недостаточности, которая является одним из патогномоничных признаков АКМП [37, 38]. Следует отметить, что ранее мы показали, что при предоставлении крысам в течение 24 недель в качестве единственного источника жидкости 10 % раствора этилового спирта, наряду с эхокардиографическими признаками АКМП, наблюдаются и другие патогномоничные для этой патологии диагностические признаки, такие как жировая дистрофия миокарда, полиморфизм клеток сердечной мышцы (одновременное присутствие гипертрофированных и дистрофических кардиомиоцитов), снижение электрической стабильности кардиомиоцитов и т. д. [30].

Также согласно данным эхокардиографии, в течение 4-недельной алкогольной депривации сократительная функция левого желудочка сердца у крыс с АКМП, так же как и у интактных животных,

практические не изменялась. Так, например, ФВ левого желудочка у крыс с АКМП составила, соответственно, $66,4 \pm 1,5$ % и $65,0 \pm 1,8$ % ($p = 0,29$), а у интактных животных, соответственно, $87,4 \pm 1,4$ и $86,9 \pm 1,7$ ($p = 0,28$). Принципиально иная картина наблюдается у животных, получавших соединение ZMEI-3 (2 мг/кг/сут в/б) на фоне алкогольной депривации в течение 28 дней. У этих животных наблюдалось статистически значимое увеличение инотропной функции левого желудочка сердца (табл. 2). Так, например, ФВ у животных, получавших соединение ZMEI-3, за период наблюдения увеличилась с $69,0 \pm 1,0$ % до $76,5 \pm 1,2$ % ($p = 0,0001$).

Таким образом, систематическая терапия соединением ZMEI-3, начатая в условиях сформированной АКМП, способствует статистически значимому увеличению инотропной функции левого желудочка сердца и, следовательно, уменьшению тяжести течения сопутствующей АКМП хронической сердечной недостаточности.

Через сутки после окончания эхокардиографического исследования крысы подверглись эвтаназии, а их сердца были изъяты для проведения гистологического изучения.

Микроскопическое исследование сердца интактных крыс не выявило патологических изменений в миокарде желудочков. Миокард, имевший типичную гистоархитектонику, был представлен связанными между собой поперечнополосатыми мышечными клетками — кардиомиоцитами, расположенными послойно. Поперечная исчерченность саркоплазмы мышечных волокон была хорошо заметна, ядра кардиомиоцитов, расположенные по большей части центрально, имели незначительный полиморфизм. Между мышечными структурами миокарда обнаруживались тонкие прослойки соединительной ткани, кровеносные сосуды, местами были заметны единичные эритроциты (рис. 2).

В отличие от интактного контроля, в миокарде всех крыс с АКМП наблюдались заметные дегенеративные изменения. У подавляющего большинства животных отмечалось выраженное расстройство кровообращения — диффузное и очаговое венозное полнокровие разной степени выраженности, а также капиллярное полнокровие с эритростазами и сладжами эритроцитов, петехиальными кровоизлияниями. Был замечен периваскулярный и межмышечный отёк. Следует отметить, что просветы сосудов в большинстве случаев были расширены. Морфологические признаки периваскулярного отёка и васкулита были выражены у всех крыс этой экспериментальной группы. В саркоплазме большинства кардиомиоцитов и межмышечной строме были заметны вакуоли и мелкие капли жира (рис. 3).

В миокарде большинства крыс группы АКМП контроль обнаруживались участки волнообразной деформации кардиомиоцитов, с потерей их по-

Таблица 2

Влияние соединения ZMEI-3 (2 мг/кг/сут в течение 28 дней, в/б) на сократительную функцию сердца крыс в условиях 28-дневной алкогольной депривации после 24 недель потребления алкоголя

Table 2

Effect of compound ZMEI-3 (2 mg/kg/day for 28 days, i.p.) on the contractile function of the heart of rats during 28-day alcohol deprivation after 24 weeks of alcohol consumption

