ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА, 2020, том 46, № 2, с. 94–111

ОБЗОРЫ

УДК 612.821

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ Epac В ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ. ЧАСТЬ I. РОЛЬ БЕЛКОВ Epac В ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ СОСУДИСТОГО РУСЛА

© 2020 г. С. А. Крыжановский[1, *], Т. Д. Никифорова[1], А. Д. Дурнев[1]

[1]ФГБНУ НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, Москва, Россия

**E-mail: sak-538@yandex.ru*

Поступила в редакцию 03.07.2019 г.
После доработки 30.09.2019 г.
Принята к публикации 04.12.2019 г.

Обзор посвящен описанию вклада регуляторных белков Epac в физиологию и патологию сердечно-сосудистой системы. В первой части обзора приведена структура регуляторных белков Epac, а также подробно рассмотрена роль белков Epac в регуляции тонуса, проницаемости сосудистого русла, ангиогенезе и пролиферации эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов, а также их вклад в развитие патологии сосудов.

Ключевые слова: белки Epac1, сосудистый эндотелий, гладкомышечные клетки сосудов, пролиферация, ангиогенез, тонус сосудов, внутриклеточные сигнальные пути.

DOI: 10.31857/S0131164620020071

Открытый в 1957 г. американским биохимиком *E.W. Sutherland, Jr* циклический 3',5'-аденозинмонофосфат (cAMP) является одним из основных вторичных мессенджеров, передающих регулирующие сигналы от нейромедиаторов и ряда эндогенных биологически активных веществ на исполнительные структуры клетки [1]. Изначально полагали, что единственным аллостерическим эффектором cAMP является открытый в 1968 г. фермент – cAMP-зависимая протеинкиназа или протеинкиназа A (PKA) [2]. Неактивная PKA представляет собой комплекс из двух димерных регуляторных (R) и двух мономерных каталитических (K) субъединиц. Активация PKA происходит в результате взаимодействия каждой R-субъединицы с двумя молекулами cAMP и последующей диссоциации от них K-субъединиц, которые и фосфорилируют остатки серина (Ser) и треонина (Thr) на многочисленных внутриклеточных белках-мишенях. К этим внутриклеточным мишеням, в частности, относятся фосфоламбан – PLN (может также фосфорилироваться кальмодулин-зависимой протеинкиназой II, CaMKII), рианодиновые рецепторы (RyR), тропонин I, миозин-связывающий белок C (cMyBRC), трансмембранные медленные потенциалзависимые Ca^{2+} каналы L-типа, а также фактор транскрипции cAMP (cyclic AMP response element-binding protein, CREB) [3–5], т.е. внутриклеточные мишени, ответственные за регуляцию процессов, обеспечивающих сократительный статус кардиомиоцитов и их электромеханическое сопряжение. Помимо этого, связываясь с регуляторными субъединицами PKA, cAMP контролирует процессы адгезии, миграции, пролиферации и дифференцировки клеток, апоптоз и транскрипцию генов [4]. Практически в течение 30 лет PKA рассматривали в качестве единственного эффектора cAMP (исключение составляли каналы, контролируемые циклическими нуклеотидами /CNG/ – cyclic nucleotide-gated channels, в частности управляемые циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемые каналы /HCN/ – hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels) [6], однако в конце XX в. появились публикации, свидетельствующие о том, что не все клеточные эффекты cAMP могут быть опосредованы исключительно PKA и было высказано предположение, что в клетках экспрессируется “неизвестная PKA-подобная молекула” [7, 8].

В декабре 1998 г. в журналах “*Nature*” и “*Science*” были опубликованы две независимые статьи. Американские исследователи из Массачусетского технологического института сообщили о том, что ими был идентифицирован cAMФ-зависимый белок, который без участия PKA активировал малые GEFазы (cAMP-GEFs) Rap суперсе-

мейства белков Ras (Rat sarcoma) [9]. Аналогичные данные были получены и голландскими учеными из университета Утрехта, которые помимо этого клонировали ген, кодирующий этот белок, и назвали его (белок) cAMP-регулируемый фактор обмена гуаниловых нуклеотидов (cAMP-GEF) или обменный белок, напрямую активируемый cAMP (exchange protein directly activated by cAMP, Epac) [10]. Таким образом, было показано, что в клетках существует альтернативный, не зависимый от PKA, путь активации/блокады внутриклеточных сигнальных путей. Несколько позже появились сообщения о том, что PKA и белки Epac в одной и той же клетке могут инициировать не зависимые друг от друга, в том числе избыточные и/или противоположные эффекты [11, 12]. В настоящее временя известно, что белки Epac, как минимум, экспрессируются в нейронах ЦНС (фронтальная кора, гиппокамп), клетках гладкой мускулатуры бронхиального дерева, иммунокомпетентных клетках, кортикальных нефронах, β-клетках поджелудочной железы, клетках гладкой мускулатуры сосудов (в том числе коронарных), клетках сосудистого эндотелия и кардиомиоцитах [13, 14].

Показано, что белки Epac 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 [13].

Следует отметить, что в последнее время помимо белков Epac идентифицированы и другие эффекторы cAMP – циклический нуклеотидный рецептор, участвующий в регуляции функциональной активности сперматозоидов (cyclic nucleotide receptor involved in sperm function; CRIS) [15], и экспрессирующийся в мышечной ткани белок, содержащий Popeye домен (popeye domain containing protein; POPDC) [16].

Данный обзор посвящен роли сигнальных белков Epac в физиологии и патофизиологии сердечно-сосудистой системы.

Белки Epac: классификация, структура, активация

Белки Epac по сравнению с PKA эволюционно являются более “молодой” сигнальной молекулой, поскольку показано, что PKA экспрессируется и в организме одноклеточных эукариотов, например грибков (дрожжей) из класса сахаромицетов (Saccharomyces cerevisiae), тогда как белки Epac идентифицированы только у многоклеточных организмов, преимущественно у млекопитающих [17].

Выделяют две изоформы сигнальных белков Epac – Epac1 или cAMP-GEF-I (молекулярная масса около 100 kDa) и Epac2 или cAMP-GEF-II (молекулярная масса около 110 kDa), которые кодируются различными генами. У людей EPAC1 кодируется геном *RAPGEF3*, содержащим 28 экзонов и расположенным на 12-ой хромосоме (12q13.11: 47,734,367–47,771,041), в то время как ген EPAC2 *RAPGEF4* расположен на хромосоме 2 (2q31.1) и содержит 31 экзон [17]. Белки Epac по своей структуре представляют единую полипептидную молекулу, тогда как PKA состоит из отдельных R и C-субъединиц, которые кодируются различными генами. Если транскрипция гена *RAPGEF3* влечет за собой образование только одной изофомы Epac1, то транскрипция гена *RAPGEF4* сопровождается образованием трех изоформ белка Epac2: Epac2A (первоначально названный Epac2), Epac2B и Epac2C. Полипептидная цепочка белка Epac1 состоит из 923 аминокислот, белка Epac2A – из 1011, а белков Epac2B и Epac2C – из 867 и 791 аминокислот соответственно.

Помимо двух изоформ сигнальных белков Epac в 2000 г. была идентифицирована и третья изоформа белков Epac – Repac (related to Epac, GFR, MR-GEF), которая в отличие от белков Epac1 и Epac2 не имеет в своей структуре регуляторного региона (рис. 1) [18]. Авторы этой статьи показали, что при определенных условиях Repac может активировать малые GTFазы Rap1 и Rap2, однако биологическая роль белков Repac до настоящего времени остается не ясной [13]. Следует отметить, что если белки Epac1 и Epac2A в той или иной степени экспрессируются во многих органах и тканях организма, то для белков Epac2B и Epac2C отмечена существенная органоспецифичность. Так, белки Epac2B идентифицированы в β-клетках поджелудочной железы и секреторных клетках надпочечников, а Epac2C – только в клетках печени [19, 20].

Сигнальные белки Epac (Epac1 и Epac2) близки друг к другу и по своей структуре являются мультидоменными белками, содержащими NH_2-концевую регуляторную область и COOH-концевой каталитический регион (рис. 1). Полагают, что NH_2-концевая регуляторная область Epac произошла из R субъединицы PKA, в то время как COOH-концевой каталитический регион по своей структуре наиболее тесно связан с представителями суперсемейства Ras-факторами обмена гуаниловых нуклеотидов (guanine-nucleotide-exchange factors, GTFs) [22].

Каталитический регион у всех белков Epac имеет идентичную структуру и состоит из Ras-обменного домена REM, Ras-ассоциированного домена RA и C-концевого CDC25-гомологичного домена – CDC25-HD. Домен REM необходим для поддержания стабильности каталитического

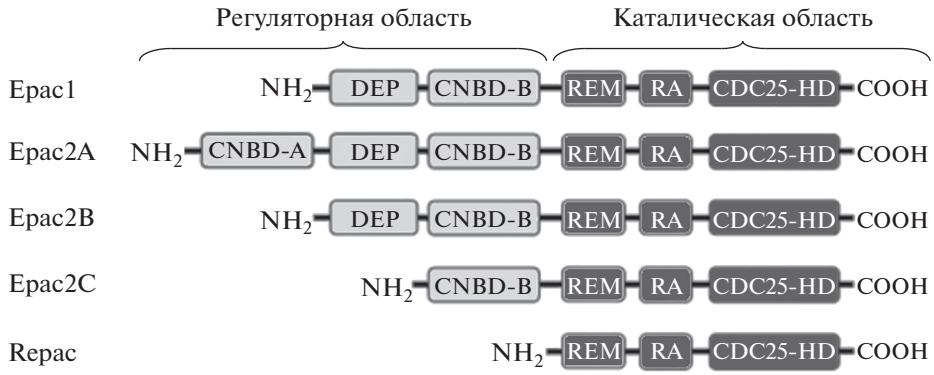

Рис. 1. Структура белков Epac (по [21]).
Объяснение в тексте.

региона [18]. Домен RA выполняет двоякую функцию – инициацию биологического эффекта и цитозольную локализацию белка, а в случае белка Epac2C – его фиксацию на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны. Домен CDC25-HD ответственен за обмен гуаниловых нуклеотидов белков Rap и локализацию белков в области ядерных поровых комплексов [23].

Регуляторный регион белка Epac1 содержит в своем составе cAMP-связывающий домен CNBD-B (или CBD-B), который помимо взаимодействия с cAMP обеспечивает контакт белков Epac1 с микротрубочками [24], и N-концевой домен DEP (Disheveled/Egl-10/pleckstrin domain), ответственный за локализацию белка в области внутренней поверхности клеточной мембраны [25] и обеспечивающий транслокацию Epac1 к митохондриям [25].

Регуляторный регион белка Epac2A также содержит CNBD-B и DEP домены, однако N-концевым доменом этого белка является не DEP домен, а присоединенный к нему дополнительный низкоаффинный CNBD-A (CBD-A) домен, который в отличие от CNBD-B домена обладает меньшим сродством к cAMP и не может индуцировать активность малых GTFаз после связывания cAMP [25, 26]. CNBD-A и DEP домены принимают участие в регуляции внутриклеточной локализации белка Epac2A [23].

