ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА, 2020, том 46, № 4, с. 111–134

ОБЗОРЫ

УДК 612.821

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ Epac В ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ. ЧАСТЬ II. РОЛЬ БЕЛКОВ Epac В ФИЗИОЛОГИИ И ПАТОЛОГИИ СЕРДЦА

© 2020 г.
С. А. Крыжановский[1, *], Т. Д. Никифорова[1], М. Б. Вититнова[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 10.01.2020 г.
Принята к публикации 20.03.2020 г.

Во второй части обзора приведены современные представления о роли белков Epac в регуляции инотропной и ритмической функции сердца, межклеточного сопряжения кардиомиоцитов и их апоптоза. Подробно рассмотрен вклад белков Epac в развитие гипертрофии, фиброза и ремоделирования миокарда, а также их роль в генезе острого ишемического повреждения сердечной мышцы и нарушений сердечного ритма.

Ключевые слова: белки Epac1, белки Epac2, кардиомиоциты, инотропная и ритмическая активность, апоптоз, острая ишемия, гипертрофия, фиброз, ремоделирование, нарушение ритма сердца, внутриклеточные сигнальные пути.

DOI: 10.31857/S0131164620040074

Исторически полагали, что в кардиомиоцитах единственным эффектором cAMP является протеинкиназа A (PKA), которая, взаимодействуя с внутриклеточными мишенями, регулирует процессы, обеспечивающие поддержание сократительного статуса и ритмической активности кардиомиоцитов, их электромеханическое сопряжение и т.д. Однако после открытия в 1998 г. белков Epac стало ясно, что в кардиомиоцитах существует альтернативный, не зависимый от PKA, путь регуляции внутриклеточных сигнальных путей.

В кардиомиоцитах экспрессируются как белки Epac1, так и белки Epac2. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре кардиомицитов мышей, показано, что экспрессия белков Epac1 у взрослых животных по сравнению с новорожденными увеличивается на 42% ($p < 0.01$), тогда как белков Epac2 – в 3.7 раза ($p < 0.001$) [1]. При расчете отношения уровня экспрессии мРНК Epac1/Epac2 показано, что с возрастом в сердце происходит существенное относительное снижение экспрессии белка Epac1 ($p < 0.001$) (рис. 1), на основании чего авторы пришли к заключению, что с возрастом белки Epac2 в миокарде становятся доминирующей изоформой. В кардиомиоцитах локализация белков Epac различна, с чем во многом и связаны различия в их функциональной активности. Белки Epac1 располагаются вблизи внутренней поверхности клеточной мембраны, на мембране митохондрий, на перинуклеарной мембране и, возможно, в ядре клетки, тогда как белки Epac2 локализуются в области *Z*-линий рядом с T-трубочками, вблизи которых сосредоточено скопление цистерн саркоплазматического ретикулума (SR) [2].

Роль белков Epac в регуляции инотропной функции сердца

Известно, что инотропная функция сердца находится под контролем симпатической нервной системы. Выделившийся из пресинаптических окончаний нейромедиатор норэпинефрин активирует встроенные в клеточную мембрану кардиомиоцитов постсинаптические сопряженные с G-белком β_1-адренорецепторы, что сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации cAMP и активацией ее эффектора PKA. Активированная PKA фосфорилирует трансмембранные медленные потенциалзависимые Ca^{2+}-каналы L-типа, в результате чего в цитозоль кардиомиоцитов поступает незначительное количество так называемых триггерных внеклеточных ионов Ca^{2+}, которые инициируют конформационные изменения (активацию) Ca^{2+}-освобождающих каналов, чувствительных к рианодину

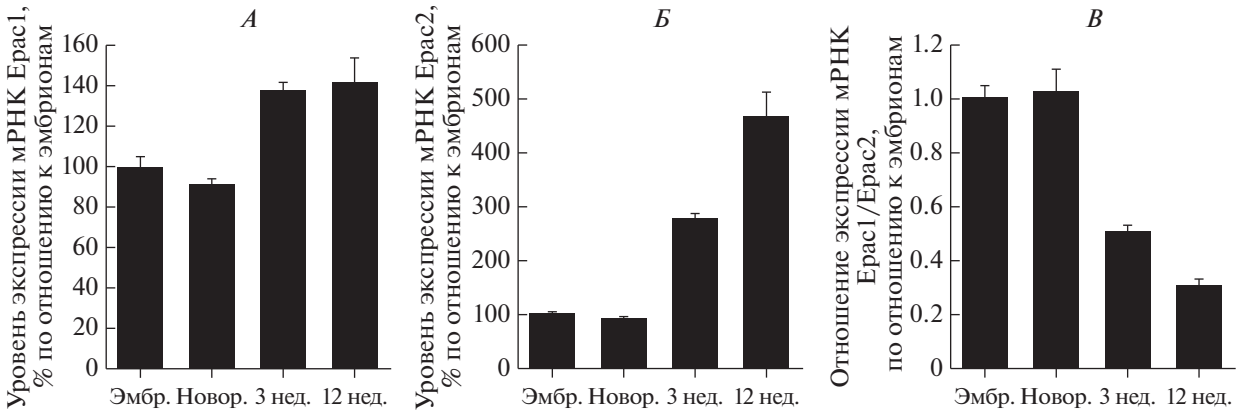

Рис. 1. Уровень экспрессии белков Epac в сердце в зависимости от возраста (по [1]). Объяснение в тексте.

(RyR2; син. рианодиновые рецепторы 2 типа), встроенных в мембрану SR и расположенных рядом с Т-трубочками. (Этот феномен в литературе обозначается аббревиатурой CICR (Calcium-induced calcium release) – инициированое ионами Ca^{2+} высвобождение ионов Ca^{2+}.) Поскольку концентрация ионов Ca^{2+} в цистернах SR на несколько порядков превышает его концентрацию в цитоплазме, ионы Ca^{2+} диффундируют во внутриклеточное пространство, в результате чего концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме увеличивается с 10^{-7} до 10^{-6}–10^{-5} М, что обеспечивает их взаимодействие с регуляторным глобулярным белком – тропонином С (TnC). Образовавшийся комплекс Ca^{2+}/TnC сдвигает фибриллярный белок тропомиозин с активного центра волокон актина, что позволяет последнему присоединиться к миозину и инициировать сокращение кардиомиоцита. Сразу же после завершения сокращения в мембране SR в результате cAMP-опосредованной активации PKA фосфорилируется ключевой регулятор расслабления кардиомиоцитов белок фосфоламбан (PLB или PLN), который активирует Ca^{2+}-зависимую АТРазу (Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase, SERCA2) – кальциевый насос SR. SERCA2 стимулирует активный транспорт ионов Ca^{2+} из цитоплазмы в цистерны SR, где он связывается белком кальсеквестрином. По окончании работы кальциевого насоса SR концентрация ионов Ca^{2+} в цитозле кардиомиоцитов снижается до 10^{-8} М, а в цистернах SR возрастает до 10^{-3} М. Помимо этого PKA, фосфорилируя нити актина, снижает их чувствительность к ионам Ca^{2+} и тем самым способствует расслаблению кардиомиоцитов – лузитропный эффект PKA.

В экспериментах *in vitro*, выполненных на изолированных кардиомиоцитах желудочков взрослых крыс, показано, что активация белков Epac селективным агонистом 8-CPT не влияла ни на триггерный входящий кальциевый ток (I_{Ca}), протекающий через трансмембранные Ca^{2+}-каналы L-типа (т.е. не инициирует CICR), ни на продолжительность потенциала действия кардиомиоцитов [3]. Однако в этих экспериментах было показано, что активированные 8-CPT белки Epac инициируют выброс ионов Ca^{2+} из SR посредством фосфорилирования RyR2 (Ryanodine receptor 2) по Ser^{2815}. Посредником в передаче сигнала с белков Epac на RyR2 служит цитозольная Ca^{2+}/кальмодулин-зависимая протеикиназа II (CaMKIIß), поскольку ее блокада селективным ингибитором KN-93 препятствовала фосфорилированию RyR2 и выбросу ионов Ca^{2+} из SR. Также в этом исследовании было показано, что блокада PKA ее эндогенным ингибитором PKI не влияет на Epac-опосредованное фосфорилирование RyR2. Таким образом, авторы этого исследования показали, что белки Epac могут, не зависимо от PKA, инициировать сокращение кардиомиоцитов. В экспериментах *in vitro*, выполненных на изолированных кардиомиоцитах желудочков взрослых мышей, показано, что белки Epac инициируют выброс ионов Ca^{2+} из SR посредством активации Epac/Rap1/фосфолипаза Cє (PLCє) сигнального пути [4]. Авторы продемонстрировали, что PLCє необходима для Epac-опосредованного выброса ионов Ca^{2+} из SR, поскольку ее блокада селективным ингибитором U73122 ингибировала высвобождение ионов Ca^{2+} в цитозоль кардиомиоцитов. Также в этом исследовании было показано, что блокада PKA ее ингибиторами (Rp-cAMPs, 8-Br-Rp-cAMPs и/или H89) не влияет на Epac-опосредованный выброс ионов Ca^{2+} из SR. Несколько позже эти же авторы показали, что активация Epac/Rap1/PLCє сигнального каскада влечет за собой активацию протеинкиназы С эпсилон (PKCє) и последующее фосфорилирование

(активацию) CaMKIIß по Thr^{286} и, как следствие этого, активацию RyR2 [5]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на изолированных кардиомиоцитах желудочков взрослых крыс, было продемонстрировано, что белки Epac, вне зависимости от влияния на функциональную активность SR, могут стимулировать сократительный ответ кардиомиоцитов [6]. Показано, что активация белков Epac1 селективным агонистом 8-CPT уже с 1-ой мин сопровождалась уменьшением длины (сокращением) и увеличением силы сокращения миофиламентов ($p < 0.05$) кардиомицитов, которое достигало плато через 5 мин после внесения в культуру клеток 8-CPT, тогда как активация PKA ее агонистом – Bnz-cAMP приводила к уменьшению силы сокращения. Авторы исследования пришли к заключению о том, что белки Epac и PKA оказывают противоположное действие на Ca^{2+}-опосредованную силу сокращения миофиламентов и их чувствительность к ионам Ca^{2+}. В том же исследовании было показано, что повышение чувствительности миофиламентов к ионам Ca^{2+} связано со способностью регуляторных белков Epac фосфорилировать (активировать) тропонин I (TnI) и сердечный миозин-связывающий белок C (myosin-binding protein C, cardiac-type, cMyBP-C); последний фосфорилируется по Ser^{282}. Фосфорилирование TnI и cMyBP-C не связано с активацией белком Epac малой GTFазы Rap1 и происходит просредством активации сопряженного с Epac не выявленного эффектора, который активирует сопряженный с белком Epac PLCє/PKCє/CaMKIIß сигнальный каскад. Помимо этого показано, что Epac-опосредованное фосфорилирование cMyBP-C происходит не зависимо от PKA. В экспериментах *in vitro*, выполненных на изолированных кардиомиоцитах желудочков взрослых крыс, определяли влияние белков Epac на внутриклеточную ($[Ca^{2+}]i$) и ядерную ($[Ca^{2+}]n$) концентрацию ионов Ca^{2+} [7]. Показано, что активация белков Epac селективным агонистом 8-CPT сопровождается снижением пиковой систолической и увеличением диастолической ($[Ca^{2+}]i$), тогда как в ядре кардиомиоцитов увеличивается систолическая и диастолическая ($[Ca^{2+}]n$). Авторы исследования показали, что Epac-опосредованная модуляция концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле связана с активацией PLC/инозитол 1,3,5-трифосфат (IP_3)/CaMKII сигнального каскада, поскольку ингибирование PLC – U73122, или IP_3 – 2-APB, или CaMKII – KN-93 блокировало модулирующее действие белков Epac. Аналогичным образом происходит модуляция концентрации ионов Ca^{2+} в ядре кардиомиоцитов, однако этот сигнальный путь может быть короче, поскольку IP_3 может влиять на ядерную концентрацию ионов Ca^{2+} посредством активации встроенных в ядерную мембрану IP_3-рецепторов (IP_3R). Также в этом исследовании было показано, что Epac-опосредованная активация ядерных IP_3R и CaMKII могут индуцировать транслокацию в ядро клетки гистондеацетилазы 5 (Histone deacetylase 5, HDAC5) – белка, обладающего функцией транскрипционного репрессора, регулирующего в частности рост/гипертрофию кардиомиоцитов, с последующей активацией прогипертрофического транскрипционного фактора усиления миоцитов 2 (myocyte enhancer factor 2, MEF2) [7]. В экспериментах *in vitro,* выполненных на изолированных сегментах миокарда желудочков мышей, показано, что базальная сила сокращений полоски миокарда, взятой у нокаутных по белкам Epac1 мышей, была значительно меньше чем у интактных, соответственно 73 ± 7.1 и 112 ± 14.7 мг/мм^2 ($p < 0.05$) [8]. Далее было показано, что если величина инотропного ответа на неселективный β-адреностимулятор изопротеренол была одинакова в обеих группах, то продолжительность последующей за сокращением релаксации полоски миокарда, полученной от нокаутных мышей, была значимо больше – соответственно 54 ± 1.5 и 61 ± 2.0 мс ($p < 0.05$). Изучение механизмов, лежащих в основе увеличения периода релаксации, продолжили в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре клеток кардиомиоцитов взрослых мышей, в которых было показано, что как PKA, так и белки Epac1 регулируют процессы релаксации кардиомиоцитов просредством активации белка фосфоламбана (PLN), фосфорилируя его по Ser^{16}. Однако, если при активации PKA селективным агонистом 6-Bnz-cAMP фофорилировалось 40% от общего PLN, то при активации белков Epac1 8-CPT – 60% PLN. Epac1-опосредованное фосфорилирирование PLN происходит путем активации PLC/PKCє/CaMKII сигнального каскада (рис. 2). На основании полученных данных авторы сделали заключение о том, что лузитропное (релаксирующее) действие PKA и белков Epac1 является аддитивным, однако последним принадлежит ведущая роль. Не менее важным результатом этого исследования является то, что в кардиомиоцитах, полученных от нокаутных по белкам Epac1 и интактных мышей, интенсивность активированного изопротеренолом I_{Ca}, протекающего через медленные трансмембранные потенциалзависимые Ca^{2+}-каналы L-типа, одинакова, что свидетельствует о том, что инотропное/лузитропное действие белков Epac, в отличие от PKA, не реализуется по CICR пути. В этом же исследовании продемонстрировано, что в кардиомиоцитах, полученных от нокаутных по белкам Epac1 животных, в цитозоле базальная и пиковая концентрация значимо ($p < 0.01$) ниже, чем у интактных – соответственно 99 ± 11.8 против 139 ± 6.8 нМ и 559 ± 33.2 против 883 ± 35.3 нМ.