Группа	n	Показатель	До начала депривации	После 28 суток депривации
Интактные крысы	9	ФУ, %	$51,3 \pm 1,1$ $p = 0,0001$	$50,5 \pm 1,5$ $p = 0,0001$ $p_1 = 0,13$
		ФВ, %	$87,4 \pm 1,4$ $p = 0,0001$	$86,9 \pm 1,7$ $p = 0,0001$ $p_1 = 0,28$
Алкоголи- зированный контроль	8	ФУ, %	$31,6 \pm 1,2$	$30,8 \pm 1,6$ $p_1 = 0,52$
		ФВ, %	$66,4 \pm 1,5$	$65,0 \pm 1,8$ $p_1 = 0,29$
Крысы, получав- шие соеди- нение ZMEI-3	17	ФУ, %	$33,9 \pm 0,8$ $p = 0,19$	$40,0 \pm 1,1$ $p = 0,0002$ $p_1 = 0,0001$
		ФВ, %	$69,0 \pm 1,0$ $p = 0,21$	$76,5 \pm 1,2$ $p = 0,0002$ $p_1 = 0,0001$

Примечания: Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; ФУ — фракция укорочения левого желудочка; ФВ — фракция выброса левого желудочка; p — указано по отношению к алкоголизированному контролю; p_1 — указано к уровню до начала депривации.

Notes: Arithmetic means and standard mean errors are shown; SF — left ventricular shortening fraction; EF — left ventricular ejection fraction; p — indicated in relation to the alcoholized control; p_1 — indicated to the level before the start of deprivation.

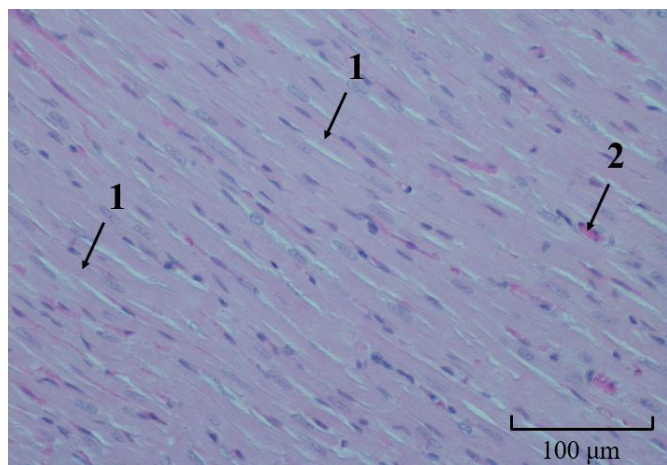


Рис. 2. Микрофотография фрагмента левого желудочка интактной крысы, галлоцианин/эозин, ×200. 1 — неизменённые кардиомиоциты. 2 — единичные эритроциты.

Fig. 2. Microphoto of the left ventricle fragment of the intact rat, gallocyanine/eosin, ×200. 1 — unchanged cardiomyocytes. 2 — single erythrocytes.

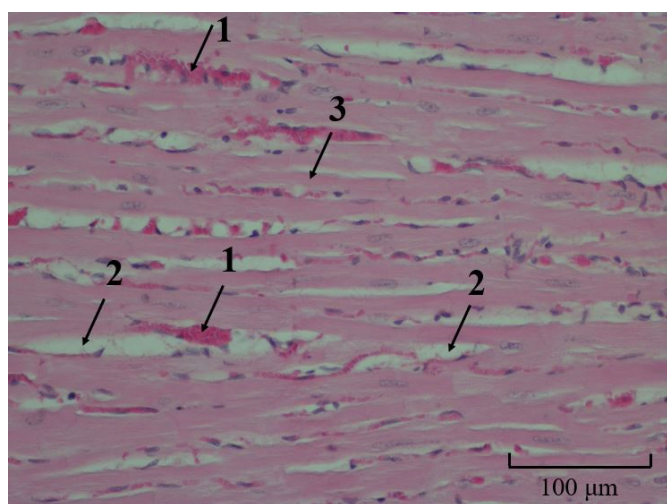


Рис. 3. Микрофотография фрагмента левого желудочка алкоголированной крысы (АМКП контроль) галлоцианин/эозин, ×200. Стрелками обозначены: 1 — диффузное полнокровие миокарда; 2 — вакуоли и капли жира; 3 — кардиомиоциты с гомогенной цитоплазмой и лизированным ядром.

Fig. 3. Microphoto of the left ventricle fragment of the alcoholized rat (AMKP control) gallocyanine/eosin, ×200. The arrows indicate: 1 — diffuse myocardial plethora; 2 — vacuoles and droplets of lipid; 3 — cardiomyocytes with homogeneous cytoplasm and lysed nucleus.