Структура регуляторного региона белка Epac2B аналогична таковой, известной для белка Epac1 [23]. Регуляторный регион белка Epac2C содержит только один N-концевой домен CNBD-B.

Между доменом CNBD-B регуляторного региона и REM доменом каталитической области белков Epac располагается псевдо-β-складка, так называемый “шарнир” или “коммутатор”, содержащий в своем составе консервативную последовательность (мотив) VLVLE (321VLVLE325), состоящий из 4-х доменов – E308, T311, R313 и H317 (рис. 2) [27]. Шарнир необходим для аутоингибирования белков Epac. Домен E308 прилежит к CNBD-B домену регуляторного региона, а консервативная последовательность VLVLE – к REM домену каталитической области (рис. 2). Мутация мотива VLVLE, в результате которой консервативная последовательность VLVLE замещается остатками аланина AAAAA, сопровождается самоактивацией модифицированного белка Epac $(АЛА)_5$ в отсутствии cAMP [27].

Как уже было отмечено выше, белки Repac содержат в своем составе только каталитический регион, что позволяет предположить, что либо они постоянно находятся в активном состоянии, либо их регуляторная область находится в отдельной, еще не идентифицированной, субъединице. Полагают, что белки Repac могут активировать малые GTFазы Rap1 и Rap2 посредством своего Ras-связывающего CDC25-HD домена [13].

В отсутствии cAMP белки Epac пребывают в неактивном состоянии, поскольку регуляторный регион этих белков обладает аутоингибирующей активностью. В этих условиях CNBD-B домен регуляторного региона находится в неактивной конформации и ковалентно связан с CDC25-HD доменом каталитической области. В результате образовавшейся связи этих доменов блокируется доступ малой GTFазы Rap к каталитическому участку CDC25-HD домена (рис. 3). В основе этого феномена лежит способность консервативной последовательности VLVLE, входящей в состав “шарнира”, играть роль “покрышки”, закрывающей каталитический участок CDC25-HD домена от взаимодействия с малой GEFазой Rap [27]. При взаимодействии cAMP с CNBD-B доменом регуляторного региона белка Epac происходят существенные конформационные изменения его структуры, напоминающие движения шарнира (рис. 2), что сопровождается переориентацией CNBD-B и DEP доменов регуляторного региона и сдвигом вверх “покрышки” (консервативной последовательности VLVLE), закрывающей ката-

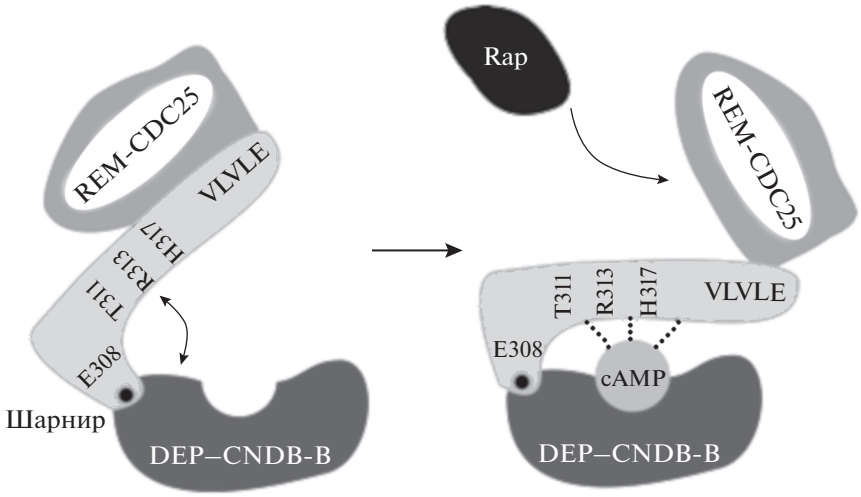

Рис. 2. Схематическое отображение вклада последовательности VLVLE в регуляцию связи между регуляторной и каталитической областью белков Epac (по [27]).
Объяснение в тексте.

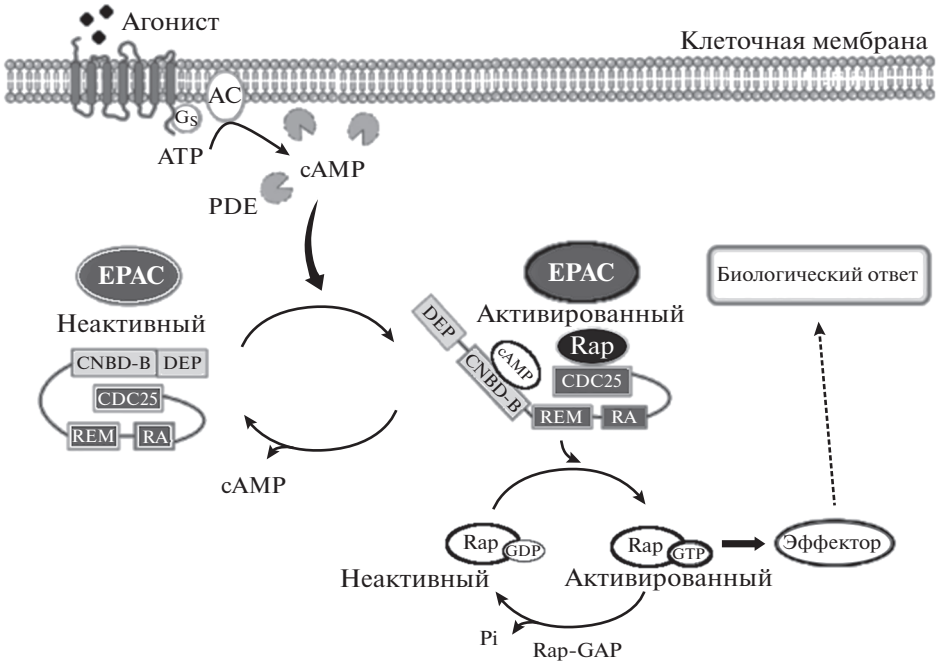

Рис. 3. Схематическое отображение активации белков Epac cAMP (по [23]).
Объяснения в тексте.

литический участок CDC25-HD домена, что в свою очередь обеспечивает связывание этого домена с малой GTFазой Rap и последующий обмен GDP на GTP и, следовательно, активацию белков Rap (рис. 2, 3) [27].

Сигнальные белки Epac1 и Epac2 реализуют свои внутриклеточные эффекты или самостоятельно, или в связке с PKA [23, 28]. CNBD-B домен белков Epac имеет меньшую аффинность к cAMP, чем R субъединица PKA, т.е. для активации белков Epac требуется более высокая концентрация cAMP [29]. Вместе с тем, физиологического повышения концентрации cAMP достаточно для активации белков Epac и сопряженных с ними заякоривающих белков семейства APAKs (A-kinase anchor proteins) [30, 31]. Белки APAKs определяют специфичность действия cAMP путем компартментализации PKA и/или белков

Epac не только с фосфатазами, но и с фосфодиэстеразой, отвечающей за “выключение” сигнала.

Роль белков Epac в физиологии и патофизиологии сосудистого русла

К настоящему времени накоплены убедительные данные, свидетельствующие о том, что белки Epac играют существенную роль в регуляции ангиогенеза, сосудистого тонуса и проницаемости сосудистой стенки, а также в поддержании целостности эндотелиального барьера. Показано, что обе изоформы белков Epac (Epac1 и Epac2) экспрессируются как в клетках гладкой мускулатуры сосудов [32, 33], так и в сосудистом эндотелии [34, 35]. Однако если роль белков Epac1 в регуляции состояния сосудистого русла достаточно хорошо изучена, то роль белков Epac2 на данный момент остается не ясной.

Роль белков Epac в регуляции проницаемости сосудистого эндотелия. Сосудистый эндотелий – метаболически активный монослой клеток, выстилающий внутреннюю стенку сосудов, играет ключевую роль в регуляции их тонуса, транспорте микро- и макромолекул, тромборезистентности и т.д. Не менее важна и его барьерная функция. Контакты между клетками эндотелия, определяющие его барьерную функцию, образованы разнообразными трансмембранными адгезивными молекулами, соединенными с сетью цитоплазматических/цитоскелетных белков. Известно, что одной из основных молекул, модулирующих функцию эндотелиального барьера, является cAMP [36]. В зависимости от внутриклеточного локуса генерации cAMP его активация в эндотелиальных клетках может привести либо к сохранению, либо к дестабилизации эндотелиального барьера: аккумуляция cAMP в цитозоле клетки влечет за собой увеличение сосудистой проницаемости, а его накопление в вакуолях защищает от барьерной дисфункции [37]. Также показано, что эндотелиальные клетки сосудов экспрессируют белки Rap1, а их инактивация GTPаза-активирующим белком (GTPase-activating protein; Spa-1) оказывает негативное влияние на адгезию клеток и, следовательно, приводит к дестабилизации эндотелиального барьера [35]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре изолированных клеток эндотелия пупочной вены человека HUVEC, показано, что активация белков Epac их селективным агонистом 8-CPT (8-pCPT-2-O-Me-cAMP) сопровождается активацией белка Rap1 с последующей активацией белка межклеточной адгезии AF6 (афадин), который связывается с другой молекулой межклеточной адгезии нектином, через которую белок AF6 связан с F-актином цитоскелета [35]. Авторы этого исследования полагают, что активация внутриклеточного каскада Epac/Rap1 приводит к повышению прочности эндотелиального барьера за счет оптимизации локализации белка AF6, который обеспечивает формирование/стабильность межклеточных слипчивых соединений за счет их связывания с интегральными белковыми комплексами межклеточных контактов AJ (adherens junctions) и TJ (tight junctions), пересекающих апикальное межклеточное пространство и регулирующих эндотелиальное прилипание клетка к клетке. Помимо того, имеются сведения о том, что активация внутриклеточного каскада Epac/Rap1 приводит к активации и транслокации белков KRIT-1 в область эндотелиальных клетка–клеточных соединений, где они стабилизируют/восстанавливают целостность соединительных волокон, ассоциированных с junctional белками [38]. Белки KRIT (ловушка для Krev1 – Krev Trapped 1, Krev – синоним белка Rap1) являются одним из эффекторов белка Rap1 и в эндотелиальных клетках, в частности, регулируют плотность межклеточных контактов и поддерживают физиологическую полярность эндотелиальных клеток [39]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре изолированных клеток эндотелия человека HUVEC, было показано, что активация белков Epac1 их агонистом 8-CPT инициирует активацию якорного белка 9a-киназы (a-kinase anchor protein 9, AKAP9), который играет одну из ключевых ролей в регуляции динамики роста микротрубочек эндотелиальных клеток [40]. Активация каскада Epac/AKAP9 необходима для кортикальной реорганизации белка актина, что способствует повышению барьерной функции эндотелия сосудов, в том числе и за счет интегрин-опосредования прилипания клеток в области межклеточных щелевых контактов – gap junctions (GJ) (рис. 4). Также в этом исследовании показано, что активация AKAP9 не требует активации белков Rap.