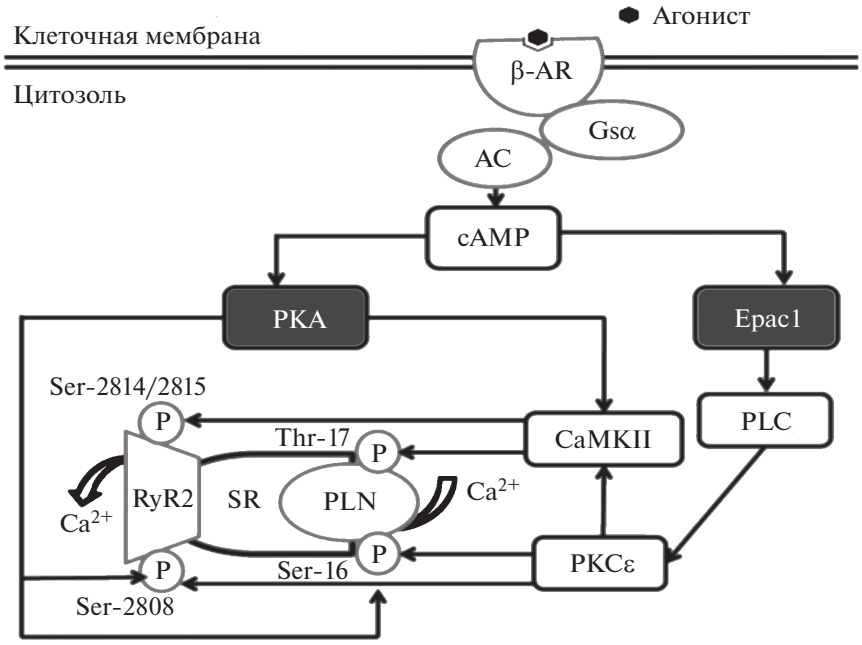

Рис. 2. Схематическое отображение Epac- и PKA-опосредованной регуляции инотропной функции сердца (по [8]). Объяснение в тексте.

Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в экспериментах *in vivo* и свидетельствующими о том, что у нокаутных по белкам Epac1 фракция выброса левого желудочка сердца, характеризующая его инотропную функцию, значимо ($p < 0.01$) ниже [8].

Таким образом, подводя итог выше изложенному, можно говорить о том, что инотропное/лузитропное действие белков Epac, в отличие от PKA, не связано с CICR и в нормальных физиологических условиях реализуется следующими путями: в результате активации катехоламинами β_1-адренорецепторов и сопряженного с ними Gs-белка активируется аденилациклаза, которая инициирует синтез cAMP и последующую активацию белков Epac. Далее события разворачиваются по следующим направлениям: белки Epac активируют локализованную на внутренней поверхности клеточной мембраны PLCє, которая гидролизует мембранный фосфолипид – фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат (phosphatidylinositol, PIP2), в результате чего образуется диацилглицерол (DAG) и IP3. Затем IP3 активирует IP3-R, что приводит к высвобождению из SR незначительного количества ионов Ca^{2+}, которые сенсибилизируют RyR2 и активируют CaMKIIß, что приводит к фосфорилированию RyR2 и последующему выбросу ионов Ca^{2+} из цистерн SR. Параллельно с этим CaMKIIß при участии PKC фосфорилирует тропонин I (TnI) и миозин-связывающий белок C (MyBP-C), в результате чего повышается чувствительность миофиламентов к ионам Ca^{2+}, что на фоне резкого увеличения концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме инициирует сокращение кардимиоцитов, в реализации которого принимают участие Ca^{2+}-связывающий белок кальмодулин (CaM) и Ca^{2+}-зависимая серин-треонин фосфатаза – кальциневрин (Cn) [9]. В момент достижения пика сокращения CaMKIIß фосфорилирует PLN, который активирует Ca^{2+}-зависимую АТРазу (SERCA2), стимулирующую активный обратный транспорт ионов Ca^{2+} из цитоплазмы в цистерны SR и последующее расслабление кардиомиоцитов. Помимо этого, локализованная на ядерной мембране PLCє активирует IP3, который, в свою очередь, активирует ядерные IP_3-Rn, в результате чего возрастает внутриядерная концентрация ионов Ca^{2+}, приводящая к активации и ядерной CaMKIIn, которая, в свою очередь, активирует HDAC5/MEF2 сигнальный каскад. Следует отметить, что в настоящее время физиологическая роль Epac-опосредованной активации PLCє/IP_3-Rn/CaMKIIn/HDAC5/MEF2 сигнального каскада остается не ясной. Также остается дискутабельным и вопрос о вкладе той или иной изоформы белка Epac в регуляцию инотропной функции сердца, однако большинство исследователей склонны полагать, что в физиологических условиях сократительную функцию кардиомиоцитов регулируют PKA и белки Epac1 [8, 10].

Роль белков Epac в регуляции межклеточного сопряжения кардиомиоцитов

Нексусы или щелевые контакты (*gap junction*, GJ) обеспечивают электрическое и химическое сопряжение кардиомиоциов. Нексус состоит из кластеров каналов, каждый из которых представлен парой коннексонов – политопных интегральных мембранных белков, расположенных напротив друг друга в мембранах соседних клеток. Коннексоны 4 раза пересекают мембрану и состоят из двух внеклеточных петель (EL-1 и EL-2) и цитоплазматической петли (CL). Каждый коннексон образован 6 молекулами белков – коннексинов (Cx), расположенных гексагонально вокруг центрального гидрофильного канала, шесть белковых коннексиновых субъединиц которого сгруппированы вокруг гидрофильной поры, пронизывающей мембрану, и образуют коннексон. Два полуканала соседних клеток, расположенные напротив друг друга, соединяются и образуют непрерывный межклеточный канал. В кардиомиоцитах идентифицированы три изоформы Cx – Cx40, Cx43 и Cx45. Коннексины Cx43, которые играют основную роль в межклеточной коммуникации, преимущественно представлены в нексусах сократительных кардиомицитов желудочков, а Cx40 и Cx45 – в проводящих кардиомиоцитах. Нарушение функциональной активности GJ влечет за собой сократительную дисфункцию и инициирует нарушение ритма сердечных сокращений.

Еще в конце XX века было описано, что cAMP регулирует экспрессию в миокарде коннексинов Cx43 и Cx45 [11]. Позднее в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре неонатальных кардиомицитов крыс, показали, что экспрессия коннексинов Cx43 регулируется cAMP/Rap1 сигнальным каскадом [12]. Помимо этого, в экспериментах, выполненных на неонатальных кардиомицитах крыс, показали, что добавление в культуру клеток неселективного β-адреностимулятора изопротеренола инициирует PKA-опосредованную экспрессию коннексинов Cx43 [13]. Однако в экспериментах *in vitro*, также выполненных на культуре клеток неонатальных кардиомицитов крыс – NRCMs, было продемонстрировано, что блокада PKA селективным ингибитором H89 уменьшала, но не подавляла cAMP-опосредованную экспрессию коннексинов Cx43 [14]. Далее было показано, что 8-CPT-инициированная активация сигнального каскада Epac/Rap1 сопровождается накоплением коннексинов Cx43 в области GJ. При этом увеличение экспрессии коннексинов Cx43 на фоне активации 8-CPT каскада Epac/Rap1 было значимо больше ($p < 0.05$), чем при активации PKA ее агонистом – 6 Bnz-cAMP. Авторы этого исследования делают вывод о том, что белки Epac преимущественно увеличивают экспрессию коннексинов Cx43, тогда как PKA облегчает/увеличивает проводимость GJ без существенного влияния на продукцию коннексинов Cx43. Аналогичные выводы были сделаны на основании и более поздних эксперименов *in vivo* [15]. Также отмечалось, что белки Epac инициируют образование *de novo* GJ, активируя N-кадгерин-опосредованное формирование якорных межклеточных контактов, ассоциированных с микрофиламентами (*adherens junctions*, AJ) [14]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре клеток неонатальных кардиомицитов крыс – NNRCM, показано, что инициированное неселективным β-адреностимулятором изопротеренолом фосфорилирование (активация) коннексинов Cx43 осуществляется посредством активации cAMP/Epac1/PKCε сигнального каскада, поскольку блокада активируемого изопротеренолом cAMP/PKA сигнального каскада эндогенным ингибитором PKA – PKI не предотвращала фосфорилирование коннексинов Cx43 [16]. Авторы этого исследования пришли к заключению, что фосфорилирование коннексинов Cx43 кардиомиоцитов связано с cAMP-опосредованной активацией белков Epac1, тогда как вклад PKA в этот процесс незначителен.

Таким образом, имеющиеся в настоящее времени данные позволяют заключить, что в физиологических условиях в кардиомиоцитах белки Epac1 не зависимо от PKA инициируют экспрессию играющих ключевую роль в межклеточной коммуникации коннексинов Cx43 и тем самым оптимизируют электрическое и химическое сопряжение клеток сердца. Этот эффект белков Epac1 реализуется посредством активации катехоламинами cAMP/Epac1/PLCε/PIP2/DAG/PKCε сигнального каскада, а также N-кадгерин-опосредованного формирования AJ (рис. 3).

Роль белков Epac в регуляции процессов апоптоза

Еще в конце XX века было показано, что хроническая (в течение 24 ч) стимуляция интактных кардиомиоцитов неселективным β-адреностимулятором изопротеренолом вызывает апоптоз кардиомиоцитов просредством активации PKA [17]. Впоследствие результаты этого исследования были подтверждены в эксперитментах *in vitro* и *in vivo*, в которых было показано, что апоптоз кардиомицитов, инициируемый PKA, ассоциируется с активацией β_1-адренорецепторов, тогда как сопряженные с β_2- и β_3-адренорецепторами сигнальные каскады имеют антиапоптотическую направленность [18]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на клеточной культуре эмбриональных (H9c2) и неонатальных (NRCMs) кардиомицитов крыс, 8-CPT-опосредованная активация белков Epac подавляла NO-индуцированный апоптоз просредством активации Epac/Rap1/RAC-α-серин-треонин-протеинкиназа (RAC-α serine-thre-

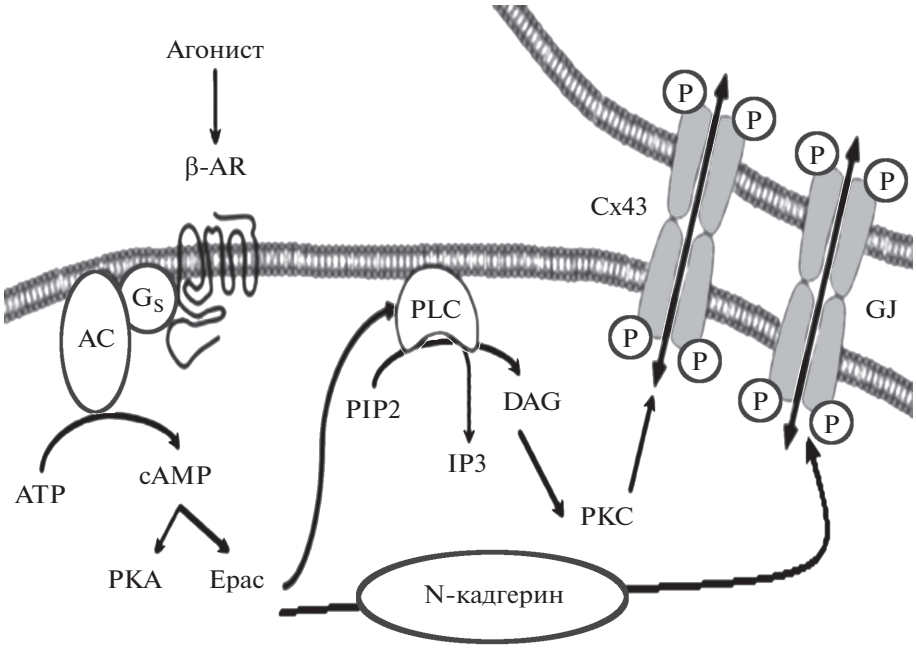

Рис. 3. Схематическое отображение роли белков Epac в регуляции электрического и химического сопряжения клеток сердца (по [15]).
Объяснение в тексте.