перечной исчерченности. В большинстве случаев фиксировались очаги плазмолиза, фрагментация мышечных волокон. Был замечен выраженный полиморфизм кардиомиоцитов. Часть из них имела гомогенную цитоплазму и уменьшенное в размерах овальное или округлое, гиперхромное, реже лизированное ядро. Другая часть кардиомиоцитов,

имеющая крупное овальное или округлое, чаще центрально расположенное ядро с хорошо визуализирующимся хроматином, находилась в состоянии умеренной гипертрофии (рис. 3). Жировая дистрофия миокарда и полиморфизм кардиомиоцитов являются патогномичными признаками АМКП [37].

Патоморфологические изменения в миокарде крыс, получавших соединение ZMEI-3 на фоне сформировавшейся АМКП, были менее выражены по сравнению с таковыми у крыс группы АМКП контроль.

В миокарде крыс, получавших соединение ZMEI-3, как и в миокарде контрольных крыс с АМКП, визуализировалось расстройство кровообращения в виде диффузного венозного и капиллярного полнокровия, частично с эритростазом, однако по сравнению с контролем АМКП эти изменения были менее выражены (рис. 4):

- признаки периваскулярного отёка и инфильтрация лимфомакрофагами были заметны лишь вокруг крупных сосудов;
- поперечная исчерченность мышечных волокон по большей части была сохранена;
- частота обнаружения волнообразной деформации и фрагментации кардиомиоцитов была заметно меньше;
- у большинства крыс, получавших соединение ZMEI-3, вакуоли и мелкие капли жира регистрировались только в межмышечной строме, но не в

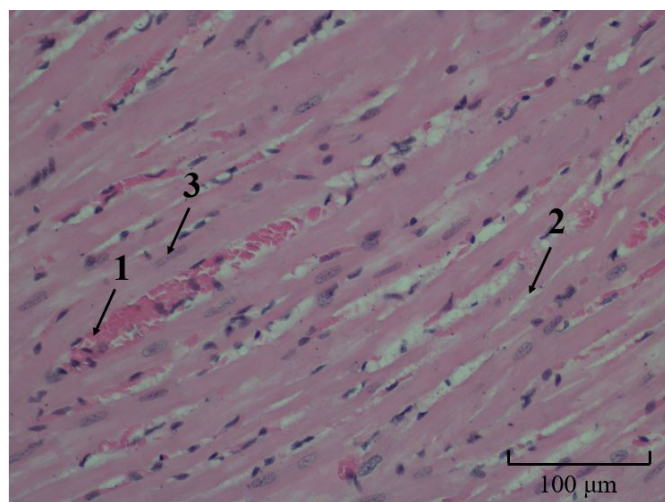


Рис. 4. Микрофотография фрагмента левого желудочка алкоголированной крысы, получавшей соединение ZMEI-3, галлоцианин/эозин, ×200. Стрелками обозначены: 1 — диффузное полнокровие миокарда; 2 — вакуоли и мелкие капли жира; 3 — полиплоидные кардиомиоциты.

Fig. 3. Microphotograph of the left ventricle fragment of the alcoholized rat receiving the compound ZMEI-3, gallocyanine/eosin, ×200. Arrows indicate: 1 — diffuse myocardial plethora; 2 — vacuoles and small droplets of lipid; 3 — polyploid cardiomyocytes.

саркоплазме кардиомиоцитов, как это было отмечено у крыс группы АМКП контроль.

Полиморфизм кардиомиоцитов, наблюдаемый в миокарде крыс, леченных соединением ZMEI-3, визуально был менее выражен, по сравнению с контролем АМКП. Часть кардиомиоцитов также находилась в состоянии гипертрофии. В отличие от контроля АМКП, мышечные клетки, имеющие светлую гомогенную цитоплазму и уменьшенные в размерах гипохромные ядра, встречались только в отдельных случаях (рис. 4).

Таким образом, микроскопическое исследование миокарда желудочков алкоголизированных крыс, леченных соединением ZMEI-3, позволило установить значительное уменьшение морфологических признаков, характерных для АМКП. У леченных животных расстройства кровообращения были менее выраженными, а число регрессивных форм кардиомиоцитов заметно снижалось. Вакуолизация и инфильтрация жиром шли, главным образом, по интерстицию миокарда.