Известно, что тромбин (трипсиноподобная сериновая протеиназа) индуцирует барьерную дисфункцию эндотелия сосудов. Этот эффект реализуется за счет агонистического влияния тромбина на встроенные в клеточную мембрану эндотелиальных клеток специфичные для него сопряженные с G-белками PA-рецепторы (protease-activated receptors, PAR). После взаимодействия с тромбином PAR активируют сигнальный белок RhoA (GTPase-activating proteins, GAPs), относящийся к суперсемейству белков Ras, который, в свою очередь, активирует Rho-киназу (Rho-associated protein kinase; ROCK). Активация сигнального пути RhoA/RhoK влечет за собой ингибирование фосфатазы регуляторной легкой цепи миозина (myosin light chain phosphatase; MLCP), фосфорилирование миозина и сборку миозиновых филаментов, что приводит к сокращению эндотелиальных клеток и, следовательно, к уменьшению плотности межклеточных щелевых контактов – увеличению проницаемости. В экс-

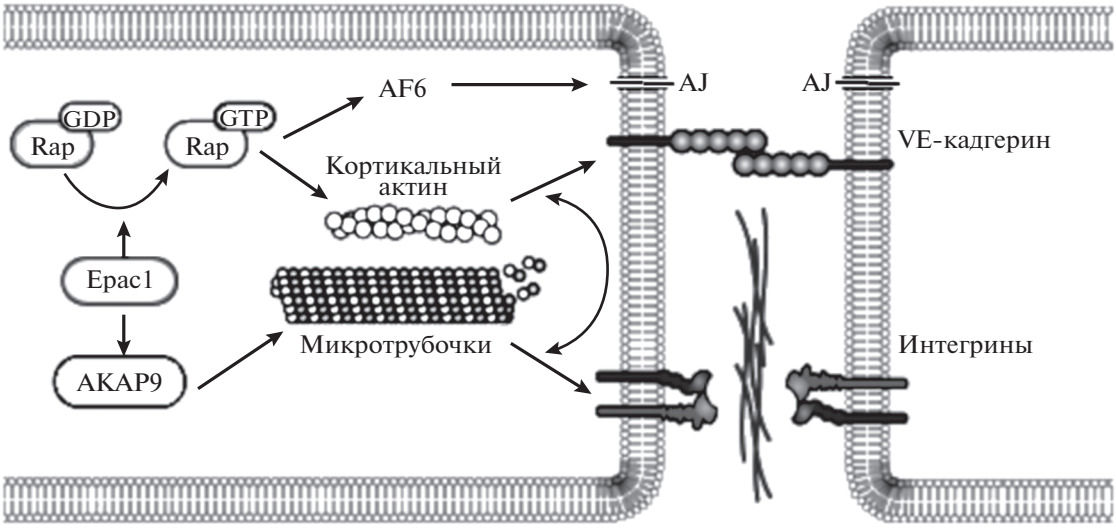

Рис. 4. Схематическое отображение Epac/AKAP9 опосредованного повышения барьерной функции эндотелия сосудов за счет кортикальной реорганизации белка актина (по [40]).
Объяснение в тексте.

периментах *in vitro*, выполненных на культуре изолированных клеток эндотелия человека HUVEC, обработанных тромбином, показано, что активация белков Epac селективным агонистом 8-CPT влечет за собой ингибирование RhoA и тем самым предохраняет эндотелий от межклеточных разрывов [35]. Полагают, что в основе подавления активности RhoA может лежать активация Epac/Rap1/KRIT-1 сигнального каскада [39]. Известен и альтернативный путь Epac-опосредованного ингибирования RhoA [41]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре изолированных клеток эндотелия человека HUVEC, показано, что в результате 8-CPT-опосредованной активации Epac1/Rap1-сигнального каскада к клеточной мембране эндотелия перемещается белок сосудистой адгезии Ras, связывающий протеин 1 (Ras Interacting Protein 1, RASIP1) и инициирующий последующую транслокацию к мембране комплекса, включающего в себя белок, регулирующий миграцию – Rap GTPаза интерактор 1 (Rap GTPase interactor 1, RADIL1), и белок цитоскелета – Rho GTPаза, активирующий протеин 29 (Rho GTPase activating protein 29, ARHGAP29). Показано, что активация Epac1/Rap1/RASIP1/RADIL1/ARHGAP29 сигнального каскада приводит к транслокации к внутренней поверхности эндотелиальной мембраны комплекса RADIL1/ARHGAP29, подавляющего активность RhoA (рис. 5).

Супрессор сигнализации цитокинов 3 – SOCS-3 (Suppressor of cytokine signaling 3) является одним из основных отрицательных регуляторов иммунного ответа за счет своей способности блокировать тирозинкиназную активность нерецепторной джанус-киназы 2 (JAK2), что приводит к снижению фосфорилирования преобразователя сигнала и активатора транскрипции 3 – STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), который теряет способность проникать в ядро и регулировать экспрессию генов, чувствительных к действию цитокинов и тем самым препятствовать дестабилизации эндотелиального барьера. Помимо этого, показано, что SOCS-3 обладает способностью блокировать рецепторы таких провоспалительных цитокинов как интерлейкины (IL-6, IL-12, IL-17 и IL-31) и интерферон γ (IFN-γ) [42]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что активация белков Epac1 селективным агонистом 8-CPT приводит к SOCS-3-зависимой блокаде цитокиновой сигнализации и, как следствие этого, стабилизации барьерной функции эндотелия [42, 43].

Белок клеточной адгезии эндотелия сосудов – VE-кадгерин (VE calcium-dependent adhesion; VE-cadherin, син. CD144) рассматривают как ключевую, специфичную для эндотелия сосудов молекулу, расположенную в области контактов монослоя эндотелиальных клеток и регулирующую процессы их адгезии. В нормальных физиологических условиях VE-кадгерин связан с β-катенином и образует прочный VE-кадгерин/β-катениновый комплекс. β-катенин комплекса VE-кадгерин/β-катенин связан с α-катенином, который, в свою очередь, взаимодействует с актиновым цитоскелетом, обеспечивая стабильность клеточной адгезии. Дестабилизация VE-кадгерин-β/катенинового комплекса приводит к цитоплазматической аккумуляции белка p120-катенина – одного из основных регуляторов силы

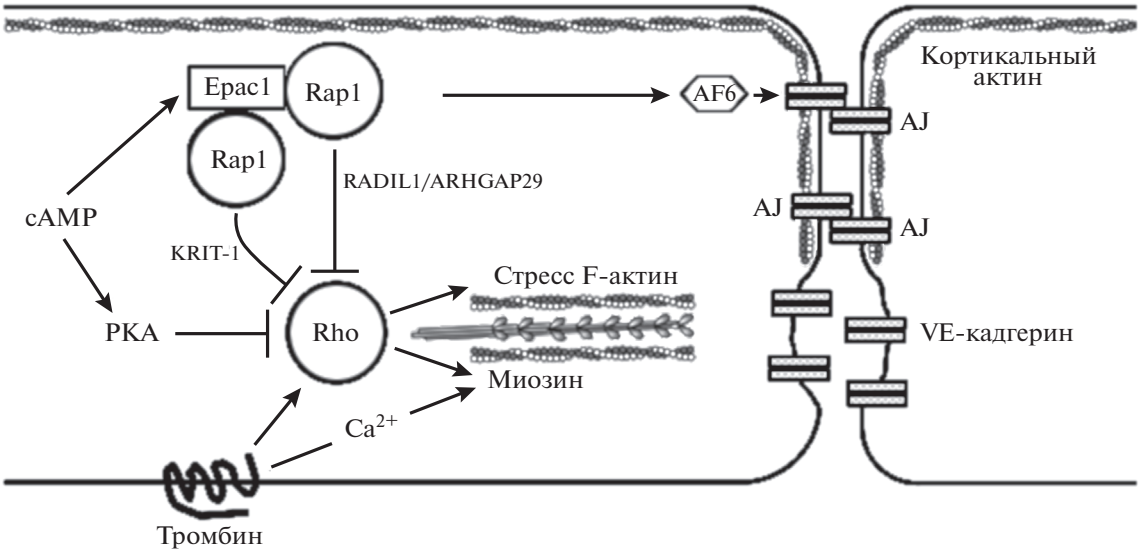

Рис. 5. Схематическое отображение Epac опосредованного повышения барьерной функции эндотелия сосудов за счет ингибирования Rho-киназы (по [35]).
Объяснение в тексте.

адгезионных межклеточных контактов, гиперэкспрессия которого сопровождается активацией белка RhoA [44]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре изолированных клеток эндотелия человека HUVEC, показано, что активация белков Epac1 их селективным агонистом 8-CPT, и соответственно Epac/Rap1 сигнального каскада, сопровождается увеличением числа и жесткости клеточно-клеточных соединений; снижением напряжения волокон актина; образованием кортикального актина и уменьшением проницаемости монослоя эндотелиальных клеток [45]. Этот эффект наблюдался только в клетках, содержащих VE-кадгерин, тогда как в клетках HUVEC, “лишенных” VE-кадгерина (VE-cadherin KN knock-out) активация Epac/Rap1 сигнального каскада не влияла на состояние эндотелиального барьера; ре-экспрессия в этих клетках VE-кадгерина сопровождалась восстановлением Epac-опосредованной стабилизации эндотелиального барьера [45]. Авторы этого исследования констатируют, что белки Epac1 контролируют VE-кадгерин-связанную стабилизацию эндотелиального барьера и сопутствующую ей реорганизацию актинового цитоскелета преимущественно за счет перестройки кортикального актина. Известен еще один сигнальный путь, приводящий к Epac-опосредованной стабилизации VE-кадгерина [46]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре эндотелиальных клеток артерий (HAECs) и микроартерий (HMVECs) человека, показано, что 8-CPT-опосредованая активация Epac/Rap1 сигнального каскада влечет за собой активацию фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов 4D (cyclic nucleotide phosphodiesterase 4D, PDE4D) которая играет важную роль в регуляции положительной адгезивной активности VE-кадгерина.

В модельных экспериментах *in vitro* на культуре ишемизированных изолированных клеток эндотелия человека HUVEC показано, что активация cAMP дитерпеноидным алкалоидом растения Coleus forskohlii форсколином (колеонол), который обладает способностью внерецепторно активировать cAMP, уменьшает ишемия-обусловленную гиперпроницаемость эндотелиального барьера [47]. В дальнейшем было показано, что в клетках HUVEC, “лишенных” белка Rap1 (Rap1 KN knock-out), не наблюдалось cAMP-опосредованного восстановления целостности эндотелиального барьера, а в интактных клетках целостность эндотелиального барьера поддерживается Epac-опосредованной активацией белка Rap1 [48]. Это сообщение подтвердило ранее полученные данные о том, что активированные белки Rap1 последовательно активирует метастаз-индуцирующий белок 1 (metastasis-inducing protein 1, Tiam1) и фактор обмена гуаниловых нуклеотидов Vav2 (guanine nucleotide exchange factor Vav2) [49]. Известно, что эти белки играют важную роль в регуляции полимеризации актина в области межклеточных контактов и способствуют созреванию межклеточных контактов. Конечным этапом активации Epac/Rap1/Tiam1/Vav2-сигнального каскада является активация малой GTPазы Rac1. Недавно было показано, что именно белки Epac1, но не белки Epac2, регулируют проницаемость микрососудистого барьера, поскольку в экспериментах *in vivo* было продемонстрировано, что у нокаутных по белку Epac1, но не у нокаутных по белку Epac2, мышей увеличи-

вается проницаемость эндотелиального барьера, о чем свидетельствовало усиление трансваскулярного транспорта, который определяли при помощи динамической контрастно-усиленной магнитно-резонансной томографии (МРТ) с использованием в качестве зонда контрастного агента Gadomer-17 [48].