onine-protein kinase, Akt; син. протеинкиназа B, PKB) сигнального каскада [19]. Эти результаты были подтверждены в экспериментах *in vitro*, выполненных на клеточной культуре эмбриональных кардиомиоцитов – H9c2, в которых 8-CPT-опосредованная активация белков Epac1 ингибировала апоптоз, инициированный гипергликемией и активными формами кислорода (ROS) в результате активации Epac1/фосфоинозитид-3-киназа (phosphoinositide 3-kinases; PI3K)/Akt сигнального пути [20]. Также в этом исследовании было показано, что Epac1-опосредованная активация Akt происходит за счет ее фосфорилирования по Ser^{473}. В экспериментах *in vitro*, выполненных на клеточной культуре неонатальных кардиомицитов крыс, у которых апоптоз вызывали 24-часовой инкубацией кардимиоцитов с H_2O_2, в сравнительном аспекте были изучены механизмы, лежащие в основе антиапоптотического действия PKA и белков Epac1 [21]. На первом этапе исследования отмечалось, что в условиях оксидативного стресса активация рецепторов глюкагон-подобного пептида-1 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1; син. энтероглюкагон) – GLP-1R селективным агонистом exendin-4 подавляет апоптоз и оказывает антиоксидантное действие. Эти эффекты GLP-1R реализуются путем активации аденилатциклаза (AC)/cAMP сигнального пути, поскольку ингибирование AC ее селективным антагонистом дидезоксиаденозином – ddA блокирует антиапоптотическое и антиоксидантное действие exendin-4. Аналогичные результаты были получены при внесении в культуру клеток эндогенного супрессора белков Epac1 – siRNAs, что позволило авторам сделать заключение о том, что антиапоптотическое и антиоксидантное действие exendin-4 реализуется просредством активации cAMP/Epac1 сигнального каскада. Это заключение было подтверждено и в экспериментах, в которых 8-CPT-опосредованная активация белков Epac1 в подвергнутых оксидативному стрессу кардиомиоцитах сопровождалась подавлением образования ROS и апоптоза. Далее было показано, что антиапоптотическое действие белков Epac1 связано с активацией Epac1/Rap/PLCє/PKCє сигнального каскада и последующим ингибированием каспазы 3, а также увеличением экспрессии антиапоптотического белка B клеточной лимфомы 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2), а Epac1-опосредованное антиоксидантное действие связано с увеличением производства таких эндогенных антиоксидантов как каталаза, глутатион пероксидаза-1 (GPx-1) и марганец-содержащая супероксиддисмутаза (Mn-SOD) (рис. 4). В этих же экспериментах отмечали, что PKA не влияет на экспрессию эндогенных антиоксидантов, однако обладает антиапоптотической активностью, которая реализуется по не зависимому от белков Epac1 сигнальному каскаду – PKA/CREB (cAMP response element-binding protein – CREB) (рис. 4). В экспериментах *in vitro*, также выполненных на клеточной культуре неонатальных кардиомицитов крыс, были подтверждены выше приведенные данные о том, что ак-

тивация cAMP/Epac1/Rap1 сигнального пути подавляет апоптоз кардиомиоцитов посредством увеличения экспрессии Bcl-2 и подавления активности каспазы 3 [22]. Вместе с этим, в этой работе было продемонстрировано, что активация в кардиомиоцитах cAMP/PKA/CREB сигнального каскада не влияет на интенсивность процессов апоптоза, а скорее всего, регулирует их инотропную функцию. В экспериментах *in vitro*, выполненных на митохондриях, выделенных из кардиомиоцитов взрослых крыс, был изучен вклад митохондриальных белков Epac в регуляцию апоптоза [23]. Известно, что в митохондриях экспрессируется растворимая изоформа аденилатциклазы – sAC, которая в отличие от аденилатциклазы, расположенной на внутренней поверхности клеточной мембраны – tmACs, не активируется G-белками и форсколином, но может быть активирована гидрокарбонатом HCO_3^- и/или ионами Ca^{2+} [24, 25]. В кардиомиоцитах взрослых крыс экспрессируется так называемая усеченная изоформа sAC – sAC_t [23]. В условиях патологии гиперактивация sAC инициирует митохондрия-опосредованный апоптоз [26]. В основе этого процесса лежит активация потенциалзависимого Ca^{2+}-канала внутренней мембраны митохондрий (mitochondrial calcium uniporter, MCU), который транспортирует ионы Ca^{2+} через внутреннюю митохондриальную мембрану к митохондриальному матриксу. Далее поступившие ионы Ca^{2+} инициируют открытие поры, изменяющей проницаемость мембраны митохондрий (mitochondrial permeability transition Pore, mPTP), состоящей из потенциалзависимого анионного канала (VDAC) и ADP/ATP-антипортера. Длительное открытие mPTP сопровождается перегрузкой митохондрий ионами Ca^{2+}, диссипацией ее мембранного потенциала (Δd) и, как следствие этого, резким увеличением митохондриальной проницаемости (mitochondrial permeability transition, MPT). На первом этапе исследований было показано, что HCO_3^--опосредованная активация sAC_t, но не активация tmACs форсколином, сопровождается увеличением экспрессии cAMP в митохондриях. Затем было показано, что cAMP-опосредованная активация митохондриальных белков Epac1 стимулировала процессы окислительного фосфорилирования и увеличивала продукцию ATP (рис. 5) даже в присутствии высоких концентраций ионов Ca^{2+}. В этих условиях блокада белков Epac1 их селективным антагонистом CE3F4, но не блокада белков Epac2 селективным антагонистом ESI-05, сопровождалась активацией MCU и последующим увеличением MPT (рис. 5). Также в этом исследовании было показно, что PKA, в отличие от белков Epac1, не принимает участие в регуляции MPT. На основании полученных данных авторы делают заключение о том, что HCO_3^-/Ca^{2+}-опосредованная активация sAC_t/cAMP/Epac1 сигнального каскада, оптимизируя митохондриальный метаболизм, препятствует дестабилизации MPT и тем самым оказывает антиапоптотическое действие. В модельных экспериментах *in vitro*, выполненных на выделенных из сердец взрослых крыс кардиомиоцитах, были изучены механизмы кардиопротективного действия пептида урокортин-1 (Ucn-1), который реализует свои протективные эффекты, активируя cAMP [27]. Перед началом исследования кардиомиоциты подвергали 30-минутной ишемии, затем 18-часовой реперфузии. Отмечалось, что Ucn-1, в частности, реализует свои кардиопротективные эффекты путем активации cAMP/Epac2 сигнального каскада, сопровождающейся увеличением экспрессии X-связанного ингибитора белков апоптоза (X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP; син. IAP3) и подавлением экспрессии проапоптотического белка BAD. В случае блокады белков Epac2 их селективным антагонистом ESI-05 не было отмечено увеличения экспрессии XIAP и уменьшения экспрессии BAD.

Таким образом, имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что активация локализованных в цитозоле кардиомиоцитов белков Epac1 подавляет NO-и ROS-индуцированный апоптоз посредством активации Epac1/PLCϵ/PIP2/DAG/PKCϵ сигнального каскада (рис. 4), тогда как митохондриальные белки Epac1 реализуют свои антиапоптотические эффекты посредством ингибирования MCU, что препятствует дестабилизации MPT (рис. 5). Антиапототическое действие также продемонстрировано и для белков Epac2, которые в условиях ишемия/реперфузия инициируют увеличение экспрессии антиапоптотического белка XIAP и подавляют экспрессию проапоптотического белка BAD.

Вместе с тем, следует отметить, что в 2017 г. были опубликованы результаты исследования, в котором корейские ученные на основе результата анализа 134 публикаций, используя нормированные обыкновенные дифференциальные уравнения, построили математическую модель сети сигнальных путей в клетке, согласно которой были выделены 5 наиболее важных контекстно-независимых взаимодействий, регулирующих апоптоз и гипертрофию, одним из которых являлся Epac/CaMKII сигнальный каскад [28]. Однако из текста статьи не ясно, что инициирует в кардиомиоцитах Epac/CaMKII сигнальный каскад – апоптоз или гипертрофию.

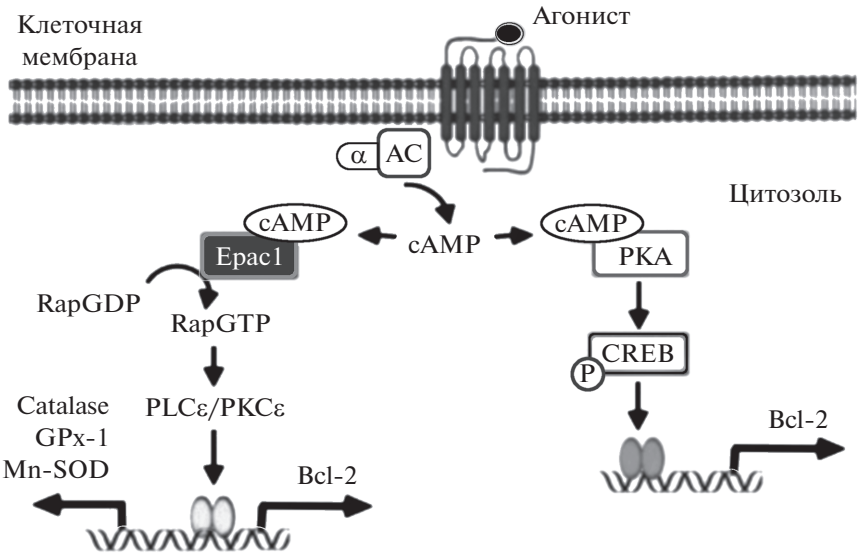

Рис. 4. Схематическое отображение Epac- и PKA-опосредованной регуляции апоптоза кардиомиоцитов (по [21]). Объяснение в тексте.

Роль белков Epac в развитии гипертрофии и ремоделирования миокарда

Роль симпатической нервной системы в формировании гипертрофии/ремоделирования миокарда была достаточно подробно изучена еще в 80–90 гг. XX века [29, 30]. Однако, уже начиная с 2000 г. стали появляться сообщения о том, что гипертрофия кардиомиоцитов не связана с активацией β-адренорецептор/cAMP/PKA сигнального каскада [31, 32], а реализуется независимо от PKA путем активации CaMKIIδ и/или CaMKIIγ [33]. В 2005 г. впервые было продемонстрировано, что активация белков Epac способствует гипертрофии кардиомиоцитов [34]. На первом этапе этого исследования было продемонстрировано, что внесение в культуру неонатальных кардиомиоцитов агониста белков Epac 8-CPT или аденовируса Ad.Epac^{WT}, инициирующего суперэкспрессию белков Epac1, приводило к двукратному увеличению площади поверхности кардиомиоцитов ($p < 0.001$) и такому же увеличению синтеза белка, что, по мнению авторов, “придает кардиомиоцитам все признаки гипертрофированного фенотипа”. 8-CPT-опосредованная активация белков Epac или инициация их суперэкспрессии Ad.Epac^{WT} стимулирует продукцию/активность прогипертрофического ядерного транскрипционного фактора NF-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Активация NF-kB белками Epac опосредуется кальций/кальмодулин-зависимой серин/треонин фосфатазой – кальциневрином (CaN), поскольку фармакологическая блокада CaN его ингибитором циклоспорином A препятствует экспрессии NF-kB. При изучении уровня экспрессии белков Epac1 и Epac2 в биоптатах тканей, полученных из сердец мышей, у которых гипертрофию миокарда вызывали коарктацией аорты, было показано, что по сравнению с интактными животными в них значимо ($p < 0.05$) увеличивается только экспрессия мРНК белков Epac1, тогда как уровень экспрессии мРНК белков Epac2 не изменяется [1]. Аналогичные результаты были получены и при изучении экспрессии белков Epac в миокарде человека. Биоптаты

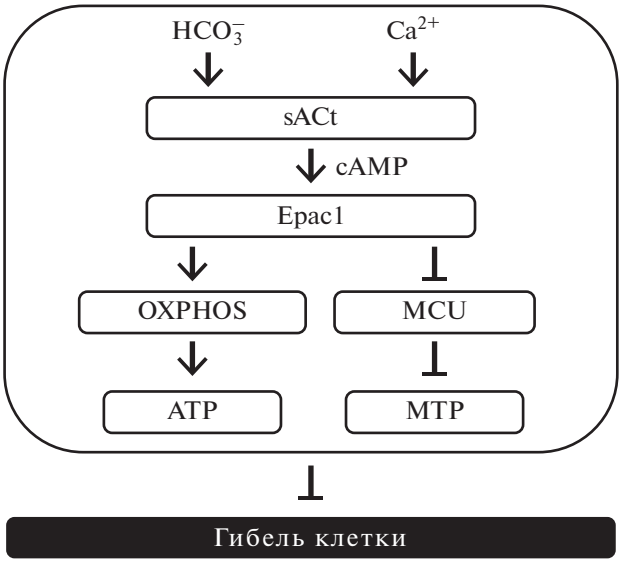

Рис. 5. Схематическое отображение роли митохондриальных белков Epac в регуляции продукции ATP и препятствии дестабилизации MPT (по [23]). Объяснение в тексте.