Заключение / Conclusion

Как следует из полученных данных, соединение ZMEI-3 при курсовом применении оказывает выраженное антиаритмическое действие и уменьшает тяжесть течения алкоголь-обусловленной сердечной недостаточности путём повышения инотропной функции левого желудочка сердца, что, возможно, связано с уменьшением интенсивности жировой дистрофии миокарда.

Поскольку известно, что аномальная активность регуляторных белков Ерас инициирует развитие нарушений сердечного ритма [25, 39, 40] и играет важную роль в формировании хронической сердечной недостаточности [39, 41], можно полагать, что кардиотропные эффекты соединения ZMEI-3 могут быть связаны с его антагонистическим влиянием в отношении белков Ерас1/Ерас2.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Крыжановский Сергей Александрович — д. м. н., зав. лабораторией фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
Автор, ответственный за переписку
e-mail: kryzhanovskij_sa@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
РИНЦ SPIN-код: 6596-4865

Sergey A. Kryzhanovskii — PhD, Dr. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
Corresponding author
e-mail: kryzhanovskij_sa@academpharm.ru
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>
RSCI SPIN code: 6596-4865

Мокров Григорий Владимирович — к. х. н., руководитель лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>
РИНЦ SPIN-код: 8755-7666

Grigory V. Mokrov — PhD, Cand. Sci. (Chemical), Head of the Fine Organic Synthesis Laboratory at the Drug Chemistry Department Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>
RSCI SPIN code: 8755-7666

Цорин Иосиф Борисович — д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
РИНЦ SPIN-код: 4015-3025

Iosif B. Tsorin — PhD, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal research center for innovator and emerging biomedical and pharmaceutical technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>
RSCI SPIN code: 4015-3025

Ионова Екатерина Олеговна — к. м. н., с. н. с. лаборатории фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-722X>
SPIN-код: 5042-1952

Ekaterina O. Ionova — PhD, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0154-722X>
RSCI SPIN code: 5042-1952

Вититнова Марина Борисовна — к. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>
РИНЦ SPIN-код: 1901-8919

Marina B. Vititnova — PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>
RSCI SPIN code: 1901-8919

Столярук Валерий Николаевич — к. м. н., с. н. с. лаборатории фармакологии кровообращения ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4779-427X>
РИНЦ SPIN-код: 3405-8229

Valeriy N. Stolyaruk — PhD, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher Scientist of of Laboratory of Circulation Pharmacology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4779-427X>
RSCI SPIN code: 3405-8229

Мирошкина Ирина Александровна — к. б. н., с. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии, ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>
SPIN-код: 4697-7938

Irina A. Miroshkina — PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of Laboratory of Drug Toxicology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>
SPIN code: 4697-7938

Сорокина Александра Валериановна — к. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

Alexandra V. Sorokina — PhD, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher of the Laboratory of Drug Toxicology Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

Дурнев Андрей Дмитриевич — д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. отделом лекарственной токсикологии ФГБНУ «ФИЦ оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий», Москва, Российская Федерация
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>
РИНЦ SPIN-код: 8426-0380

Andrei D. Durnev — Dr. Sci. (Med.), professor, corresponding member RAS, Head of the department of drug toxicology, Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russian Federation
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>
RSCI SPIN code: 8426-0380