Роль белков Epac в регуляции ангиогенеза и пролиферации эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов. Если роль белков Epac в регуляции проницаемости эндотелия сосудов достаточно ясна, то их функциональное значение в регуляции ангиогенеза достаточно дискутабельно. В первых посвященных этой проблеме исследованиях, выполненных на культуре изолированных клеток эндотелия человека HUVEC, было показано, что активация белков Epac (Epac1 и Epac 2) селективным агонистом 8-CPT ингибирует миграцию клеток HUVEC, стимулированную фактором роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor; VEGF) [50]. Также было показано, что в отличие от белков Epac PKA в эндотелиальных клетках не влияет на регуляцию ангиогенеза, поскольку ее активация селективным агонистом – 6-Bnz-cAMP не сопровождается подавлением VEGF-опосредованной миграции. Авторы исследования сделали вывод о том, что белки Epac и Rap1 являются центральными медиаторами, регулирующими хемотаксис эндотелиальных клеток сосудов. При изучении механизмов, лежащих в основе Epac/Rap1-опосредованного ингибирования хемотаксиса и ангиогенеза, было показано, что активация белков Epac селективным агонистом 8-CPT в клетках эндотелия человека HUVEC влечет за собой подавление активности ингибитора дифференциации Id1 (inhibitor of differentiation 1), подавляющего активность белка внеклеточного матрикса тромбоспондина-1 (thrombospondin 1; TSP1) – эндогенного ингибитора ангиогенеза и влечет за собой подавление активности ингибитора дифференциации Id1 (inhibitor of differentiation 1), подавляющего активность белка внеклеточного матрикса тромбоспондина-1 (thrombospondin 1; TSP1) – эндогенного ингибитора ангиогенеза, и последующее повышение экспрессии TSP1 [51]. В свою очередь, TSP1, связываясь с рецепторами мембранных белков CD36 и CD47, инициирует активацию внутриклеточных сигнальных каскадов, подавляющих ангиогенную активность VEGF.

Эти результаты представлялись достаточно спорными, поскольку еще в начале XXI века в экспериментах *in vivo* было показано, что активация cAMP форсколином или активация PKA 6-Bnz-cAMP влечет за собой VEGF-опосредованную активацию ангиогенеза [52].

Несколько позднее было продемонстрировано, что активация сопряженных с белком Rap1 сигнальных путей стимулирует ангиогенез [53, 54]. В основе стимуляции ангиогенеза лежит способность белков Rap1a и Rap1b активировать VEGF-рецепторы 2 типа (VEGFR2); этот эффект частично опосредуется мембранным белком интегрином $\alpha_v\beta_3$ [54]. Более того, было показано, что у нокаутных по белку Rap1 мышей интенсивность миграции и пролиферации эндотелиальных клеток в ответ на стимуляцию VEGF и/или фактором роста фибробластов (fibroblast growth factor; FGF) существенно снижается [54]. Результаты этих исследований хорошо согласуются с данными о том, что белки Epac активируют внутриклеточные проангиогенные каскады [32, 55, 56]. Так, в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре изолированных клеток эндотелия человека HUVEC, показано, что активация белков Epac1 селективным агонистом 8-CPT влекла за собой фосфорилирование (активацию) внеклеточной сигнал-регулируемой киназы-1/2 (extracellular signal–regulated kinase-1/2; ERK1/2, син. MAPK3) и последующую стимуляцию ангиогенеза [55]. В этом же исследовании был проведен анализ результатов цепной реакции обратной транскрипции полимеразы, свидетельствующий о том, что белок Epac1, но не белок Epac2, вызывает фосфорилирование ERK1/2.

В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре изолированных клеток эндотелия человека HUVEC, показано, что белок Epac реализует свои ангиогенные эффекты посредством активации сигнального пути, регулируемого фосфоинозитид-3-киназой (phosphoinositide 3-kinas; PI3K) PI3K/Akt/eNOS/NO сигнального пути [56]. Было показано, что ангиогенез, инициированный агонистом cAMP форсколином, подавляется ингибитором PI3K – LY294002 и/или ингибитором эндотелиальной NO-синтазы (eNO-synthase; eNOS, син. NOS3) – NMA, но его интенсивность практически не изменяется при блокаде PKA ее эндогенным ингибитором PKI. Помимо этого, было показано, что форсколин-индуцированное фосфорилирование транскрипционного фактора CREB (cAMP response element-binding protein) и последующая экспрессия VEGF блокируются ингибитором PKA – PKI. Авторы этого исследования делают заключение, что в эндотелиальных клетках присутствуют два параллельных, взаимодополняющих cAMP-опосредованных проангиогенных сигнальных пути, регулируемые PKA и белками Epac1. При этом, если PKA-сопряженный сигнальный каскад (PKA/pCREB) инициирует экспрессию VEGF, то белки Epac1 активируют/регулируют ангиогенез по VEGF-независимым сигнальным путям: Rap1/PI3K/Akt/eNOS/NO и/или Rap1/MEK/ERK [56]. Однако позднее было показано, что активация в клетках HUVEC белков Epac1 селективным агонистом 8-CPT сопровождается увеличением об-

разования VEGFR-2 и экспрессии VEGF [32]. Также было показано, что PKA регулирует ангиогенез посредством активации сопряженного с ERK сигнального каскада [57].

Если роль белков Epac в регуляции ангиогенеза и пролиферации эндотелиальных клеток дискутабельна, то их место в регуляции пролиферации гладкомышечных клеток сосудов представляется достаточно определенным. Еще в начале XXI века *in vitro* и *in vivo* было показано, что форсколин-опосредованная активация cAMP ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов посредством дестабилизации S-фазного киназа-ассоциированного белка 2 (S-phase kinase-associated protein 2; Skp2), являющегося главным компонентом Skp2/SCF-комплекса, регулирующего цикл клеточного деления [58]. Позднее эти же авторы показали, что PKA и белки Epac являются синергистами в отношении регуляции пролиферации гладкомышечных клеток сосудов [59, 60]. Так, в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре гладкомышечных клеток сосудов, полученных от Спраг-Доули (SD) крыс, показано, что селективная активация PKA 6-Bnz-cAMP не препятствовала пролиферации гладкомышечных клеток [59]. Аналогичный результат был получен и при активации белков Epac1 селективным агонистом 8-CPT, несмотря на активацию их эффекторов – белков Rap1a и Rap1b. Вместе с тем, совместная активация PKA 6-Bnz-cAMP и белков Epac1 8-CPT эффективно подавляла пролиферацию гладкомышечных клеток. В основе этого эффекта лежит корпоративное подавление фосфорилирования ERK и c-Jun N-концевой киназы (c-Jun N-terminal kinase; JNK) и, следовательно, ингибирование их активности, PKA и белком Epac1. В процессе этих исследований было подтверждено, что корпоративный эффект PKA и белков Epac1 реализуется в гладкомышечных, но не эндотелиальных, клетках сосудов [60]. Также было показано, что подавление пролиферации гладкомышечных клеток, как минимум частично, связано со способностью PKA/Epac1 ингибировать активность Ras-связанного субстрата ботулотоксина C3,1 – белка Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1). Ингибирование C3,1 – Rac1 приводило к быстрому ремоделированию цитоскелета, ядерному экспорту ERK1/2, дефосфорилированию фактора транскрипции Elk1 (ETS domain-containing protein) и ингибированию активности цис-регуляторного элемента SRE (участок ДНК, регулирующий экспрессию генов).

Роль белков Epac в регуляции тонуса сосудистого русла. Регуляция тонуса сосудистого русла – сложный многофакторный процесс, в котором одну из ключевых ролей играет Rho-ассоциированная протеинкиназа A (Rho-associated protein kinase; RhoKα, син. ROCK2), активация которой инициирует вазоконстрикцию. Показано, что RhoKα-опосредованная вазоконстрикция реализуется по двум путям: Ca^{2+}-независимому пути (за счет ингибирования фосфатазы легких цепей миозина – PLCM посредством фосфорилирования ее регуляторной субъединицы MYPT1, что приводит к снижению активности PLCM и ее диссоциации от миозина и, следовательно, сокращению гладкой мышцы) и Ca^{2+}-зависимому пути (за счет усиления входа ионов Ca^{2+} в цитозоль гладкомышечной клетки в результате повышения активности трансмембранных потенциал-зависимых Ca^{2+}-каналов L-типа) [61]. Известно, что, в отличие от RhoKα, cAMP инициирует вазодилатацию. В ряде исследований показано, что вазодилатирующее действие реализуется по Ca^{2+}-независимому механизму посредством активации cAMP-сопряженных сигнальных каскадов, инициирующих дефосфорилирование регуляторной субъединицы MYPT1 фосфатазы LCM, что приводит к восстановлению ее активности и расслаблению гладкомышечных клеток сосудов [62]. Этот эффект связан с активацией cAMP/PKA сигнального пути [63] и реализуется в крупных магистральных сосудах [64]. Однако позднее в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре гладкомышечных клеток (R518) аорты крысы, было показано, что дефосфорилирование регуляторной субъединицы MYPT1 фосфатазы LCM связано с активацией Epac/Rap1-сигнального пути селективным агонистом белков Epac 8-CPT, тогда как активация PKA ее селективным агонистом 6-Bnz-cAMP инициирует вазодилатацию посредством фосфорилирования (активации) миозин-связывающего белка гладких мышц – белка KRP (Kinase Related Protein; син. фелокин), который, связываясь с субъединицей MYPT1 фосфатазы LCM, восстанавливает ее функциональную активность [64] (рис. 6). В этом же исследовании показано, что Epac-опосредованная вазодилатация связана не только с восстановлением активности фосфатазы LCM, но и с уменьшением фосфорилирования регуляторной легкой цепи миозина – RLC_{20}. В экспериментах *in vitro*, выполненных на лишенных эндотелия кольцевых сегментах аорты крыс, показано, что белки Epac, также как и PKA, могут способствовать вазодилатации за счет истощения внутриклеточных запасов ионов Ca^{2+}, аккумулированых в саркоплазматическом ретикулуме [65]. Однако остается не ясным, насколько корректны данные результаты, поскольку кольцевые сегменты аорты находились в бескальциевой среде.