миокарда левого желудочка человека получали из изъятых при трансплантации сердец пациентов, страдающих IV классом хронической сердечной недостаточности (ХСН) по NYHA (средняя величина фракции выброса предтрансплантата левого желудочка 22 ± 4%), не получавших инотропной поддержки, по крайней мере, в течение 7 дней перед трансплантацией. У этих пациентов, по сравнению с не страдающими ХСН, экспрессия мРНК белков Epac1 в 2 раза выше ($p < 0.05$), тогда как экспрессия мРНК белков Epac2 не изменена [35] (рис. 6). Эти данные были подтверждены и при изучении вклада белков Epac в развитие гипертрофии миокарда, вызванной радиотерапией у онкологических больных [36]. В выше упомянутом исследовании, выполненном на животных с коарктацией аорты, также отмечалось, что параллельно с экспрессией мРНК белка Epac1 увеличивается и экспрессия мРНК малых GTPаз Rap1A и Rap2A [1]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре кардиомиоцитов мышей, полученных как у интактных, так и у перенесших за 5 дней до взятия клеток коарктацию грудного отдела аорты (гипертрофированные клетки) животных, показано, что у последних экспрессия белков Epac1 значимо ($p < 0.01$) выше [35]. Внесение в культуру клеток интактных и оперированных животных агониста белков Epac – 8-CPT инициировал рост как интактных, так и гипертрофированных кардиомиоцитов, однако рост кардиомиоцитов, полученных от мышей с коарктацией аорты, был значимо больше ($p < 0.01$). Эти результаты напрямую коррелируют с данными, полученными в ранее цитируемых исследованиях, однако, если в них сообщалось, что гипертрофия кардиомиоцитов реализуется посредством активации Epac1/Rap сигнального каскада, то в последней работе инициированная белками Epac1 гипертрофия кардиомиоцитов опосредуется малыми GTPазами Ras, поскольку ингибирование Ras блокировало гипертрофическое действие белков Epac1, а ингибирование GTPаз Rap на него не влияло. Далее в этом исследовании было показано, что 8-CPT-опосредованная активация Epac1/Ras сигнального прогипертрофического каскада инициирует последовательную активацию Ca^{2+}-чувствительных белков CaN и CaMKII. Впоследствие эти же авторы подробно изучили вклад малой GTPазы Ras в Epac1-опосредованную гипертрофию кардиомиоцитов [37]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре неонатальных кардиомиоцитов, отмечалось, что активация белков Epac их агонистом или же инициация их экспрессии аденовирусом $Ad.Epac^{WT}$ сопровождалась быстрой активацией GTP-азы H-Ras (син. преобразователь белка p21), которая, как известно, является одной из ключевых малых GTPаз, индуцирующих гипертрофию миокарда [38]. Аналогичные результаты были получены и при внесении в клеточную среду конститутивно активированной формы Epac1 – $Ad.Epac^{\Delta cAMP}$. Степень активации H-Ras, инициированой селективными агонистами белков Epac1, не отличалась от таковой, вызванной катехоламинами (норэпинефрин). Также было показано, что доминантная негативная форма GTPазы H-Ras – Ras^{S17N}, внесенная в клеточную культуру, препятствовала реализации прогипертрофического действия $Ad.Epac^{WT}$, что также подтверждает данные о ключевой роли GTPазы H-Ras в Epac-опосредованной гипертрофии кардиомиоцитов. На следующем этапе исследований было показано, что белки Epac1 активируют GTPазы H-Ras посредством их взаимодействия с C-концевым каталитическим доменом CDC25, тогда как белки Epac, лишенные домена CDC25 – $Epac^{\Delta Cdc25}$, теряли способность активировать H-Ras. Поскольку известно, что нижестоящим эффектором белков Epac1 является фосфолипаза C (PLC), инициирующая гидролиз расположенного на внутренней поверхности клеточной мембраны фосфолипида PIP2, сопровождающийся образованием инозитол 1,4,5-трисфосфата (IP3) и диацилглицерола (DAG), а последний активирует протеинкиназу C (PKC), которая способствует выходу в цитозоль кардиомиоцитов ионов Ca^{2+} из цистерн SR, активируя встроенные в его мембрану канальные IP3 рецепторы (IP3-R), был оценен вклад этого сигнального каскада в развитие гипертрофии кардиомиоцитов. Было показано, что прогипертрофическое действие белков Epac1, опосредованное их активацией 8-CPT или инициацией их суперэкспрессии $Ad.Epac^{WT}$, не реализуется в случае или блокады PLC ее фармакологическим ингибитором U73122, или ингибирования IP3-R блокатором Xestospongin C, или связывания ионов Ca^{2+} их внутриклеточным хелатором BAPTA-AM. На следующем этапе был продемонстрирован вклад Ca^{2+}-чувствительных белков CaN и CaMKIIδ в прогипертрофическое действие белков Epac1. Увеличение площади поверхности кардиомиоцитов, индуцированное аденовирусом, кодирующим конститутивно активированную форму белков Epac1 – $Ad.Epac^{\Delta cAMP}$, было блокировано или фармакологическим ингибитором CaN – CsA, или фармакологическим ингибитором CaMKII – KN-93, что свидетельствует о том, что CaN и CaMKIIδ являются следующим звеном Epac-опосредованного прогипертрофического сигнального каскада. На следующем этапе этого исследования продемонстрировали, что 8-CPT-опосредованная активация белков Epac1 инициирует фосфорилирование цитозольной CaMKIIδ, которая активирует цитоплазматический фактор транскрипции NFAT (ядерный фактор активации T-клеток, nuclear factor of activated T-cells), кото-

рый, перемещаясь в ядро клетки, связывается с элементами ответа NFAT и модулирует экспрессию прогипертрофических генов. Авторы исследования полагают, что белки Epac1, помимо цитозольной, могут активировать и ядерную CaMKIIδ, поскольку ими показано, что 8-CPT-опосредованная активация белков Epac1 инициирует экспорт из ядра клетки деацетилазы гистонов 4 (histone deacetylase, HDAC4), что сопровождается перемещением в цитозоль клетки стимулятора 1-ой стадии миогенеза – миоцит-специфического усиливающего фактора-2 (myocyte-specific enhancer factor 2, MEF-2). Известно, что HDAC4 является репрессором MEF-2, образуя с ним неактивный комплекс HDAC4/MEF-2, стабильность которого находится под контролем ядерной CaMKIIδ. Позднее это предположение было подтверждено в экспериментах *in vitro*, выполненных на кардиомиоцитах, полученных от нокаутных по Epac1 мышей [2]. В этих кардиомиоцитах, в отличие от полученных от интактных мышей, внесение в культуру клеток селективного агониста белков Epac1 – 8-[Pharos-575]-2'-O-methyladenosine-3',5'-cyclic monophosphate (Ф-O-Me-cAMP) не сопровождалось ни фосфорилированием перинуклеарной CaMKIIδ, ни ядерным экспортом HDAC и, соответственно, активацией MEF-2. Также авторы этого исследования высказали предположение, что активация Epac1-опосредованного сигнального каскада преимущественно регулирует активность перинуклеальной CaMKIIδ, тогда как активация сопряженного с белком Epac2 сигнального каскада модулирует активность цитозольной CaMKIIδ, в своем большинстве расположенной вблизи Т-трубочек. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре неонатальных кардиомиоцитов, при помощи иммуногистохимического окрашивания с использованием конфокальной микроскопии было показано, что внесение в клеточную культуру неселективного β-адреностимулятора изопротеренола вызывает быструю (1 мин) транслокацию активированной PKCε из цитозоля в перинуклеарное пространство [39]. Аналогичное действие оказывала и 8-CPT-опосредованная активация белков Epac1. При этом количество PKCε в перинуклеарной зоне, по сравнению с контролем, увеличивалось на 168 ± 23% ($p < 0.05$). Активация PKCε инициирует экспрессию фосфорилированной внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (extracellular signal-regulated kinase, pERK1/2; син. митоген-активированная протеинкиназа, MAPK) и последующую гипертрофию кардиомиоцитов, которая блокируется ингибитором белков Epac – R279K. Также в этом исследовании были подтверждены ранее полученные данные [40] о том, что изопротеренол-опосредованная гипертрофия кардиомиоцитов не связана с активацией PKA, поскольку ее блокада ингибитором PKI не влияет на прогипертрофическое действие изопротеренола. В марте 2019 г. опубликованы результаты исследования, в котором изучена возможность использования оригинального селективного антагониста белков Epac1 производного тиено[2,3-b]пиридин соединения AM-001 (3-амино-N-(4-фторфенил)-4-фенил-6-(тиофен-2-ил)тиено[2,3-b]пиридин-2-карбоксамид) для защиты сердца от катехоламинового стресса [41]. На первом этапе исследования в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре неонатальных кардиомиоцитов мыши, находящихся в условиях гипоксии/реоксигенации, отмечалось, что соединение AM-001, внесенное в клеточную культуру, блокировало вызванную активацией 8-CPT белков Epac1 гипертрофию и гибель кардиомиоцитов. Далее в острых модельных экспериментах *in vivo*, воспроизводящих ишемию/реперфузию миокарда, было показано, что соединение AM-001, введенное в/в мышам за 5 мин до реперфузии, эффективно предотвращало реперфузионное повреждение ткани сердца – если у контрольных животных площадь инфаркта составила 50 ± 3% от площади левого желудочка, то у мышей, получавших соединение AM-001 – 36 ± 3% ($p < 0.01$). На последнем этапе исследования, также выполненного в модельных экспериментах *in vivo*, была изучена возможность использования соединения AM-001 для защиты сердца от патологического ремоделирования, вызванного длительной (14 дней) инфузией изопротеренола. Соединение AM-001 вводили в/в с 3-го по 14-ый день эксперимента. Систематическая экспериментальная терапия селективным блокатором белков Epac1 соединением AM-001 эффективно препятствует ремоделированию миокарда: по сравнению с контролем у животных, получавших соединение AM-001, значимо меньше масса миокарда ($p < 0.001$), конечно-систолический и конечно-диастолический диаметр левого желудочка ($p < 0.05$), а фракция выброса (сократимость миокарда) значимо ($p < 0.01$) выше. Авторы этого исследования делают вывод о том, что селективная блокада белков Epac1 в условиях катехоламинового стресса эффективно препятствует гипертрофии/ремоделированию миокарда.

В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре неонатальных кардиомиоцитов мыши и культуре клеток HEK 293, которые, как известно, стабильно экспрессируют β_1- и β_2-адренорецепторы (β_1-AR и β_2-AR), изучали взаимосвязь между этими рецепторами и белками Epac1 [42]. На первом этапе исследования было продемонстрировано, что в покоящейся клетке белки Epac1 конститутивно взаимодействовали с β_1-AR и β_2-AR, а при их стимуляции изопротеренолом взаимодействие белков Epac1 с β_1-AR резко возрастало, тогда как с β_2-AR практически не изменялось. Если

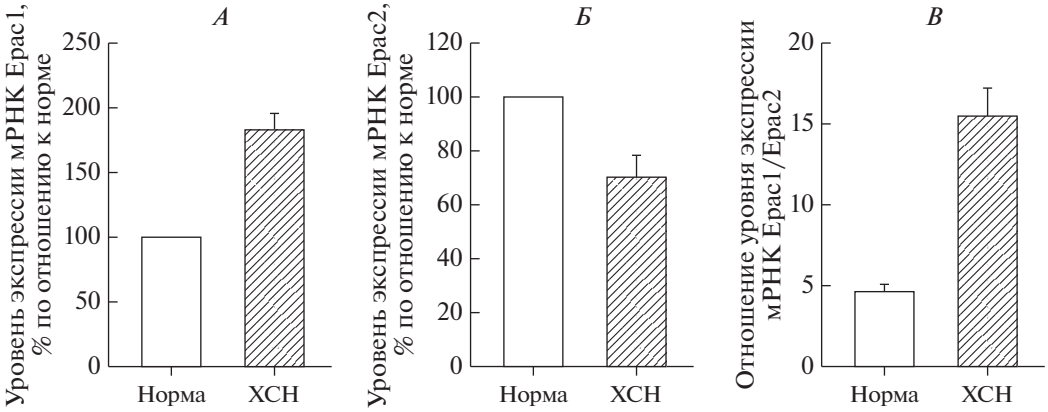

Рис. 6. Уровень экспрессии белков Epac в сердце у здоровых людей и пациентов с хронической сердечной недостаточностью (по [35]).
Объяснение в тексте.

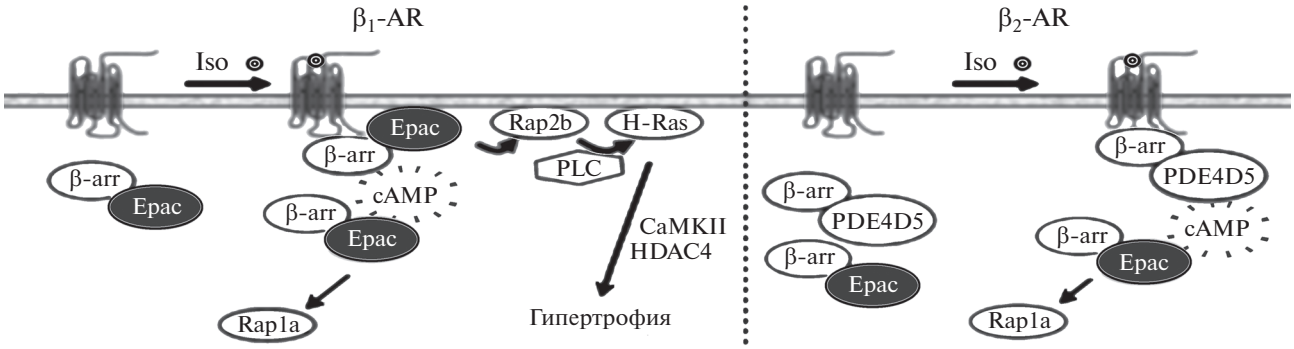

Рис. 7. Схематическое отображение Epac-опосредованных сигнальных каскадов, инициируемых стимуляцией β_1- и β_2-адренорецепторами (по [42]).
Объяснение в тексте.

в базальных условиях белки Epac1 локализовались в цитоплазме клетки, то после стимуляции β_1-AR они мигрировали к внутренней поверхности клеточной мембраны в область расположения β_1-AR, стимуляция же β_2-AR не вызывала транслокации белков Epac1 из цитозоля к мембране. Вместе с тем, при совместной стимуляции β_1-AR и β_2-AR белки Epac1 транслоцировались к обоим подтипам β-адренорецепторов. В результате β_1-AR-опосредованной активации белков Epac1 активируется Rap2B/H-Ras сигнальный каскад, инициирующий гипертрофию кардиомиоцитов, которая не развивается в случае замены GTPазы Rap2B на ее биологически инертную форму Rap2B–Si (Rap2B by SiRNA). Также было показано, что если в клетку, экспрессирующую β_1-AR, трансфицировать белок Epac1, то в ней активность GTPазы H-Ras возрастает в 2.5 раза, в случае же трансфицирования белка Epac1 в клетку, экспрессирующую β_2-AR, активность H-Ras не изменяется. Затем с использованием метода резонансного переноса энергии в биолюминесцентных системах (BRET) *in vitro* было продемонстрировано, что для транслокации белков Epac1 из цитозоля к β_1-AR и последующей активации Rap2B/H-Ras прогипертрофического сигнального каскада необходимо взаимодействие белка Epac1 с регуляторным белком β-аррестином 2 (β-arr2), который контролирует активность сопряженных с G-белками трансмембранных рецепторов посредством регуляции связи с их цитоплазматической петлей (рис. 7). Тем же методом было показано, что в случае активации сопряженного с β_2-AR Epac1/Rap1A сигнального каскада не происходит взаимодействия белков Epac1 с β-arr2, поскольку оно блокируется специфической для cAMP 3',5-цикло-фосфодиэстеразой 4B (cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4B, PDE4D5) (рис. 7).