Список литературы / References

- Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1968 Jul 10; 243(13):3763-5.
- Renström E, Eliasson L, Rorsman P. Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol.* 1997 Jul 1;502 (Pt 1)(Pt 1):105-18. doi: 10.1111/j.1469-7793.1997.105bl.x.
- Anciaux K, Van Dommelen K, Nicolai S, et al. Cyclic AMP-mediated induction of the glial fibrillary acidic protein is independent of protein kinase A activation in rat C6 glioma. *J Neurosci Res.* 1997 May 15;48(4):324-33.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* 1998 Dec 3;396(6710):474-7. doi: 10.1038/24884.
- Banerjee U, Cheng X. Exchange protein directly activated by cAMP encoded by the mammalian rapgef3 gene: Structure, function and therapeutics. *Gene.* 2015 Oct 10;570(2):157-67. doi: 10.1016/j.gene.2015.06.063.
- Aronoff DM, Canetti C, Serezani CH, et al. Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. *J Immunol.* 2005 Jan 15; 174(2):595-9. doi: 10.4049/jimmunol.174.2.595.
- Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008 Jul;40(7):651-62. doi: 10.1111/j.1745-7270.2008.00438.x.
- Muñoz-Llanco P, Henríquez DR, Wilson C, et al. Exchange Protein Directly Activated by cAMP (EPAC) Regulates Neuronal Polarization through Rap1B. *J Neurosci.* 2015 Aug 12;35(32):11315-29. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3645-14.2015.
- Lin HB, Cadete VJ, Sra B, et al. Inhibition of MMP-2 expression with siRNA increases baseline cardiomyocyte contractility and protects against simulated ischemic reperfusion injury. *Biomed Res Int.* 2014;2014:810371. doi: 10.1155/2014/810371.
- Gong W, Ma Y, Li A, Shi H, Nie S. Trimetazidine suppresses oxidative stress, inhibits MMP-2 and MMP-9 expression, and prevents cardiac rupture in mice with myocardial infarction. *Cardiovasc Ther.* 2018 Oct;36(5):e12460. doi: 10.1111/1755-5922.12460.
- Dai ZL, Song YF, Tian Y, et al. Trimetazidine offers myocardial protection in elderly coronary artery disease patients undergoing non-cardiac surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Cardiovasc Disord.* 2021 Oct 1;21(1):473. doi: 10.1186/s12872-021-02287-w.
- Lee LC, Maurice DH, Baillie GS. Targeting protein-protein interactions within the cyclic AMP signaling system as a therapeutic strategy for cardiovascular disease. *Future Med Chem.* 2013 Mar;5(4):451-64. doi: 10.4155/fmc.12.216.
- Belacel-Ouari M, Zhang L, Hubert F, et al. Influence of cell confluence on the cAMP signalling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* 2017 Jul;35:118-128. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.03.025.
- Pereira L, Rehmann H, Lao DH, et al. Novel Epac fluorescent ligand reveals distinct Epac1 vs. Epac2 distribution and function in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Mar 31;112(13):3991-6. doi: 10.1073/pnas.1416163112.
- Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E, et al. Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Sep;293(3):H1662-72. doi: 10.1152/ajpheart.00159.2007.
- Cazorla O, Lucas A, Poirier F, et al. The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofibrillar function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 18;106(33):14144-9. doi: 10.1073/pnas.0812536106.
- Pereira L, Ruiz-Hurtado G, Morel E, et al. Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2012 Jan;52(1):283-91. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.10.016.
- Wu XM, Ou QY, Zhao W, et al. The GLP-1 analogue liraglutide protects cardiomyocytes from high glucose-induced apoptosis by activating the Epac-1/Akt pathway. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2014 Nov;122(10):608-14. doi: 10.1055/s-0034-1384584.
- Fazal L, Laudette M, Paula-Gomes S, et al. Multifunctional Mitochondrial Epac1 Controls Myocardial Cell Death. *Circ Res.* 2017 Feb 17;120(4):645-657. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309859.
- Métrich M, Lucas A, Gastineau M, et al. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res.* 2008 Apr 25;102(8):959-65. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.164947.
- Berthouze-Duquesnes M, Lucas A, Saulière A, et al. Specific interactions between Epac1, β -arrestin2 and PDE4D5 regulate β -adrenergic receptor subtype differential effects on cardiac hypertrophic signaling. *Cell Signal.* 2013 Apr;25(4):970-80. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.12.007.
- Chen C, Du J, Feng W, et al. β -Adrenergic receptors stimulate interleukin-6 production through Epac-dependent activation of PKC δ /p38 MAPK signalling in neonatal mouse cardiac fibroblasts. *Br J Pharmacol.* 2012 May;166(2):676-88. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01785.x.