Известно, что одним из физиологических регуляторов тонуса гладкомышечных клеток сосудов являются АТФ-чувствительные K^+-каналы ($K_{АТФ}$-каналы), относящиеся к классу K^+-каналов внутреннего выпрямления (K^+ inward rectifier;

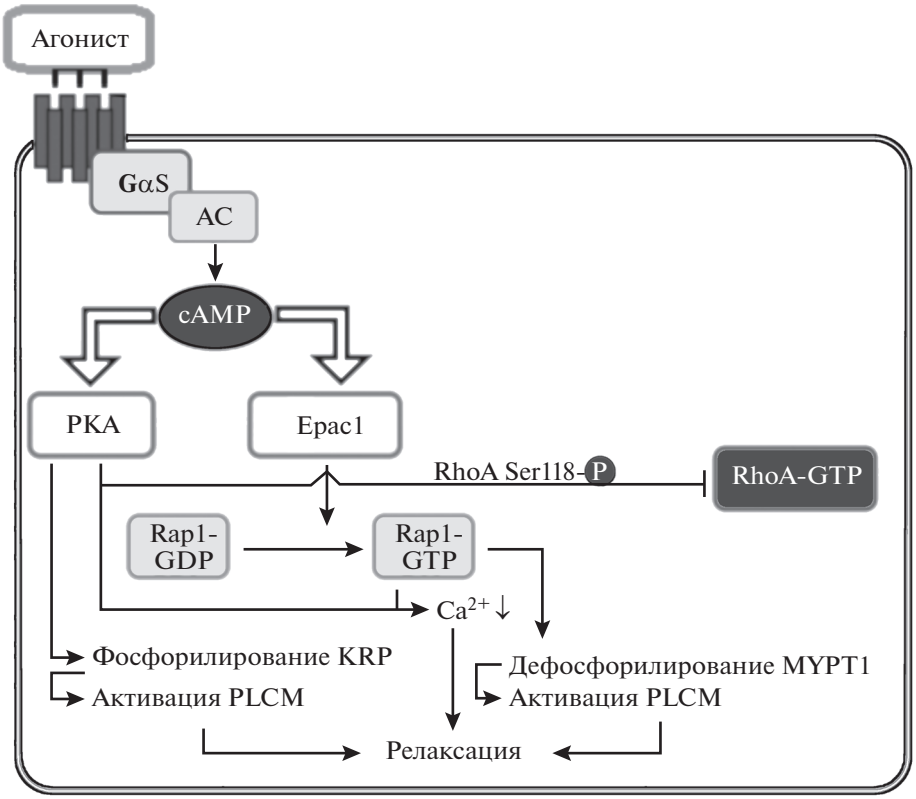

Рис. 6. Схематическое отображение Epac и PKA опосредованной регуляции релаксации гладкомышечных клеток сосудов (с изменениями по [64]).
Объяснение в тексте.

Kir) семейства Kir6. $K_{АТФ}$-канал состоит из четырех Kir6.x субъединиц, формирующих пору канала, и четырех дополнительных белков – рецепторов к сульфонилмочевине SUR. Вазодилатация связана с открытием $K_{АТФ}$-каналов, вызывающих гиперполяризацию клеточной мембраны и, как следствие этого, подавление входящего трансмембранного Ca^{2+} тока.

Показано, что в гладкомышечных клетках сосудов активация $K_{АТФ}$-каналов нейротрансмиттерами может происходить по Gs/cAMP/PKA-сигнальному пути [66]. Конечным этапом этого процесса является фосфорилирование PKA Kir6.1 субъединицы $K_{АТФ}$-канала и активация SUR2B канального рецептора.

В экспериментах *in vitro*, выполненных на гомогенате тканей аорты и брыжеечной артерии крыс, показано, что белки Epac1, но не белки Epac2, локализуются на внутренней поверхности клеточной мембраны вблизи $K_{АТФ}$-каналов [67]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре гладкомышечных клеток аорты крысы, было показано, что активация белков Epac1 селективным агонистом 8-CPT сопровождалась активацией/модуляцией $K_{АТФ}$-каналов [67]. Этот эффект белков Epac1 опосредуется путем активации ими Ca^{2+}-кальмодулин-зависимой серин-треониновой фосфатаза 2b (PP2b фосфатаза; син кальцинейрин, CaN). Также в этом исследовании было показано, что активация $K_{АТФ}$-каналов не связана с PKA-опосредованной сигнализацией, поскольку селективное ингибирование PKA ингибитором Rp-cAMPS (конкурентный ингибитор активации PKA cAMP) или ингибитором KT5720 (блокада PKA-опосредованного фосфорилирования), не влияла на Epac-инициированную активацию $K_{АТФ}$-каналов. В экспериментах *in vitro*, выполненных на кольцевых сегментах брыжеечных артерий, показано, что активация белков Epac селективным агонистом 8-CPT сопровождается активацией активируемых ионами Ca^{2+} калиевых каналов (BK_{Ca}-каналы), встроенных в клеточную мембрану гладкомышечных клеток сосудов [68]. Известно, что активация (открытие) BK_{Ca}-каналов сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+}, что приводит к выходу ионов K^+ из клетки, гиперполяризации клеточной мембраны и последующей вазодилатации. Также было показано, что блокада BK_{Ca}-каналов ибериотоксином препятствует

реализации Epac-обусловленного расширения кольцевых сегментах брыжеечных артерий. При изучении механизмов, лежащих в основе Epac-обусловленной активации BK_{Ca}-каналов, было показано, что активация белков Epac вызывает релаксацию гладких мышц путем увеличения частоты локального высвобождения ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума через встроенные в его мембрану рианодин-чувствительные каналы (рианодиновые рецепторы, ryanodine receptor RyRs). Выделившиеся ионы Ca^{2+} активируют так называемый спонтанный переходный выходящий ток ионов K^+ (spontaneous transient outward K^+currents; STOCs), что вызывает гиперполяризацию клеточной мембраны и уменьшает вход ионов Ca^{2+} в цитозоль клетки через потенциалзависимые трансмебранные медленные Ca^{2+} каналы L-типа. Позднее было показано, что Epac-опосредованные STOCs связаны со способностью белков Epac стимулировать аутофосфорилирование (активацию) цитозольной кальций/ кальмодулин-зависимой киназы 2 (Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II; CaMKIIδ), которая, в свою очередь, активирует RyR [69]. Данное заключение сделано на основании того, что активация белков Epac1 селективным агонистом 8-CPT на фоне блокады CaMKIIδ ингибитором KN93 не приводила к активации STOCs. Помимо BK_{Ca}-каналов в Epac-обусловленной релаксации сосудов принимают участие и трасмебранные потенциалзависимые K^+-каналы задержанного выпрямления подсемейства $K_V7,4$ (KvLQT4 или KCNQ4). В экспериментах *in vitro*, выполненных на кольцевых сегментах брыжеечной артерии, показано, что на фоне блокады $K_V7,4$-каналов селективным ингибитором pan-K_V7 каналов – linopirdine не реализуются ни вазодилатация, инициированная неселективным β-адреномиметиком изопротеренолом, ни вазодилатация, инициированная активацией белков Epac их агонистом 8-CPT, на основании чего авторы пришли к выводу, что Epac-опосредованное расширение сосудов связано с активацией $K_V7,4$-каналов и последующей гиперполяризацией клеточной мембраны [70]. Также было показано, что $K_V7,4$-опосредованное вазодилатирующее действие белков Epac связано с активацией Epac/Rap1-сигнального каскада. В аналогичных экспериментах, выполненных на сегментах почечной артерии, белки Epac не инициировали вазодилатацию. Авторы полагают, что в почечных артериях $K_V7,4$-опосредованная вазодилатация связана с активацией сигнального пути PKA/якорный белок а-киназ (A-kinase anchor proteins, AKAP). В экспериментах *in vitro*, выполненных на кольцевых сегментах аорты, показано, что активация белков Epac селективным агонистом 8-CPT значительно ослабила интенсивность сокращения как интактных, так и лишенных эндотелия колец аорты, вызванного агонистом α-адренорецепторов фенилэфрином [71]. Аналогичное действие оказывала и PKA активированная 6-Bnz-cAMP. Авторы исследования полагают, что вазодилатирующий эффект белков Epac реализуется посредством увеличения продукции эндотелиальной NO-синтазы (NOS3), поскольку на фоне ингибирования NOS3 N-нитро-L-аргинин метилэфиром (L-NAME) релаксация под действием белков Epac не развивалась.

Если в крупных сосудах активация белков Epac инициирует вазодилатацию, то в микрососудах скелетной мускулатуры белки Epac контролируют вазоконстрикторные каскады. Изначально было показано, что холодовая стимуляция вызывает вазоконстрикцию, увеличивая экспрессию α_{2c}-адренорецепторов в клеточной мембране гладкомышечных клеток подкожных артериол посредством активации cAMP/Rap1 сигнального пути [72]. Позднее в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре гладкомышечных клеток, полученных из кожных артериол человека, было показано, что активация белков Epac1 селективным агонистом 8-CPT инициирует экспрессию α_{2c}-адренорецепторов и последующее сокращение гладкомышечных клеток посредством активации белка Rap1, который фосфорилирует (активирует) c-Jun-амино-терминальную киназу (c-Jun N-Terminal Kinase; c-JNK) [73]. Фосфорилированная c-JNK активирует фактор транскрипции AP-1 (activator protein 1), который транслоцируется в ядро клетки, где инициирует экспрессию α_{2c}-адренорецепторов. Позднее те же авторы в аналогичных экспериментах показали, что экспрессия α_{2c}-адренорецепторов в гладких мышцах микрососудов кожи человека инициируется посредством активации cAMP/Epac/Rap1A/Rho/ROCK сигнального пути [74]. В том же исследовании было продемонстрировано, что вазоконстрикторные эффекты, опосредуемые белками Epac, могут реализоваться не только в ответ на холодовое воздействие, но и при нормальной температуре. Полагают, что активация cAMP/Epac/Rap1A/Rho/ROCK сигнального пути влечет за собой фосфорилирование (активацию) актинсвязывающего белка филамин-2 по Ser^{2113}, который не только связывает отдельные микрофиламенты актина, но и регулирует экспрессию таких факторов транскрипции как SMAD1 (mothers against decapentaplegic homolog1), FOXC1 (forkhead box C1) и TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) [75]. По всей видимости, транслокацию α_{2c}-адренорецепторов в область клеточной мембраны инициируют сопряженные с белками Epac Rap1/c-JNK/AP-1 и Rap1A/Rho/ROCK/ филамин-2 сигнальные пути [75] (рис. 7).