Таким образом, имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что избыточная активация/экспрессия белков Epac1, опосредованная β_1-адреностимуляцией, что клинически соответствует ситуации, наблюдаемой у пациентов, стра-

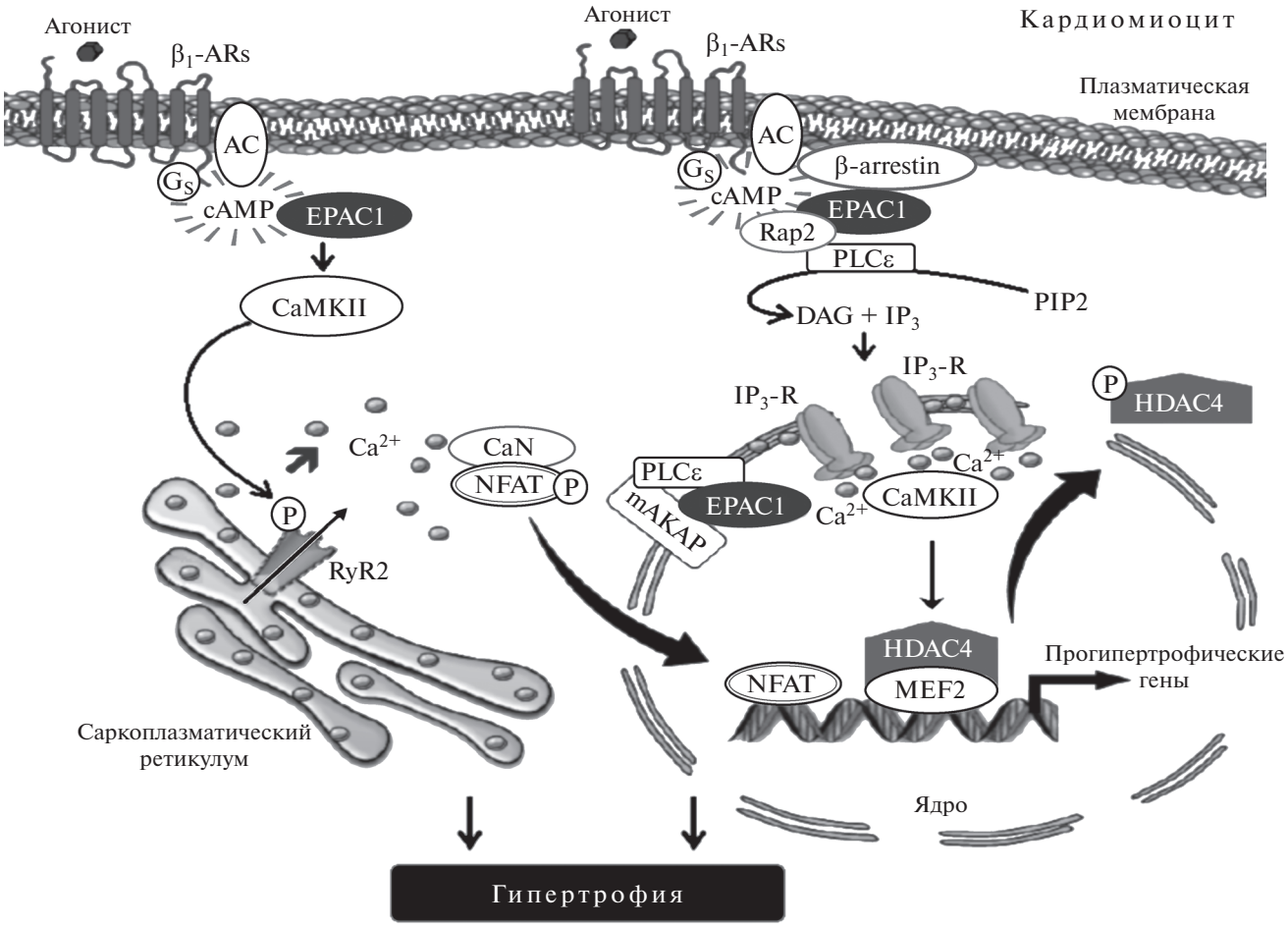

Рис. 8. Схематическое отображение сопряженных с белками Epac прогипертрофических сигнальных каскадов (по [73]).
Объяснение в тексте.

дающих хронической сердечной недостаточностью различного генеза, приводит к развитию гипертрофии/ремоделирования миокарда. В основе этого патологического процесса лежит активация сопряженного с белками Epac1 прогипертрофического сигнального каскада: Epac1/Rap2/H-Ras/PLCє/PIP2/DAG/PKCє/IP3/Ca^{2+}/CaN/CaMKIIδ/HDAC4/MEF-2 (рис. 8). Свое прогипертрофическое действие белки Epac1 реализуют не зависимо от PKA.

Следует отметить, что в литературе представлены результаты исследования, в котором приводятся данные о том, что активация белков Epac1 в условиях септического шока препятствует развитию сердечной недостаточности [43]. Этот кардиопротективный эффект реализуется за счет способности белков Epac1 активировать супрессор цитокинов 3 (suppressors of cytokine signaling 3, SOCS3), что в свою очередь блокирует интерлейкин 6 (IL-6)-опосредованный Jak/STAT провоспалительный сигнальный каскад и последующую гиперэкспрессию индуцибильной NO синтазы (iNOS).

Роль белков Epac в развитии фиброза миокарда

Известно, что сердечные фибробласты (CFs), входящие в состав внеклеточного матрикса, составляют две трети от общей популяции сердечных клеток и формируют “каркас” для кардиомиоцитов [44]. В условиях патологии (инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, кардиомопатия и т.д.) фибробласты трансформируются в миофибробласты, которые активируются различными факторами роста, цитокинами, а также механическими стимулами и инициируют выработку коллагенов, преимущественно I и III типов, и последующее замещение сократительных кардиомиоцитов соединительной тканью, т.е. развитие фиброза миокарда. В литературе имеются данные о том, что активация cAMP/PKA сигнального каскада в CFs сопровождается подавлением синтеза коллагена. Так, например, активация

cAMP форсколином или активация PKA ее агонистом – 8-хлор-3',5'-циклическим аденозинмонофосфатом (8-ClcAMP, син. CPT-cAMP) в клеточной культуре сердечных фибробластов, выделенных из миокарда взрослых крыс, сопровождаются значительным подавлением ($p < 0.05$) активированного или ангиотензином II (Ang II), или трансформирующим фактором роста-β (transforming growth factor-β, TGF-β) синтеза коллагена [45]. В настоящее время вклад белков Epac в развитие фиброза миокарда остается не ясным, поскольку согласно литературным данным они могут проявлять как про-, так и антифиброзную активность. Впервые об экспрессии белков Epac1, но не белков Epac2, в CFs было сообщено в исследовании *U. Yokoyama et al.* [46]. В этом же исследовании в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре полученных от взрослых интактных крыс CFs, показано, что 8-CPT-опосредованная активация Epac1/Rap1 сигнального каскада инициирует миграцию фибробластов, тогда как активация PKA ее агонистом N6-phenyl cAMP (Phe-cAMP) блокирует их миграцию. Далее в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре CFs, полученных из периинфарктной зоны миокарда мышей через одну неделю после воспроизведения инфаркта, отмечалось снижение экспрессии белков Epac1 с параллельным увеличением экспрессии профибротического TGF-β1. Авторы исследования полагают, что функциональное снижение экспрессии белков Epac1 в условиях инфаркта миокарда стимулирует/облегчает процесс замещения соединительной тканью некротизированного участка сердечной мышцы. Несколько позже те же авторы высказали предположение, что снижение экспрессии белков Epac1, инициированное профибротическими агентами (TGF-β, Ang II и др.) может способствовать развитию фиброза миокарда [47]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре CFs, полученных от неонатальных крыс, мышей с инфарктом миокарда через 21 день после перевязки коронарной артерии и CFs, полученных у пациентов с инфарктом миокарда, оценивали вклад белков Epac1 в регуляцию фиброгенеза [48]. На первом этапе исследования было выявлено, что ключевым белком, инициирующим фиброгенез в ишемированных сердцах, является кальций/кальмодулин-зависимая фосфодиэстераза 1A 3',5'-циклических нуклеотидов (calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A, PDE1A), поскольку ее экспрессия значительно увеличивалась в биоптатах ткани, взятых из периинфарктной области (по сравнению с уровнем экспрессии PDE1A в интактных фибробластах), а ее блокада селективным ингибитором IC86340 препятствовала индуцированной Ang II экспрессии таких индукторов фиброгенеза как коллаген 1, фибронектин (Fn) и ингибитор активатора плазминогена (PAI-I). Далее было показано, что PDE1A реализует свои профибротические эффекты посредством активации cAMP/ Epac1/Rap1 сигнального каскада. На основании полученных данных авторы пришли к заключению, что они “выявили ранее неописанный сигнальный механизм PDE1A-cAMP-Epac1-Rap1, лежащий в основе активации миофибробластов при патологическом ремоделировании сердца”. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре CFs, полученных от неонатальных мышей (NMCFs), изучали роль индуцированной β-адреностимуляцией экспрессии в фибробластах профиброгенного интерлейкина 6 (IL-6) [49]. На первом этапе было продемонстрировано, что изопротеренол-опосредованная стимуляция β-адренорецепторов инициирует активацию δ-изоформы PKC (PKCδ) с последующей инициацией экспрессии IL-6. Далее отмечалось, что вызванная PKCδ экспрессия IL-6 реализуется за счет активации Epac1/Rap1 сигнального каскада, поскольку нокдаун белков Epac1 подавлял изопротеренол-опосредованную экспрессию IL-6.

Активация cAMP/Epac1/Rap1/PKCδ сигнального каскада завершается фосфорилированием P38 MAP-киназы (P38MAPK), играющей ведущую роль в активации IL-6. Также отмечалось, что профиброгенное действие белков Epac1 реализуется не зависимо от PKA. При изучении уровня экспрессии белков Epac1 в биоптатах ткани миокарда взрослых крыс, полученных на 14-ый день после воспроизведения ишемии/реперфузии, показано, что систематическая экспериментальная терапия антагонистом белков Epac1 витексином подавляет интенсивность профибротических процессов в ишемизированных тканях сердца [50]. Аналогичные результаты были получены и при использовании селективного блокатора белков Epac1 – AM-001 в модельных экспериментах *in vivo*, воспроизводящих длительный катехоламиновый стресс [41].

Таким образом, в настоящее время имеются достаточно убедительные данные о том, что в условиях ишемического повреждения сердца активация PDE1A/cAMP/Epac1/Rap/PKCδ/P38MAPK сигнального каскада способствует развитию фиброза миокарда. Однако в литературе представлена и другая точка зрения. Так, в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре кардиомиобластов (h9c2), полученных из сердец взрослых крыс, показано, что инициированная альдостероном экспрессия белка остеопонтина (OPN), который, как известно, необходим для реализации в миокарде профибротических эффектов Ang II и TGFβ1 [51], в свою очередь, подавляет экспрессию белка Epac1 [52], тогда как внесение в культуру миофибробластов, лишенных OPN (OPN-KN knout (KO cells), β_2-адреностимулятора сальбутомола восстанавливала экспрессию бел-

ков Epac1. Авторы этого исследования пришли к заключению “о неблагоприятной роли OPN в сдерживании β_2-AR-зависимой, cAMP/Epac1-опосредованной антифиброзной сигнализации”. Вместе с тем, они никак не обсуждают ранее полученные данные о том, что PDE1A/cAMP/Epac1 сигнальный каскад инициирует экспрессию профиброгенных цитокинов. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре фибробластов, полученных из сердец взрослых крыс, показано, что α-адреностилулятор норэпинефрин (NE) значимо ($p < 0.05$) подавляет экспрессию белков Epac1 при одновременном увеличении (в 4.5 раза) экспрессии коллагена I типа [53]. Внесение в культуру клеток селективного антагониста α_1-адренорецепторов (α_1-AR) празозина предотвращало NE-индуцированное снижение экспрессии Epac1. Затем было выявлено, что неселективный агонист β-адренорецепторов (β-AR) изопротеренол значимо ($p < 0.01$) увеличивал экспрессию белков Epac1 и уменьшал секрецию коллагена I. Этот эффект изопротеренола был блокирован селективным антагонистом β_2-AR – ICI-118551, но не селективным антагонистом β_1-AR – CGP-20712A. Блокада белков Epac1 их антагонистом ESI-09 препятствовала подавлению экспрессии коллагена I, инициированной селективным агонистом β_2-AR сальбутамолом. Авторы этого исследования полагают, что адренергическая регуляция Epac1-опосредованного контроля фиброгенеза разнонаправленна и, с одной стороны, посредством активации α_1-AR подавляет экспрессию белков Epac1, и тем самым стимулирует синтез коллагена, а с другой стороны, путем активации β_2-AR стимулирует экспрессию белков Epac1 и последующую активацию антифиброгенных сигнальных каскадов.