- Neef S, Heijman J, Otte K, et al. Chronic loss of inhibitor-1 diminishes cardiac RyR2 phosphorylation despite exaggerated CaMKII activity. *Nauryn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2017 Aug;390(8):857-862. doi: 10.1007/s00210-017-1376-1.
- Lezcano N, Mariangelo JIE, Vittone L, et al. Early effects of Epac depend on the fine-tuning of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ handling in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2018 Jan;114:1-9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.10.005.
- Pereira L, Cheng H, Lao DH, et al. Epac2 mediates cardiac β 1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak and arrhythmia. *Circulation.* 2013 Feb 26;127(8):913-22. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.12.148619.
- Yang Z, Kirtan HM, Al-Owais M, et al. Epac2-Rap1 Signaling Regulates Reactive Oxygen Species Production and Susceptibility to Cardiac Arrhythmias. *Antioxid Redox Signal.* 2017 Jul 20;27(3):117-132. doi: 10.1089/ars.2015.6485.
- Tan YQ, Li J, Chen HW. Epac, a positive or negative signaling molecule in cardiovascular diseases. *Biomed Pharmacother.* 2022 Apr;148:112726. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112726.
- Slika H, Mansour H, Nasser SA, et al. Epac as a tractable therapeutic target. *Eur J Pharmacol.* 2023 Apr 15;945:175645. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175645.
- Мокров Г.В., Крыжановский С.А., Воробьева Т.Ю. и др. Производные пиридинол со свойствами Ерас-ингибиторов. Заявка на патент РФ № 2023131685. Дата приоритета: 04.12.2023. [Mokrov GV, Kryzhanovskii SA, Vorobyova TYu, et al. Pyridine derivatives with Epac inhibitor properties. Application for RF patent No. 2023131685. Priority date: 12/04/2023. (In Russ.)].
- Kryzhanovskii SA, Kolik LG, Tsorin IB, et al. Alcoholic Cardiomyopathy: Translation Model. *Bull Exp Biol Med.* 2017 Sep;163(5):627-631. doi: 10.1007/s10517-017-3865-0.
- Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R. Problems in echocardiographic volume determinations: echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am J Cardiol.* 1976 Jan;37(1):7-11. doi: 10.1016/0002-9149(76)90491-4.
- Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005 Dec;18(12):1440-63. doi: 10.1016/j.echo.2005.10.005.
- Ruiz-Hurtado G, Morel E, Dominguez-Rodriguez A, et al. Epac in cardiac calcium signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 May;58:162-71. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.11.021.
- Pereira L, Bare DJ, Galice S, et al. β -Adrenergic induced SR Ca²⁺ leak is mediated by an Epac-NOS pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2017 Jul;108:8-16. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.04.005.
- Крыжановский С.А., Никифорова Т.Д., Вититнова М.Б., Дурнев А.Д. Роль регуляторных белков Ерас в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы. Часть II. Роль белков Ерас в физиологии и патологии сердца. *Физиология человека.* 2020; 46(4):111-134. [Kryzhanovskii SA, Nikiforova TD, Vititnova MB, Durnev AD. EPAC Proteins and Their Role in the Physiological and Pathological Processes in the Cardiovascular System. Part II. The Role of EPAC Proteins in the Physiology and Pathology of the Heart. *Hum Physiol.* 2020;46(4):111-134. (In Russ.)]. doi: 10.31857/S0131164620040074.
- Mattiazzi A, Argenziano M, Aguilar-Sanchez Y, et al. Ca²⁺ Sparks and Ca²⁺ waves are the subcellular events underlying Ca²⁺ overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Feb;79:69-78. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.011.
- Драпкина О.М., Ашихмин Я.И., Ивашкин В.Т. Проблема алкогольной кардиомиопатии. *Врач.* 2005;8:48-50. [Drapkina OM, Ashihmin YaI, Ivashkin VT. The problem of alcoholic cardiomyopathy. *Vrach.* 2005;8:48-50. (In Russ.)].
- Ерохин Ю.А., Хритинин Д.Ф. Поражение сердца при хронической алкогольной интоксикации. *Вестник новых медицинских технологий.* 2003;10(4):19-20. [Erokhin YuA, Khritinin DF. Cardiac disturbances in the case of chronic alcohol intoxication. *Journal of New Medical Technologies.* 2003;10(4):19-20. (In Russ.)].
- Laudette M, Coluccia A, Sainte-Marie Y, et al. Identification of a pharmacological inhibitor of Epac1 that protects the heart against acute and chronic models of cardiac stress. *Cardiovasc Res.* 2019 Oct 1;115(12):1766-1777. doi: 10.1093/cvr/cvz076.
- Insel PA, Murray F, Yokoyama U, et al. cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *Br J Pharmacol.* 2012 May;166(2):447-56. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01847.x.
- Cai W, Fujita T, Hidaka Y, et al. Disruption of Epac1 protects the heart from adenylyl cyclase type 5-mediated cardiac dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Jun 17;475(1):1-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.04.123.