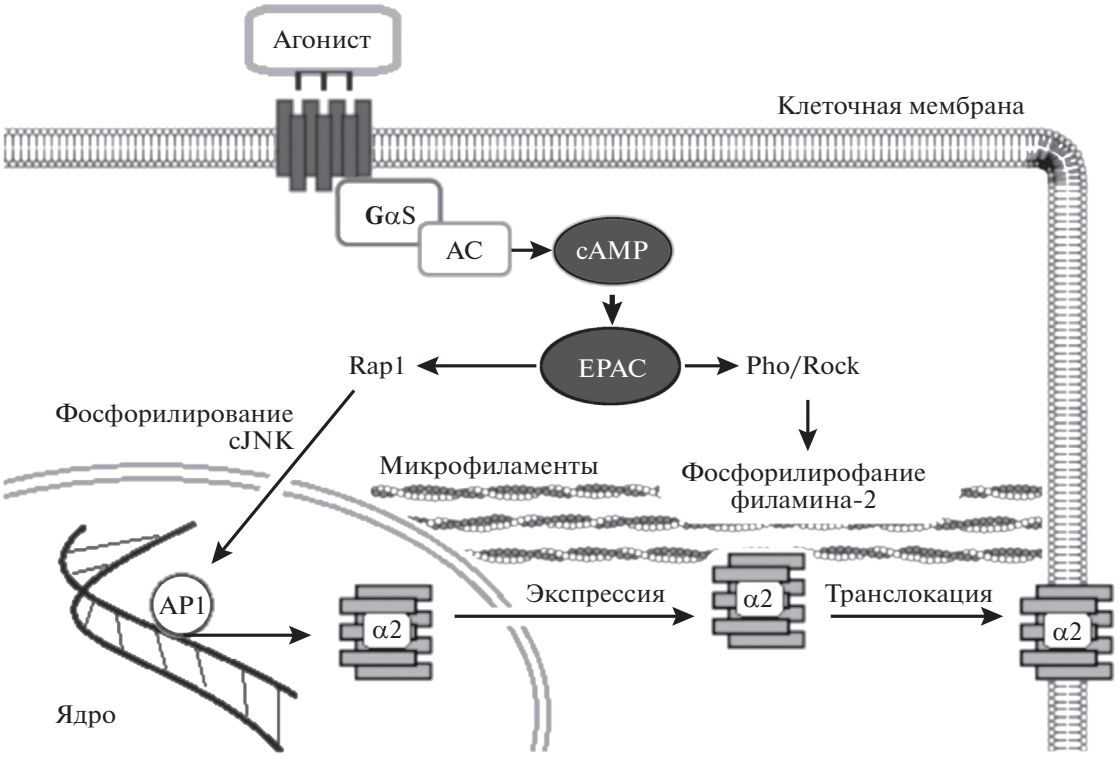

Рис. 7. Схематическое отображение Epac опосредованной инициации вазоконстрикции гладкомышечных клеток подкожных артериол.
Объяснение в тексте.

Роль белков Epac в патологии сосудистого русла. Количество исследований, посвященных изучению роли белков Epac в патологии сосудистого русла, незначительно, однако все они свидетельствуют о том, что их гиперэкспрессия в условиях травматического повреждения сосудов способствует формированию гиперплазии неоинтимы. Так, в модельных экспериментах *in vivo*, выполненных на нокаутных по белкам Epac1 мышах обоего пола, было показано, что через 28 дней после перевязки сонной артерии у них, по сравнению с контрольными животными, интенсивность облитерации просвета лигированного сосуда значимо ($p < 0.05$) меньше [76] (рис. 8, *А*). Морфометрический анализ поврежденных сонных артерий показал, что у нокаутных по белкам Epac1 мышей, по сравнению с контрольными, толщина интимы значимо меньше (рис. 8, *Б*) и более чем в 3 раза уменьшено соотношение интима/медиа (рис. 8, *В*), что сопровождается 5-кратным увеличением площади просвета сосуда (рис. 8, *Г*). Помимо этого, у нокаутных по белкам Epac1 мышей было значимо ($p < 0.05$) снижено общее количество пролиферативных клеток. Иммуностайнинг эндотелиальных клеток показал, что у нокаутных по белкам Epac1 мышей эндотелиальный слой хорошо организован и практически интактен, в то время как эндотелий контрольных животных дезорганизован и в него из гладкомышечных клеток проникают волокна белка α-актина (alpha-smooth muscle actin; α-SMA) – одного из индукторов фиброгенеза. Известно, что фактор роста тромбоцитов (Platelet-derived growth factor, PDGF) играет ключевую роль в переходе гладкомышечных клеток сосудов от сократительного к синтетическому фенотипу и способствует образованию неоинтимы при их ремоделировании. Этот эффект PDGF реализуется посредством активации PI3K/AKT/mTOR сигнального пути. Показано, что белки Epac1 в условиях патологии сосудистого русла, также как и PDGF, инициируют образование неоинтимы за счет активации PI3K/AKT/mTOR сигнального пути [76]. Известно, что белки Epac1 локализуются в том числе и на клеточной мембране митохондрий, ассоциацию с которой обеспечивает их DEP домен регуляторного региона [77]. При изучении роли белков Epac1 в регуляции функциональной активности митохондрий в поврежденных гладкомышечных клетках сосудов было показано, что они непосредственно участвуют в регуляции скорости деления митохондрий и сопутствующей этому процессу активации митохондрии-обусловленной продукции реактивных форм кислорода (ROS) [76] и, как следствие этого, ROS-обусловленной активации PDGF. В основе этого

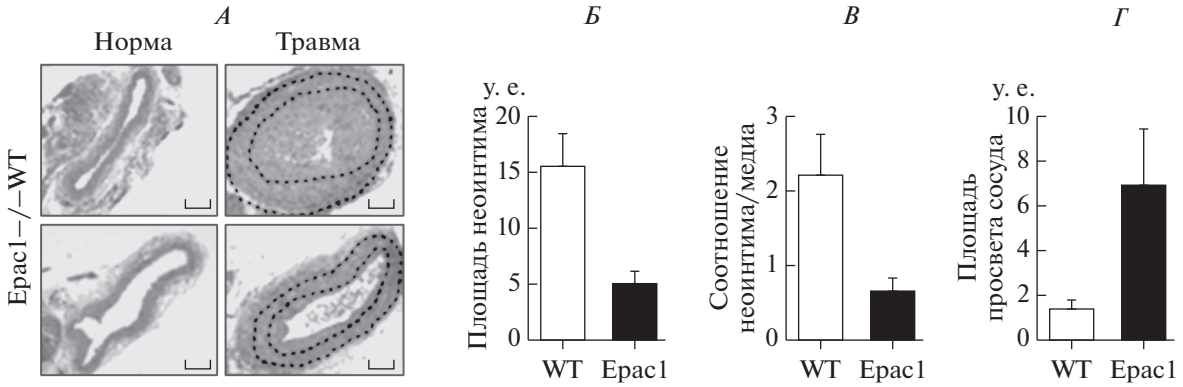

Рис. 8. Влияние белков Epac на образование неоинтимы в поврежденном сосуде (по [76]). Объяснение в тексте.

процесса лежит Epac1-инициированное фосфорилирование (активация) динамин-1-подобного белка (DLP-1) – ключевого регулятора скорости деления митохондрии. Показано, что при ингибировании белка Epac1 неселективным антагонистом белков Epac – HJC0726 не происходит фосфорилирование DLP-1 и, следовательно, блокируется митохондрии-обусловленная продукция ROS. Также в этом исследовании показано, что блокада белка Epac1 неселективным антагонистом белков Epac – ESI-09 подавляет процессы образования неоинтимы в поврежденном сосуде. В модельных экспериментах *in vivo,* в которых повреждение стенки бедренной артерии вызывали транслюминальной механической травмой, показано, что в стенке поврежденного сосуда происходит динамическое увеличение экспрессии белков Epac1, которая достигает максимума к концу 3-ей недели после нанесения травмы [78]. При этом, если к концу 1-ой недели экспрессия белков Epac1 отмечается только в гладкомышечных клетках сосудов, то к концу 3-ей недели белки Epac1 экспрессируются и в гладкомышечных клетках, и в неоитиме. В этом же исследовании было показано, что PKA, в отличие от белков Epac1, не стимулирует, а ингибирует образование неоинтимы в поврежденном сосуде. В модельных экспериментах *in vivo*, в которых повреждение стенки бедренной артерии вызывали транслюминальной механической травмой, показано, что у нокаутных по белкам Epac1 мышей, в отличие от контрольных животных, не происходит избыточного формирования неоинтимы ($p < 0.05$) [34]. Помимо этого, у нокаутных животных длина наружных ламеллоподий (lamellipodia – выпячивания, которые клетка образует по направлению своего движения/роста) была значимо ($p < 0.05$) меньше. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре гладкомышечных клеток аорты, полученных от нокаутных по белкам Epac1 мышей, показано, что PDGF не оказывал влияния на уровень фосфорилирования (активации) актин-связывающего белка кофилин 1 (Cofilin 1, CFL1), что подавляло процесс разборки F-актина и тем самым стабилизировало цитоскелет и останавливало миграцию, тогда как в культуре гладкомышечных клеток интактных животных PDGF в присутствии белка Epac1 инициировал дефосфорилирование (деактивацию) CFL1, что, в свою очередь, активировало процессы клеточной миграции [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что белки Epac1, но не белки Epac2, в нормальных физиологических условиях играют важную, в том числе и не зависимую от PKA, многофакторную роль в регуляции функциональной активности сосудистой стенки. В результате активации катехоламинами β_1-адренорецепторов и/или β_2-адренорецепторов, встроенных в клеточную мембрану эндотелиальных клеток, и сопряженного с ними Gs-белка, активируется аденилатциклаза, которая инициирует синтез cAMP и последующую активацию белков Epac c1, которые, в свою очередь, индуцируют ряд внутриклеточных сигнальных каскадов, стабилизирующих/восстанавливающих барьерную функцию эндотелия (активация Epac1/AKAP9 и/или Epac1/Rap1/Tiam1/Vav2/Rac1 и/или Epac/Rap1/PDE4D сигнальных каскадов; ингибирование RhoA посредством активации Epac/Rap1/KRIT-1 и/или Epac1/Rap1/RASIP1/RADIL1/ARHGAP29 сигнальных каскадов, блокада цитокиновой сигнализации посредством Epac-опосредованной активации SOCS-3) (рис. 9). Способность белков Epac1 повышать барьерную функцию эндотелия сосудов универсальна и реализуется как в артериальном, так и венозном отделах сосудистого русла, что продемонстрировано в экспериментах на культу-