Роль белков Epac в генезе острого ишемического повреждения миокарда

Информация о роли белков Epac в генезе острого ишемического повреждения миокарда, несмотря на всю важность этой проблемы, крайне незначительна. В модельных экспериментах *in vivo* было выявлено, что в биоптатах миокарда мышей с острым ишемическим повреждением сердца (45 мин ишемии + 24 ч реперфузии) значимо ($p < 0.01$), по сравнению с интактными животными, увеличена экспрессия белков Epac1, что напрямую коррелирует с результатами, полученными при изучении экспрессии белков Epac1 в биоптатах ишемизированного миокарда человека [54]. В модельных экспериментах *in vivo*, воспроизводящих острый инфаркт миокарда у нокаутных по белку Epac1 мышей, показано, что у них, по сравнению с интактными животными, значимо ($p < 0.05$) меньше площадь ишемического повреждения – соответственно 33 ± 4 и $53 \pm 4\%$ [54]. Далее в модельных экспериментах *in vitro*, выполненных на кардиомиоцитах, полученных от нокаутных по белку Epac1 мышей, показано, что у них, в отличие от интактных животных, 4-часовая гипоксия и последующая 2-часовая реоксигенация (т.е. воспроизведение условий ишемия/реперфузия) не сопровождались повреждением клеточной мембраны и снижением продукции ATP. Внесение в модельную культуру кардиомиоцитов, полученных от нокаутных по белку Epac1 мышей, его агониста 8-CPT не инициировало повреждение клеток, также как и предварительное внесение в модельную культуру интактных мышей селективного ингибитора белков Epac1 – CE3F4 защищало клетки от ишемического повреждения. Далее методом иммуноблоттинга было выявлено, что белки Epac1 локализуются не только в цитозоле кардиомиоцитов, но и в области внутренней мембраны и матрикса митохондрий. Для того, чтобы оценить вклад митохондриальной изоформы белка Epac1 (MitEpac1), была сконструирована мутантная форма белка с удаленной митохондриальной последовательностью – $Epac1^{\Delta 2\text{-}37}$. Поскольку мутант $Epac1^{\Delta 2\text{-}37}$, также как и нативный белок Epac1, активировал эффектор Rap1, то можно было говорить о том, что потеря митохондриальной последовательности не влияет на цитозольные эффекты белка Epac1. Затем было показано, что интактные кардиомиоциты с трансфицированным белком $Epac1^{\Delta 2\text{-}37}$, в отличие от интактных кардиомиоцитов, содержащих немодифицированный белок Epac1, не были повреждены в условиях модели ишемия/реперфузия [54]. При изучении механизмов, лежащих в основе кардиотоксического действия MitEpac1, отмечалось, что MitEpac1 инициирует перегрузку митохондрий ионами Ca^{2+} за счет активации комплекса, состоящего из потенциалчувствительного анионного канала 1 (VDAC1), глюкозо-регулируемого шаперона 75 (GRP 75) и рецептора инозитол-1,3,5-трифосфата (IP3R1). Известно, что комплекс VDAC1/GRP75/IP3R1 сконцентрирован на митохондрии-связанных участках мембраны SR (mitochondria-associated SR membranes, MAMs), где он регулирует обмен ионов Ca^{2+} между SR и митохондриями. Также было продемонстрировано, что активация комплекса VDAC1/GRP75/IP3R1 и последующее за этим открытие поры, изменяющей проницаемость мембраны митохондрий (mPTP), не сопровождается активацией RyR2, что позволяет говорить о том, что вклад цитозольной изоформы белка Epac1 в обусловленую ишемией гибель кардиомиоцитов незначителен. Поскольку в ишемия/реперфузия-обусловленном повреждении кардиомиоцитов помимо ионов Ca^{2+} значительная роль принадлежит ROS, было изучено влияние белков Epac1 на их про-

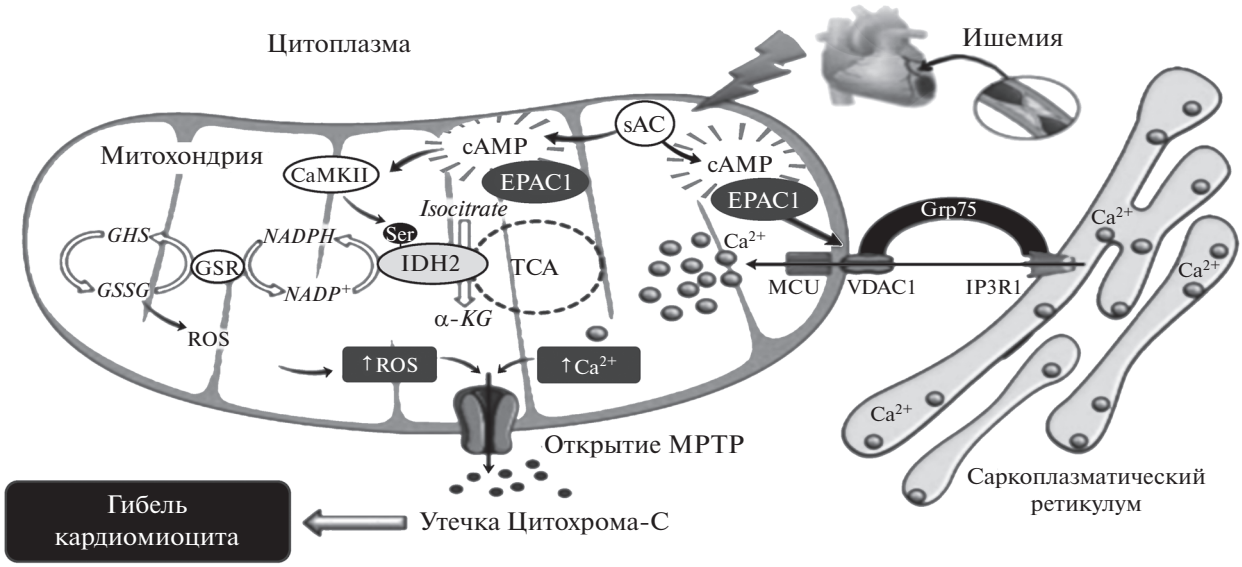

Рис. 9. Схематическое отображение роли митохондриальных белков Epac в остром ишемическом повреждении миокарда (по [54]).
Объяснение в тексте.

дукцию в ишемизированных кардиомиоцитах [54]. В модельных экспериментах *in vitro,* воспроизводящих условия ишемия/реперфузия, выполненных на кардиомиоцитах, полученных от нокаутных по белку Epac1 мышей, показано, что у них, в отличие от интактных животных, образование ROS значимо ($p < 0.05$) снижено. Аналогичные данные были получены при 8-CPT-опосредованнной активации белков Epac1. Известно, что одним из ключевых белков, защищающих кардиомиоциты от избыточной продукции ROS, является локализованный в матриксе митохондрий NADP-зависимый фермент изоцитратдегидрогеназа 2 (isocitrate dehydrogenase 2, IDH2), катализирующий окислительное декарбоксилирование изоцитрата в α-кетоглутарат (α-KG) и последующую продукцию NADPH, необходимого для регенерации двух митохондриальных антиоксидантов, защищающих мтДНК от окислительного стресса: митохондриального глутатиона (mitochondrial glutathion, GSH) и тиредоксина. При помощи метода ко-иммунопреципитации показано, что в интактных кардиомиоцитах 8-CPT-опосредованнная активация белков Epac1 увеличивает серин-специфическое фосфорилирование IDH2, вследствие чего снижается продукция NADPH, тогда как в кардиомиоцитах с трансфицированным белком Epac1$^{\Delta 2\text{-}37}$ (белки Epac1 с удаленным митохондриальным доменом) 8-CPT не вызывал фосфорилирования IDH2, что дает возможность предполагать, что именно белки MitEpac1 инициируют ROS-обусловленное повреждение клеток. Также с использованием метода ко-иммунопреципитации было выявлено, что в митохондриях белки MitEpac1 находятся в составе макромолекулярного комплекса, включающего в себя помимо белка MitEpac1 CaMKIIδ и IDH2. Далее в экспериментах, выполненных на изолированных интактных митохондриях, отмечено, что блокада CaMKIIδ селективным ингибитором KN93 препятствует MitEpac1-опосредованному фосфорилированию IDH2, что свидетельствует о том, что CaMKIIδ является связующим звеном между MitEpac1 и IDH2.

Таким образом, в настоящее время представлено, что в условиях острой ишемии миокарда активация белка MitEpac1 сопровождается гибелью кардиомиоцитов, которая в условиях целостного организма манифестируется увеличением зоны инфаркта. В основе этого патологического процесса лежит как MitEpac1-опосредованная активация VDAC1/GRP75/IP3R1 сигнального каскада, приводящего к открытию митохондриальной поры – mPTP и последующей фатальной перегрузке митохондрий ионами Ca^{2+}, так и MitEpac1-опосредованное фосфорилирование IDH2, сопровождающееся гиперпродукцией ROS (рис. 9).

Роль белков Epac в развитии нарушений сердечного ритма

Впервые о наличии у белков Epac аритмогенного потенциала сообщил в 2008 г. *S.S. Hothi et al.* [55]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на спонтанно сокращающемся изолированном по методу Лангендорфа сердце мыши, перфузируемом раствором Кребса-Хензелайта, было описа-

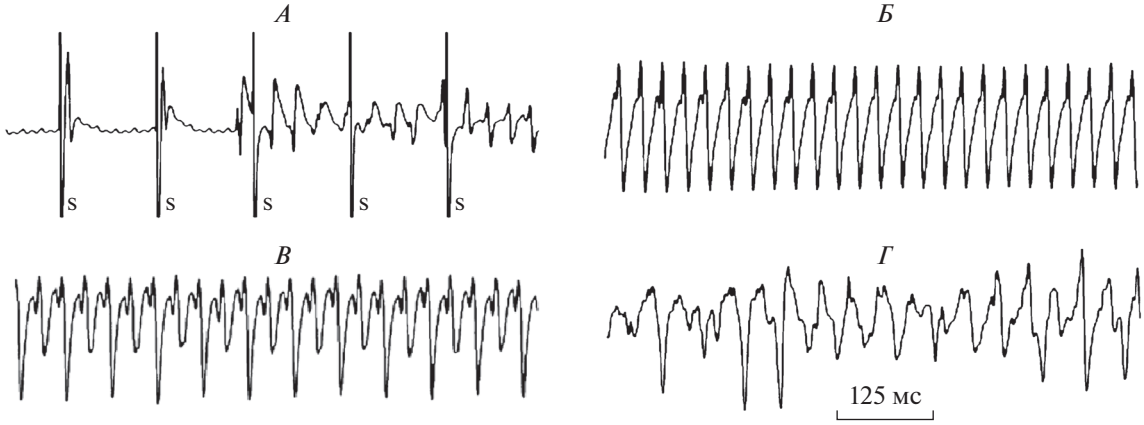

Рис. 10. Нарушения ритма сердца, в условиях его программной стимуляции, инициированные белками Epac (по [55]). Объяснение в тексте.

но, что агонист белков Epac 8-CPT не влиял на частоту сердечных сокращений, но в ряде случаев инициировал триггерную активность. Тригерная активность возникала как во время фазы реполяризации (afterdepolarisations, EADs), так и после ее завершения. В аналогичных экспериментах, выполненных с навязыванием сердечного ритма (стационарная стимуляция), показано, что агонист белков Epac – 8-CPT, внесенный в перфузат, изначально инициировал спонтанный эктопический ритм (рис. 10, *А*), который сменялся одно- (рис. 10, *Б*) или двухнаправленной (рис. 10, *В*) желудочковой тахикардией (ЖТ), переходящей в фибрилляцию желудочков (рис. 10, *Г*). Далее с использованием метода программированной электрической стимуляции (PES), который используется в клинике для изучения характера и электрофизиологических механизмов нарушений ритма сердца, было показано, что, если в контрольных экспериментах ($n = 20$) PES ни в одном случае не вызывала пароксизмов ЖТ, то в опытах, выполненных на тех же сердцах, на фоне 8-CPT, предварительно внесенного в перфузат, во всех случаях ($n = 20$) развивалась ЖТ. В экспериментах с использованием селективного ингибитора PKA – H-89 было продемонстрировано, что аритмогенное действие белков Epac не зависит от PKA.

Известно, что аритмогенные синдромы (синдром удлиненного интервала QT [LQT3 и LQT5], синдром Бругада и др.) как в клинике, так и воспроизведенные в эксперименте, манифестируются электрофизиологическими предикторами. Однако в случае белков Epac не было выявлено каких-либо электрофизиологических предвестников инициируемых ими нарушений сердечного ритма. Так, например, по сравнению с контролем на фоне 8-CPT-опосредованной активации белков Epac ни в эндокарде, ни в эпикарде не изменялась продолжительность потенциала действия: APD_{90}, соответственно 51.8 ± 2.2 и 51.9 ± 2.2 мс ($p > 0.05$; $n = 10$) и соответственно 40.4 ± 1.2 и 44.0 ± 1.7 мс ($p > 0.05$; $n = 10$). Помимо этого, не было показано отличий ни в трансмуральном, ни в апико-базальном градиенте реполяризации, ни в продолжительности эффективного рефрактерного периода желудочков. На основании полученных результатов авторы этого исследования пришли к заключению, что Epac-опосредованные нарушения сердечного ритма не манифестируются электрофизиологическими предикторами. Далее было показано, что как в условиях спонтанно сокращающегося изолированного сердца, так и в условиях PES, на фоне блокады CaMKII ее селективным ингибитором KN-93 активация белков Epac или неселективным β-адреностимулятором изопротеренолом, или их агонистом 8-CPT не инициировала развитие нарушений сердечного ритма, что позволяет говорить о том, что аритмогенное действие белков Epac реализуется посредством активации CaMKII. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре кардиомиоцитов, полученных из левого желудочка сердца мыши, с помощью конфокальной лазерной микроскопии оценивали влияние белков Epac на динамику перемещения ионов Ca^{2+} в системе SR/цитозоль клетки [55]. Как в покоящихся, так и сокращающихся стимулированных кардиомиоцитах 8-CPT-опосредованная активация белков Epac инициировала аномальную аритмогенную диастолическую “утечку” из SR ионов Ca^{2+} ($p < 0.001$), которая полностью блокировалась селективным ингибитором CaMKII – KN-93. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* оценивали вклад изоформ белков Epac в формирование аритмогенеза [56]. Животные (мыши) были разделены на 4 группы: интактные, нокаутные по белку Epac1ko (Epac1ko), нокаутные по белку Epac2ko (Epac2ko) и нокаутные по обоим изоформам белков (Epac Dko). На первом этапе исследования между группами животных

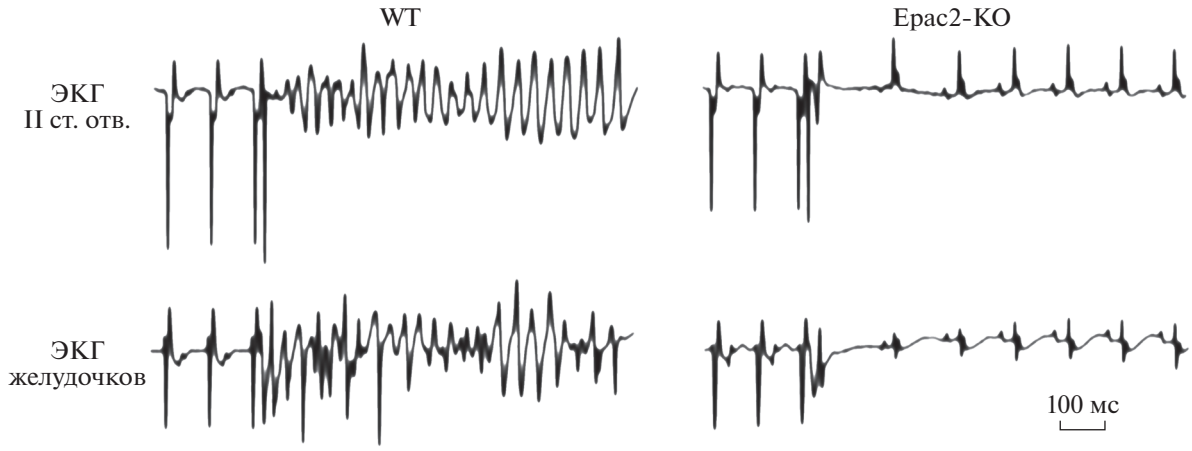

Рис. 11. Влияние программной стимуляции на ритмическую активность сердца у интактных и нокаутных по белку Epac2 мышей (по [56]).
Объяснение в тексте.

не было выявлено различий ни по функциональным, ни по электрофизиологическим характеристикам миокарда. Далее на культуре кардиомиоцитов, полученных из левого желудочка, было показано, что 8-CPT-опосредованная активация белков Epac в кардиомиоцитах, полученных от интактных и Epac1ko мышей вызывала значимую ($p < 0.01$) диастолическую, не зависимую от PKA, "утечку" ионов Ca^{2+} из цистерн SR (CaSpF), которая отсутствовала в кардиомиоцитах, полученных от Epac2ko и Epac Dko мышей. Затем было показано, что, в отличие от интактных животных, программированная электрическая стимуляция левого желудочка сердца у мышей Epac2ko не сопровождалась развитием желудочковой тахикардии и/или фибрилляции желудочков ($p < 0.05$) (рис. 11). На основании полученных данных было сделано заключение о том, что аритмогенные эффекты белков Epac обусловлены активацией сопряженных с белками Epac2, но не Epac1, сигнальных каскадов. В экспериментах *in vitro*, выполненных на интактных кардиомиоцитах, было отмечено, что аритмогенные эффекты белков Epac2 реализуются посредством активации CaMKIIδ, которая в свою очередь фосфорилирует RyR2 по Ser^{2814}, поскольку блокада CaMKIIδ селективным ингибитором KN-93 предотвращала 8-CPT опосредованную CaSpF. Также на интактных кардиомиоцитах было показано, что блокада β_1-адренорецепторов их селективным антагонистом CGP-20712A, но не блокада β_2-адренорецепторов их селективным антагонистом ICI-118.551, ингибировала 8-CPT- или изопротеренол-опосредованную CaSpF, что свидетельствует о том, что Epac2-опосредованный аритмогенез сопряжен с активацией β_1-адренорецепторов. Близкие данные были получены и в более поздних исследованиях [57–59]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре кардиомиоцитов ARVMs, полученных из желудочков взрослых крыс, показано, что изопротеренол-опосредованная CaSpF подавляется селективным ингибитором белков Epac2 – ESI-05, но не селективным ингибитором белков Epac1 – CE3F4 [60]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на выделенных из желудочков сердец мышей и кроликов интактных кардиомиоцитах, были подробно изучены компоненты сигнального пути, инициирующие Epac2-опосредованную CaSpF [61]. На первом этапе исследования было продемонстрировано, что неселективный β-адреностимулятор изопротеренол более чем в 2 раза увеличивал CaSpF (с 0.22 ± 0.048 до 0.46 ± 0.12). Ингибитор нейрональной NO-синтазы (nNOS, NOS1) – L-NPA, внесенный в культуру клеток, не влиял на базальную "утечку" ионов Ca^{2+} из SR, но полностью блокировал CaSpF, инициированную как изопротеренолом, так и белком Epac2. Изопротеренол- или Epac2-опросредованная активация CaMKII/RyR2 и последующая CaSpF также блокируется L-NPA. Помимо этого было показано, что блокада PKA селективным ингибитором H-89 не оказывала существенного влияния на изопротеренол-стимулированную активность CaMKII. Поскольку в литературе имеются данные о том, что изопротеренол/NOS1-опосредованная активация CaMKII реализуется посредством активации PI3K/Akt сигнального каскада [62], на следующем этапе исследования оценили возможный вклад этого сигнального каскада в Epac2-опосредованный аритмогенез. Блокада PI3K селективным ингибитором LY924002 препятствовала Epac2-опосредованой CaSpF.

Таким образом, к настоящему времени накоплены достаточно убедительные данные о том, что Epac2-опосредованный аритмогенез связан с

инициацией аномальной диастолической утечки ионов Ca^{2+} из цистерн SR, которая реализуется посредством активации β_1-AR/cAMP/Epac2/PI3K/Akt/NOS1/CaMKIIδ/RyR2 сигнального каскада. Вместе с тем, имеются данные о том, что белки Epac могут провоцировать развитие нарушений сердечного ритма и посредством других механизмов.

Известно, что активация (возбуждение) встроенных в клеточную мембрану кардиомиоцитов быстрых селективных потенциалзависимых Na^+-каналов сопровождается "лавинообразным" кратковременным входящим током ионов Na^+ (I_{NaT}), генерирующим фазу 0 (фазу деполяризации) потенциала действия. После того как заряд внутренней поверхности клеточной мембраны достигнет уровня +20 – +30 мВ, Na^+-каналы закрываются, что блокирует I_{NaT}. Однако в кардиомиоцитах желудочков в следующую за фазой 0 фазу реполяризации незначительная часть Na^+-каналов остается открытыми, генерируя не инактивирующий или стойкий входящий ток ионов Na^+, который носит название поздний Na^+ ток – I_{NaL} [63]. Известно, что патологическое увеличение I_{NaL} связано с повышенным риском развития злокачественных нарушений сердечного ритма [64]. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре кардиомиоцитов, полученных из желудочков сердца мышей, показано, что изопротеренол- или 8-CPT-опосредованная активация белков Epac сопровождается последующей активацией CaMKIIδ, которая фосфорилирует $Na_V1.5$-каналы, расположенные в области Т-трубочек, что влечет за собой увеличение I_{NaL} [65]. Также было показано, что CaMKIIδ-опосредованное увеличение I_{NaL} не зависит от PKA, поскольку ее ингибрование PKI не влияло на способность CaMKIIδ фосфорилировать $Na_V1.5$-канал. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре кардиомиоцитов, полученных из желудочков сердца кролика, было показано, что 8-CPT-опосредованная активация белков Epac имитирует эффекты β_1-адреностимуляции, увеличивая I_{NaL} в позднюю фазу плато и 3-ю фазу реполяризации потенциала действия [66]. Этот эффект белков Epac реализуется посредством активации CaMKIIδ вне зависимости от PKA, которая также может увеличивать I_{NaL} по CaMKII-несопряженным сигнальным путям. Авторы обоих исследований полагают, что Epac-опосредованное увеличение I_{NaL} реализуется по β_1-AR/cAMP/Epac2/CaMKII сигнальному пути.

В экспериментах *in vitro*, выполненных на полученных из предсердий и желудочков сердца мыши изолированных кардиомиоцитах, Epac-опосредованная активация RyR2 рецепторов и последующая за этим диастолическая утечка ионов Ca^{2+} влечет за собой угнетение функциональной активности быстрых трансмембранных потенциалзависимых Na^+-каналов, что приводит к подавлению I_{NaT} [67]. В интактных кардиомиоцитах предсердий и желудочков I_{NaT} составляет соответственно –20.23 ± 1.48 pA/μм и –29.8 ± ± 2.4 pA/μм, тогда как после внесения в среду агониста белков Epac – 8-CPT он соответственно уменьшался до –11.21 ± 0.91 pA/μм и –19.3 ± ± 1.6 pA/μм ($p < 0.006$ по отношению к интактным). Этот эффект был полностью блокирован предварительным внесением в среду антагониста RyR2 рецепторов дантролена. В этом же исследовании продемонстрировано, что уменьшение I_{NaT} сопровождается замедлением (как в предсердиях, так и в желудочках) распространения потенциала действия, с чем авторы связывают проаритмические эффекты белков Epac.

Недавно были опубликованы результаты исследования, из которых следует, что в условиях сердечной недостаточности (СН), индуцированной у мышей изопротеренолом (30 мг/кг/сут, 21 сут), в предсердиях резко увеличивается плотность медленных потенциалзависимых Ca^{2+}-каналов L типа, что сопровождается статистически значимым ($p < 0.05$) увеличением входящего I_{CaL} [68]. Программированная электрическая стимуляция сердца у животных с СН в 80% случаев приводила к развитию фибрилляции предсердий (ФП), тогда как у контрольных животных она развивалась лишь в 12.5% случаев ($p < 0.05$). Далее методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) было показано, что у животных с СН, по сравнению с интактными, в кардиомиоцитах предсердий значимо ($p < 0.05$), более чем в 2 раза, увеличена экспрессия белков Epac1. Блокада белков Epac1 селективным антагонистом CE3F4 у животных СН сопровождалась как значимым снижением I_{CaL}, так и уменьшением количества случаев индуцированной электрической стимуляцией ФП – соответственно 80 и 47% случаев ($p < 0.05$). Авторы этого исследования приходят к выводу, что в условиях СН вклад белков Epac1 в развитие ФП связан с их способностью активировать входящий I_{CaL}, протекающий через клеточную мембрану кардиомиоцитов предсердий.

Помимо потенциалзависимых Na^+, K^+ и Ca^{2+} ионных каналов в клеточную мембрану и мембрану Т-трубочек встроены так называемые канонические каналы с транзиторным рецепторным потенциалом (transient receptor potential cation channel subfamily C, TRPC). TRPC относятся к неселективным катионовым ионным каналам, регулирующим движение ионов Na^+ и Ca^{2+} (преимущественно Ca^{2+}) через плазматические мембраны. В кардиомиоцитах в основном представлены TRPC 3-го и 4-го типов, принимающие участие в регуляции их сократимости и возбудимости. Их избыточная активация и/или гипер-

экспресия инициирует развитие гипертрофии миокарда и нарушения сердечного ритма [69, 70]. TRPC-опосредованная гипертрофия кардиомиоцитов связана с активацией PLC/DAG/CaN/NFAT сигнального каскада. Активированный NFAT экспортируется в ядро клетки, где инициирует транскрипцию генов *TRPC*. Проаритмическое действие активированных TRPC связывают с перегрузкой кардиомиоцитов ионами Ca^{2+}. В экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре кардиомиоцитов, полученных из желудочков взрослых крыс, изучили вклад TRPC3 и TRPC4 в аритмогенный потенциал белков Epac [71]. На первом этапе исследования в цитозоле кардиомиоцитов истощили запасы ионов Ca^{2+} посредством блокады Ca^{2+}-зависимой АТРазы (SERCA) селективным ингибитором тапсигаргином (TG) и блокады трансмембранных потенциалзависимых Ca^{2+}-каналов L-типа нифедипином, а также блокады Na^+/Ca^{2+} обменника его селективным антагонистом ТВ–R7943. Далее было продемонстрировано, что инкубация этих кардиомиоцитов в течение 4–6 ч в среде, содержащей ионы Ca^{2+}, приводила лишь к незначительному увеличению содержания ионов Ca^{2+} в цитозоле клетки, тогда как добавление в среду агониста белков Epac 8-CPT вызывала резкое возрастание концентрации ионов Ca^{2+} (рис. 12). Этот эффект 8-CPT был заблокирован неспецифическим антагонистом TRPC3 и TRPC4 – SKF-96365. Такое же действие оказывала и блокада белков Epac1 их селективным антагонистом CE3F4 или блокада белков Epac2 ESI-05. Далее было показано, что 8-CPT-опосредованный рост концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме не сопровождался увеличением экспрессии генов *TRPC3* и *TRPC4*, что свидетельствует о том, что белки Epac активируют TRPC за счет посттранскрипционных механизмов. На основании полученных данных авторы этого исследования пришли к заключению о том, что обе изоформы белков Epac принимают участие в аритмогенной активации TRPC3 и TRPC4.