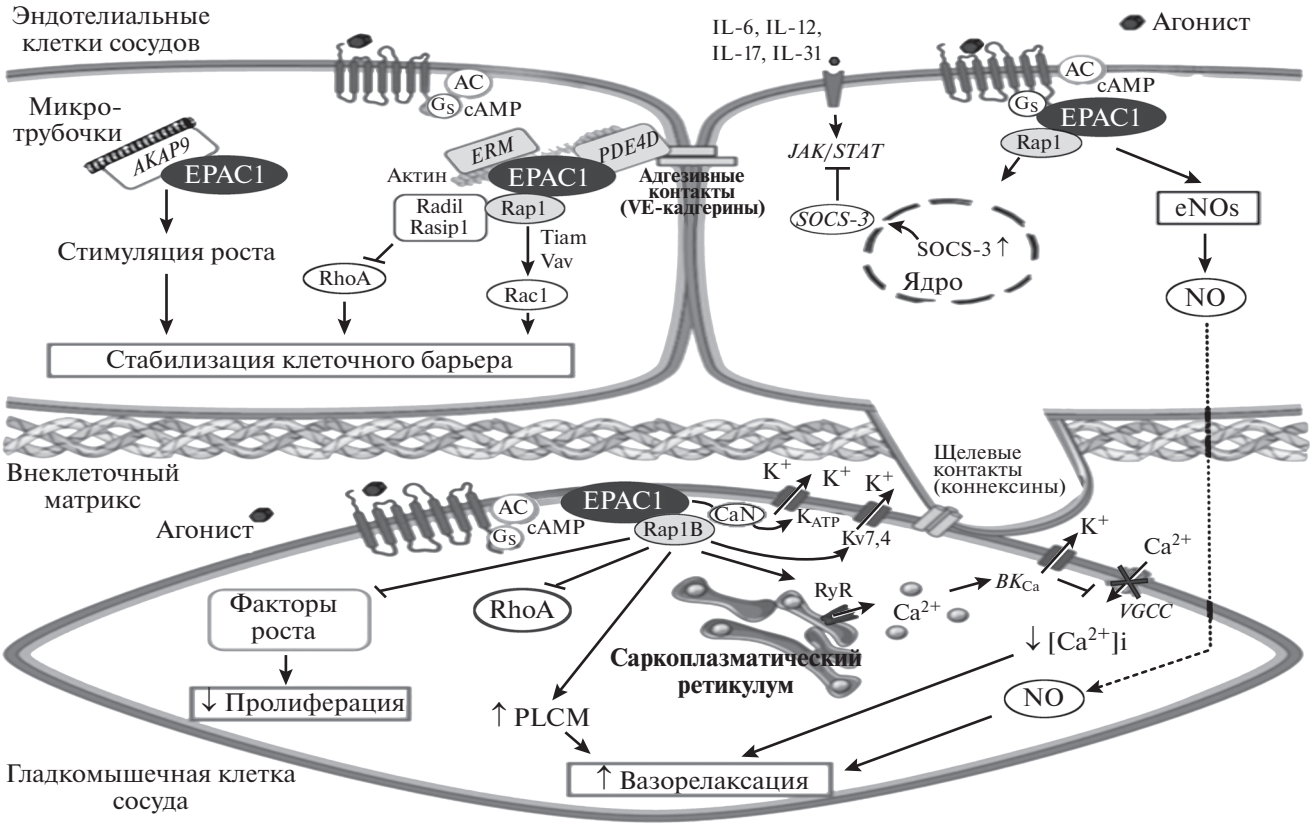

Рис. 9. Схематическое отображение роли белков Epac в физиологической регуляции сосудистого русла (с изменениями по [23]).
Объяснения в тексте.

ре клеток эндотелия артерий – HAECs , микроартерий – HMVECs и пупочной вены – HUVEC.

Роль белков Epac1 в регуляции пролиферации эндотелиальных клетках сосудов дискутабельна, однако большинство исследователей полагает, что они, активируя сопряженные с ними Rap1/PI3K/Akt/eNOS/NO и/или Rap1/MEK/ERK сигнальные каскады проявляют проангиогенную активность. Вместе с тем, остается не ясным, связаны ли эндотелиальные проангиогенные эффекты белков Epac1 с активацией VEGF. Если роль белков Epac1 в регуляции ангиогенеза и пролиферации эндотелиальных клеток окончательно не выяснена, то их место в регуляции пролиферации/ангиогенеза гладкомышечных клеток сосудов представляется достаточно определенным – белки Epac1, действуя корпоративно с PKA, проявляют антиангиогенную активность. В основе этого эффекта лежит их способность ингибировать в гладкомышечных клетках сосудов ERK/JNK и/или Rac1/ERK1/Elk1 сигнальные каскады.

Не менее важную роль белки Epac1 играют в регуляции тонической активности сосудистого русла. В крупных сосудах они проявляют выраженную комплексную вазодилатирующую активность: активируют трансмембранные BK_{Ca}- и $K_V7,4$-каналы, что вызывает гиперполяризацию клеточной мембраны и, следовательно, подавляет вход ионов Ca^{2+} в цитозоль клетки через потенциалзависимые трансмебранные медленные Ca^{2+}-каналы L-типа; аналогичное действие оказывает Epac1/CaN-опосредованная активация $K_{АТФ}$ трансмебранных каналов; ингибируют вазоконстрикторную активность Rho за счет активации Epac/Rap1 сигнального пути и последующего дефосфорилирования регуляторной субъединицы MYPT1 фосфатазы LCM; индуцируя эндотелий-зависимую релаксацию путем активации NOS3 и высвобождения NO (рис. 8). Напротив, в микрососудах Epac1 инициируют вазоконстрикцию посредством активации Epac1/Rap1A/Rho/ROCK сигнального пути и, как следствие этого, экспрессии α_{2c}-адренорецепторов в клеточной мембране.

В условиях патологии сосудистого русла – сосудистой травмы, белки Epac1 активируют процессы миграции гладкомышечных клеток и рост неоинтимы, что, естественно, может вызвать стеноз/рестеноз поврежденного сосуда. Также, если принять во внимание данные о том, что белки

Epac1 могут инициировать избыточную транслокацию α_{2c}-адренорецепторов в область клеточной мембраны в условиях нормотермии [75], т.е. все основания полагать, что они потенциально могут играть существенную роль в патогенезе болезни Рейно.

Благодарности. Авторы выражают глубокую признательность за консультативную помощь в работе над обзором литературы гл.н.с. ФГБНУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, чл.-корр. РАН Ю.В. Вахитовой и за помощь в оформлении работы н.с. ФГБНУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова В.В. Барчукову (Москва).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rall T.W., Sutherland E.W.* Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles // J. Biol. Chem. 1958. V. 232. № 2. P. 1065.
2. *Walsh D.A., Perkins J.P., Krebs E.G.* An adenosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. № 13. P. 3763.
3. *Lymperopoulos A., Rengo G., Koch W.J.* Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy // Circ. Res. 2013. V. 113. № 6. P. 739.
4. *Sands W.A., Palmer T.M.* Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation // Cell Signal. 2008. V. 20. № 3. P. 460.
5. *Chin K.V., Yang W.L., Ravatn R. et al.* Reinventing the wheel of cyclic AMP: novel mechanisms of cAMP signaling // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2002. V. 968. P. 49.
6. *Biel M., Michalakis S.* Cyclic nucleotide-gated channel // Handb. Exp. Pharmacol. 2009. V. 191. P. 111.
7. *Renström E., Eliasson L., Rorsman P.* Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cell // J. Physiol. 1997. V. 502. Pt. 1. P. 105.
8. *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. V. 48. № 4. P. 324.
9. *Kawasaki H., Springett G.M., Mochizuki N. et al.* A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1 // Science. 1998. V. 282. № 5397. P. 2275.
10. *de Rooij J., Zwartkruis F.J., Verheijen M.H. et al.* Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP // Nature. 1998. V. 396. № 6710. P. 474.
11. *Aronoff D.M., Canetti C., Serezani C.H. 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. V. 174. № 2. P. 595.
12. *Cheng X., Ji Z., Tsalkova T., Mei F.* Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors // Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai). 2008. V. 40. № 7. P. 651.
13. *Muñoz-Llancao P., Henríquez D.R., Wilson C. et al.* Exchange protein directly activated by cAMP (EPAC) regulates neuronal polarization through Rap1B // J. Neurosci. 2015. V. 35. № 32. P. 11315.
14. *Breckler M., Berthouze M., Laurent A.C. et al.* Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications // Cell. Signal. 2011. V. 23. № 8. P. 1257.
15. *Krähling A.M., Alvarez L., Debowski K. et al.* CRIS-a novel cAMP-binding protein controlling spermiogenesis and the development of flagellar bending // PLoS Genet. 2013. V. 9. № 12. e1003960.
16. *Schindler R.F., Brand T.* The Popeye domain containing protein family – A novel class of cAMP effectors with important functions in multiple tissues // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2016. V. 120. № 1–3. P. 28.
17. *Banerjee U., Cheng X.* Exchange protein directly activated by cAMP encoded by the mammalian rapgef3 gene: Structure, function and therapeutics // Gene. 2015. V. 570. № 2. P. 157.
18. *de Rooij J., Rehmann H., van Triest M. et al.* Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 27. P. 20829.
19. *Schmidt M., Dekker F.J., Maarsingh H.* Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions // Pharmacol. Rev. 2013. V. 65. № 2. P. 670.
20. *Sugawara K., Shibasaki T., Takahashi H., Seino S.* Structure and functional roles of Epac2 (Rapgef4) // Gene. 2016. V. 575. № 2. Pt. 3. P. 577.
21. *Roberts O.L., Dart C.* cAMP signalling in the vasculature: the role of Epac (exchange protein directly activated by cAMP) // Biochem. Soc. Trans. 2014. V. 42. № 1. P. 89.
22. *Dao K.K., Teigen K., Kopperud R. et al.* Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 30. P. 21500.
23. *Lezoualc'h F., Fazal L., Laudette M., Conte C.* Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and their role in cardiovascular function and disease // Circ. Res. 2016. V. 118. № 5. P. 881.
24. *Borland G., Gupta M., Magiera M.M. et al.* Microtubule-associated protein 1B-light chain 1 enhances activation of Rap1 by exchange protein activated by cyclic AMP but not intracellular targeting // Mol. Pharmacol. 2006. V. 69. № 1. P374.
25. *Gloerich M., Ponsioen B., Vliem M.J. et al.* Spatial regulation of cyclic AMP-Epac1 signaling in cell adhesion by ERM proteins // Mol. Cell. Biol. 2010. V. 30. № 22. P. 5421.

26. *Rehmann H., Arias-Palomo E., Hadders M.A. et al.* Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B // Nature. 2008. V. 455. № 7209. P. 124.

27. *Rehmann H., Rueppel A., Bos J.L., Wittinghofer A.* Communication between the regulatory and the catalytic region of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 26. P. 23508.

28. *Fujita T., Umemura M., Yokoyama U. et al.* The role of Epac in the heart // Cell. Mol. Life Sci. 2017. V. 74. № 4. P. 591.

29. *Nikolaev V.O., Bunemann M., Hein L. et al.* Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 36. P. 37215.

30. *Wong W., Scott J.D.* AKAP signalling complexes: focal points in space and time // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004. V. 5. № 12. P. 959.

31. *Lee L.C., Maurice D.H., Baillie G.S.* Targeting protein-protein interactions within the cyclic AMP signaling system as a therapeutic strategy for cardiovascular disease // Future Med. Chem. 2013. V. 5. № 4. P. 451.

32. *Garg J., Feng Y.X., Jansen S.R. et al.* Catecholamines facilitate VEGF-dependent angiogenesis via β2-adrenoceptor-induced Epac1 and PKA activation // Oncotarget. 2017. V. 8. № 27. P. 44732.

33. *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. V. 35. P. 118.

34. *Kato Y., Yokoyama U., Yanai C. et al.* Epac1 Deficiency Attenuated Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointimal Formation // Arterioscler. Thromb Vasc. Biol. 2015. V. 35. № 12. P. 2617.

35. *Cullere X., Shaw S.K., Andersson L. et al.* Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase // Blood. 2005. V. 105. № 5. P. 1950.

36. *Rodrigues S.F., Granger D.N.* Blood cells and endothelial barrier function // Tissue Barriers. 2015. V. 3. № 1–2. e978720.

37. *Sayner S.L., Alexeyev M., Dessauer C.W., Stevens T.* Soluble adenylyl cyclase reveals the significance of cAMP compartmentation on pulmonary microvascular endothelial cell barrier // Circ. Res. 2006. V. 98. № 5. P. 675.

38. *Pannekoek W.J., Post A., Bos J.L.* Rap1 signaling in endothelial barrier control // Cell Adh. Migr. 2014. V. 8. № 2. P. 100.

39. *Béraud-Dufour S., Gautier R., Albiges-Rizo C. et al.* Interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1 // FEBS J. 2007. V. 274. № 21. P. 5518.

40. *Sehrawat S., Ernandez T., Cullere X. et al.* AKAP9 regulation of microtubule dynamics promotes Epac1-induced endothelial barrier properties // Blood. 2011. V. 117. № 2. P. 708.

41. *Post A., Pannekoek W.J., Ponsioen B. et al.* Rap1 Spatially Controls ArhGAP29 To Inhibit Rho Signaling during Endothelial Barrier Regulation // Mol. Cell Biol. 2015. V. 35. № 14. P. 2495.

42. *Parnell E., Smith B.O., Palmer T.M. et al.* Regulation of the inflammatory response of vascular endothelial cells by EPAC1 // Br. J. Pharmacol. 2012. V. 166. № 2. P. 434.

43. *Sands W.A., Woolson H.D., Milne G.R. et al.* Exchange protein activated by cyclic AMP (Epac)-mediated induction of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) in vascular endothelial cells // Mol. Cell Biol. 2006. V. 26. № 17. P. 6333.

44. *Vestweber D.* VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation // Arterioscler. Thromb Vasc. Biol. 2008. V. 28. № 2. P. 223.

45. *Kooistra M.R., Corada M., Dejana E., Bos J.L.* Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin // FEBS Lett. 2005. V. 579. № 22. P. 4966.

46. *Rampersad S.N., Ovens J.D., Huston E. et al.* Cyclic AMP phosphodiesterase 4D (PDE4D) Tethers EPAC1 in a vascular endothelial cadherin (VE-Cad)-based signaling complex and controls cAMP-mediated vascular permeability // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 44. P. 33614.

47. *Korayem A.H., Mujica P.E., Aramoto H. et al.* Endothelial cAMP deactivates ischemia-reperfusion-induced microvascular hyperpermeability via Rap1-mediated mechanisms // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2017. V. 313. № 1. P. H179.

48. *Kopperud R.K., Rygh C.B., Karlsen T.V. et al.* Increased microvascular permeability in mice lacking Epac1 (Rapgef3) // Acta Physiol. (Oxf). 2017. V. 219. № 2. P. 441.

49. *Birukova A.A., Zagranichnaya T., Fu P. et al.* Prostaglandins PGE(2) and PGI(2) promote endothelial enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation // Exp. Cell Res. 2007. V. 313. № 11. P. 2504.

50. *Hong J., Doebele R.C., Lingen M.W. et al.* Anthrax edema toxin inhibits endothelial cell chemotaxis via Epac and Rap1 // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 27. P. 19781.

51. *Doebele R.C., Schulze-Hoepfner F.T., Hong J. et al.* A novel interplay between Epac/Rap1 and -activated protein kinase kinase 5/extracellular signal-regulated kinase 5 (MEK5/ERK5) regulates thrombospondin to control angiogenesis // Blood. 2009. V. 114. № 20. P. 4592.

52. *Amano H., Ando K., Minamida S. et al.* Adenylate cyclase/protein kinase A signaling pathway enhances angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in vivo // Jpn. J. Pharmacol. 2001. V. 87. № 3. P. 181.

53. *Chrzanowska-Wodnicka M., Kraus A.E., Gale D. et al.* Defective angiogenesis, endothelial migration, prolifera-

tion, and MAPK signaling in Rap1b-deficient mice // Blood. 2008. V. 111. № 5. P. 2647.

54. *Lakshmikanthan S., Sobczak M., Chun C. et al.* Rap1 promotes VEGFR2 activation and angiogenesis by a mechanism involving integrin $\alpha v\beta_3$ // Blood. 2011. V. 118. № 7. P. 2015.

55. *Fang Y., Olah M.E.* Cyclic AMP-dependent, protein kinase A-independent activationextracellular signal-regulated kinase 1/ following adenosine receptor stimulation in human umbilical vein endothelial cells: role of exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1) // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007. V. 322. № 3. P. 1189.

56. *Namkoong S., Kim C.K., Cho Y.L. et al.* Forskolin increases angiogenesis through the coordinated crosstalkPKA-dependent VEGF expression and Epac-mediated PI3K/Akt/eNOS signaling // Cell Signal. 2009. V. 21. № 6. P. 906.

57. *Wang S., Zhang Z., Qian W. et al.* Angiogenesis and vasculogenic mimicry are inhibited by 8-Br-cAMP through activation of the cAMP/PKA pathway in colorectal cancer // Onco Targets Ther. 2018. V. 11. P. 3765.

58. *Bond M., Wu Y.J., Sala-Newby G.B., Newby A.C.* Rho GTPase, Rac1, regulates Skp2 levels, vascular smooth muscle cell proliferation, and intima formation in vitro and in vivo // Cardiovasc. Res. 2008. V. 80. № 2. P. 290.

59. *Hewer R.C., Sala-Newby G.B., Wu Y.J. et al.* PKA and Epac synergistically inhibit smooth muscle cell proliferation // J. Mol. Cell Cardiol. 2011. V. 50. № 1. P. 87.

60. *Kimura T.E., Duggirala A., Hindmarch C.C. et al.* Inhibition of Egr1 expression underlies the anti-mitogenic effects of cAMP in vascular smooth muscle cells // J. Mol. Cell Cardiol. 2014. V. 72. P. 9.

61. *Kawano Y., Yoshimura T., Kaibuchi K.* Smooth muscle contraction by small GTPase Rho // Nagoya J. Med. Sci. 2002. V. 65. № 1–2. P. 1.

62. *Lubomirov L.T., Reimann K., Metzler D. et al.* Urocortin-induced decrease in Ca^{2+} sensitivity of contraction in mouse tail arteries is attributable to cAMP-dependent dephosphorylation of MYPT1 and activation of myosin light chain phosphatase // Circ. Res. 2006. V. 98. № 9. P. 1159.

63. *Murthy K.S., Zhou H., Grider J.R., Makhlouf G.M.* Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA // Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 2003. V. 284. № 6. P. G1006.

64. *Zieba B.J., Artamonov M.V., Jin L. et al.* cAMP-responsive Rap1 exchange factor, Epac, induces smooth muscle relaxation by down-regulation of RhoA activity // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. № 19. P. 16681.

65. *Cuíñas A., García-Morales V., Viña D. et al.* Activation PKA and Epac cyclic AMP depletes intracellular stores and reduces availability for vasoconstriction // Life Sci. 2016. V. 155. P. 102.

66. *Shi Y., Chen X., Wu Z. et al.* cAMP-dependent protein kinase phosphorylation produces interdomain movement in SUR2B leading to activation of the vascular KATP channel // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 12. P. 7523.

67. *Purves G.I., Kamishima T., Davies L.M. et al.* Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP-dependent but protein kinase A-insensitive modulation of vascular ATP-sensitive potassium channels // J. Physiol. 2009. V. 587. Pt. 14. P. 3639.

68. *Roberts O.L., Kamishima T., Barrett-Jolley R. et al.* Exchange protein activated cAMP (Epac) induces vascular relaxation by activating Ca^{2+}-sensitive K^+ channels in rat mesenteric artery // J. Physiol. 2013. V. 591. № 20. P. 5107.

69. *Humphries E.S., Kamishima T., Quayle J.M., Dart C.* Calcium/calmodulin-dependent kinase 2 mediates Epac-induced spontaneous transient outward currents in rat vascular smooth muscle // J. Physiol. 2017. V. 595. № 18. P. 6147.

70. *Stott J.B., Barrese V., Greenwood I.* Kv7 Channel Activation Underpins EPAC-Dependent Relaxations of Rat Arteries // Arterioscler. Thromb Vasc. Biol. 2016. V. 36. № 12. P. 2404.

71. *García-Morales V., Cuíñas A., Elíes J., Campos-Toimil M.* PKA and Epac activation mediates cAMP-induced vasorelaxation by increasing endothelial NO production // Vascul. Pharmacol. 2014. V. 60. № 3. P. 95.

72. *Chotani M.A., Mitra S., Eid A.H. et al.* Distinct signaling pathways differentially regulate alpha2C-adrenoceptor expression: role in serum induction in human arteriolar smooth muscle cells // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005. V. 288. № 1. P. H69.

73. *Eid A.H., Chotani M.A., Mitra S. et al.* Cyclic AMP acts through Rap1 and JNK signaling to increase expression of cutaneous smooth muscle alpha2C-adrenoceptors // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2008. V. 295. № 1. P. H266.

74. *Jeyaraj S.C., Unger N.T., Eid A.H. et al.* Cyclic signaling activates RhoA to induce α(2c)-adrenoceptor translocation to the cell surface of microvascular smooth muscle cells // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2012. V. 303. № 5. P. C499.

75. *Motawea H.K., Jeyaraj S.C., Eid A.H. et al.* Cyclic signaling mediates translocationmicrovascular smooth muscle α2C-adrenoceptors through the actin-binding protein filamin-2 // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2013. V. 305. № 8. P. C829.

76. *Wang H., Robichaux W.G., Wang Z. et al.* Inhibition of Epac1 suppresses mitochondrial fission and reduces neointima formation induced by vascular injury // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 36552.

77. *Qiao J., Mei F.C., Popov V.L. et al.* Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by cAMP // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 29. P. 26581.

78. *Yokoyama U., Minamisawa S., Quan H. et al.* Epac1 is upregulated during neointima formation and promotes vascular smooth muscle cell migration // Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol. 2008. V. 295. № 4. P. H1547.

EPAC Proteins and Their Role in the Physiological and Pathological Processes in the Cardiovascular System. Part 1: The Role of EPAC Proteins in the Physiological and Pathological Processes of the Vasculature

S. A. Kryzhanovsky[a], *, T. D. Nikiforova[a], A. D. Durnev[a]

[a]*Zakusov Institute of Pharmacology, Moscow, Russia*

**E-mail: sak-538@yandex.ru*

The article contains a review of literature data on the contribution of EPAC proteins to the physiology and pathological processes of the cardiovascular system. Part 1 of the review is focused on the structure of regulatory EPAC proteins and their role in the regulation of vascular tone and permeability, angiogenesis, the proliferation of endotheliocytes and smooth myocytes and pathogenesis of vascular disorders.

Keywords: EPAC1 proteins, vascular endothelium, vascular smooth myocytes, proliferation, angiogenesis, vascular tone, intracellular signaling pathways.