Помимо этого, ряд исследователей полагает, что определенный вклад в проаритмическое действие белков Epac может вносить инициируемая ими в условиях патологии избыточная экспрессия коннексинов Cx43 в области щелевых контактов (GJ) кардиомиоцитов [9, 14, 16], а также Epac-обусловленная аномальная активность трансмембранных потенциалзависимых K^+-каналов задержанного выпрямления IK_s, кодируемых геном *KCNQ1* [72, 73], в частности посредством подавления медленного компонента калиевого тока замедленного выпрямления (IKs), принимающего участие в формировании 3-ей фазы реполяризации потенциала действия [74].

Таким образом, накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что из-

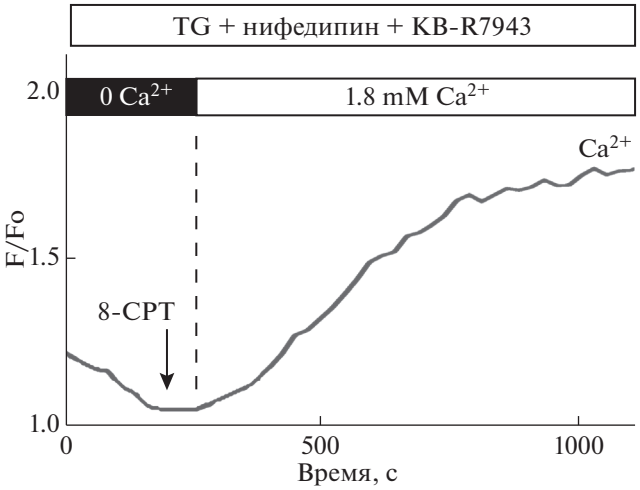

Рис. 12. Влияние белков Epac на вход ионов Ca^{2+} в цитозоль кардиомиоцитов через трансмебранные TRPC3/4 ионные каналы (по [71]). Объяснение в тексте.

быточная активация β_1-AR, в свою очередь, инициирует активацию cAMP/Epac2/PI3K/Akt/NOS1/CaMKIIδ/RyR2 сигнального каскада, приводящую к аритмогенной диастолической “утечке” ионов Ca^{2+} из цистерн саркоплазматического ретикулума в цитозоль кардиомиоцитов и/или cAMP/Epac2/CaMKII сигнального пути, инициирующего аритмогенное аномальное увеличение интенсивности позднего Na^+ тока (I_{NaL}), протекающего через клеточную мембрану кардиомиоцитов желудочков. Также аритмогенной перегрузкой кардиомиоцитов ионами Ca^{2+} сопровождается и Epac-обусловленная активация TRPC3 и TRPC4 каналов (рис. 13). Помимо этого, возможно, что определенный вклад в аритмогенное действие белков Epac вносит их способность вызывать избыточную экспрессию коннексинов Cx43 в области щелевых контактов (GJ) кардиомиоцитов и инициировать аномальную активность K^+-каналов, встроенных в клеточную мембрану кардиомиоцитов (рис. 13).

Следует отметить, что в доступной литературе представлено только исследование, в котором приводятся данные о том, что белки Epac2 проявляют антиаритмическую активность [75]. В опубликованном в 2017 г. исследовании, выполненном на изолированных интактных кардиомиоцитах (ARVMs), выделенных из желудочков взрослых крыс, показано, что ингибирование белков Epac2 селективным агонистом ESI-05 на 50% понижало содержание GTPазы Rap1 и увеличивало базальную продукцию митохондриями ROS [75]. Авторы этого исследования пришли к заключению, что сопутствующая β_1-адренергической стимуляции активация Epac2/Rap1 сигналь-

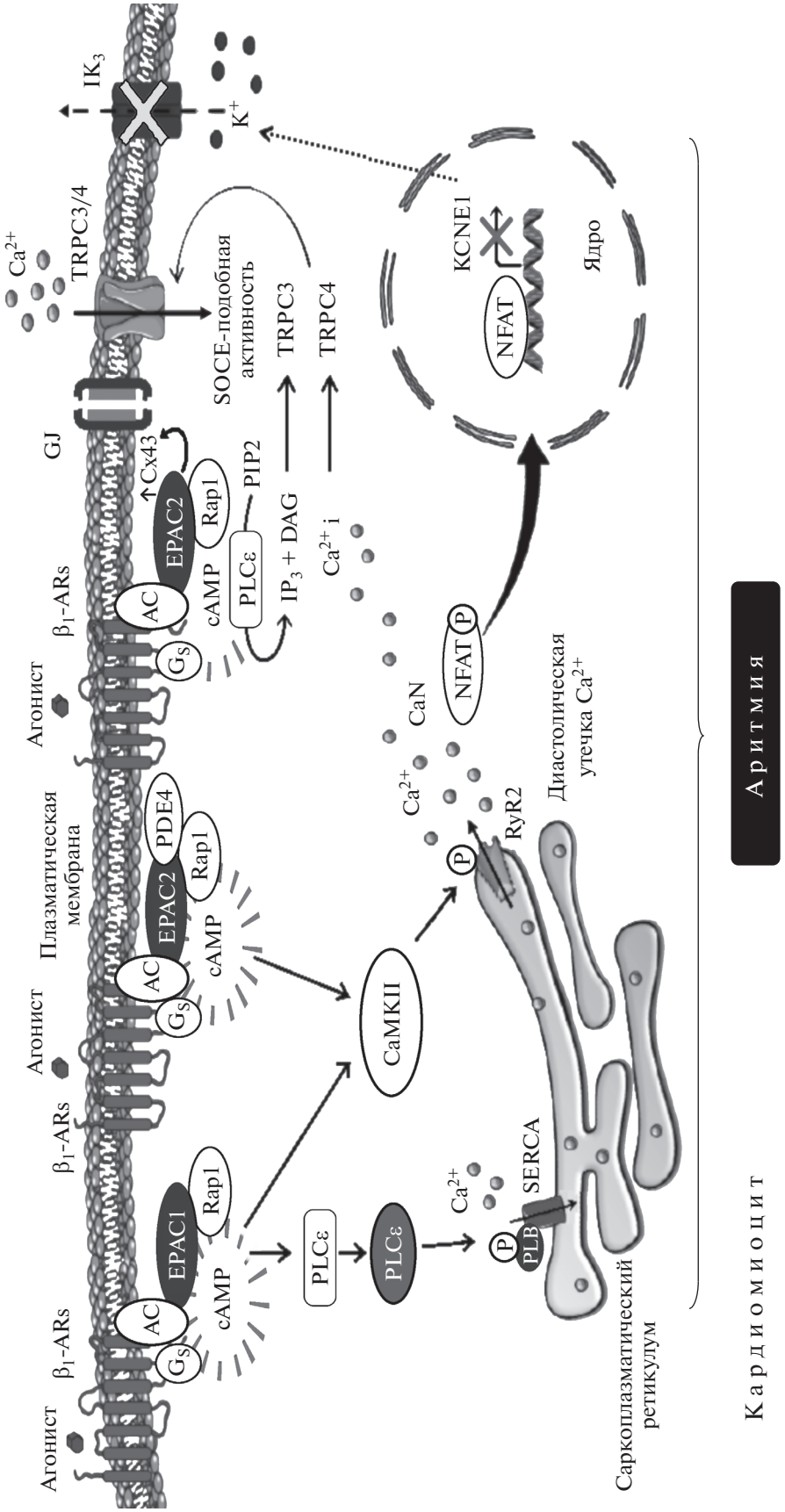

Рис. 13. Схематическое отображение сопряженных с белками Epac проаритмических сигнальных каскадов (по [73]). Объяснение в тексте.

ного каскада обеспечивает отрицательную обратную связь, которая ослабляет митохондриальную генерацию ROS. Когда этот механизм остро прерван ингибированием Epac2, увеличенная продукция ROS генерирует аритмии. Вместе с тем, авторы никак не комментируют ранее опубликованные результаты, свидетельствующие, с одной стороны, об аритмогенной активности белков Epac2, а с другой стороны, данные о том, что MitEpac1-опосредованная активация VDAC1/GRP75/IP3R1 сигнального каскада приводит к фатальной перегрузке митохондрий ионами Ca^{2+}, а MitEpac1-опосредованное фосфорилирование IDH2 сопровождается гиперпродукцией ROS [54]. Также следует отметить, что на современном этапе далеко не ясен вопрос, насколько значителен вклад ROS в генерацию нарушений сердечного ритма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прошло 20 лет с момента открытия нового эффектора cAMP – белков Epac. За это время в экспериментах *in vitro* на культуре клеток или на изолированных органах, а затем и в модельных экспериментах *in vivo* была достаточно подробно изучена их роль в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы. Белки Epac1 и Epac2 экспрессируются в эндотелии и гладкомышечных клетках сосудов, кардиомиоцитах и сердечных фибробластах. В настоящее время накоплен достаточно убедительный литературный материал, свидетельствующий о том, что в нормальных физиологических условиях белки Epac1 регулируют барьерную функцию и, возможно, ангиогенез и пролиферацию эндотелиальных клеток сосудов. Если роль белков Epac1 в регуляции ангиогенеза и пролиферации эндотелиальных клеток окончательно не ясна, то их место в регуляции пролиферации/ангиогенеза гладкомышечных клеток сосудов представляется достаточно определенным – белки Epac1, действуя корпоративно с PKA, проявляют антиангиогенную активность. Помимо этого белки Epac1 участвуют в регуляции тонической активности сосудистого русла – в крупных сосудах активация сопряженных с белками Epac1 сигнальных путей инициирует вазодилатацию, а в микрососудах кожи, напротив – вазоконстрикцию. В условиях патологии, например, сосудистой травмы, активированные белки Epac1 стимулируют процессы миграции гладкомышечных клеток сосудов и пролиферацию их в неоинтиме. Несмотря на то, что документально подтверждена экспрессия белков Epac2 в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов, их вклад в регуляцию функциональной активности сосудистого русла не известен. Не менее важен и вклад белков Epac в регуляцию деятельности сердца. В физиологических условиях сопряженные с белками Epac1 сигнальные каскады регулируют инотропную и, в определенной мере, лузитропную функцию кардиомиоцитов, а также процессы их межклеточного взаимодействия. Помимо этого, как белки Epac1, так и белки Epac2 проявляют выраженную антиапоптотическую активность. В условиях острой ишемии миокарда активация митохондриальной изоформы белков Epac1 инициирует гибель кардиомиоцитов. В условиях хронической сердечной патологии (хроническая сердечная недостаточность, постинфарктный коронарокардиосклероз и др.) сопутствующая ей избыточная активация β_1-адренорецепторов и, соответственно, избыточная активация cAMP/Epac1-сопряженных сигнальных каскадов играет существенную роль в развитии гипертрофии, ремоделирования и фиброза миокарда, а активация Epac2-сопряженных сигнальных каскадов инициирует развитие нарушений сердечного ритма.

Вместе с тем, несмотря на достаточно обширный материал, посвященный изучению роли белков Epac в регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы, многие вопросы остаются не ясными. Это связано с тем, что, во-первых, несмотря на то, что для белков Epac описан ряд эффекторов, их многодоменная структура далеко не исключает наличие и других “партнеров” по связыванию. Во-вторых, остается до конца не ясной взаимосвязь белков Epac с другими сигнальными белками, с которыми они посредством обратной связи регулируют одни и те же биологические процессы. Особенно это касается взаимодействия белков Epac и PKA, поскольку, например, в кардиомиоцитах, сопряженные с ними сигнальные пути нацелены на одни и те же молекулярные комплексы. И, наконец, получение исчерпывающей информации о биологической роли белков Epac во многом сдерживается отсутствием в полной мере адекватных фармакологических инструментов, позволяющих селективно активировать, или селективно блокировать как собственно белки Epac, так и/или их непосредственные эффекторы.

Однако уже сейчас можно говорить о том, что изучение вклада белков Epac в формирование таких патологических процессов, как стенозирование сосудов, гипертрофия, ремоделирование, фиброз миокарда и нарушение сердечного ритма, создало фундаментальную базу для поиска оригинальных лекарственных средств на основе селективных блокаторов белков Epac1 и Epac2.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *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. V. 293. № 3. P. H1662.
2. *Pereira L., Rehmann H., Lao D.H. et al.* Novel Epac fluorescent ligand reveals distinct Epac1 vs. Epac2 distribution and function in cardiomyocytes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 13. P. 3991.
3. *Pereira L., Métrich M., Fernández-Velasco M. et al.* cAMP binding protein Epac modulates Ca^{2+} sparks by a Ca^{2+}/calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes // J. Physiol. 2007. V. 583. Pt 2. P. 685.
4. *Oestreich E.A., Wang H., Malik S. et al.* Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca^{2+} mobilization in cardiac myocytes // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 8. P. 5488.
5. *Oestreich E.A., Malik S., Goonasekera S.A. et al.* Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca^{2+} release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. № 3. P. 1514.
6. *Cazorla O., Lucas A., Poirier F. et al.* cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 33. P. 14144.
7. *Pereira L., Ruiz-Hurtado G., Morel E. et al.* Epac enhances excitation-transcription coupling in cardiac myocytes // J. Mol. Cell. Cardiol. 2012. V. 52. № 1. P. 283.
8. *Okumura S., Fujita T., Cai W. et al.* Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses // J. Clin. Invest. 2014. V. 124. № 6. P. 2785.
9. *Ruiz-Hurtado G., Morel E., Domínguez-Rodríguez A. et al.* Epac in cardiac calcium signaling // J. Mol. Cell. Cardiol. 2013. V. 58. P. 162.
10. *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.
11. *Darrow B.J., Fast V.G., Kléber A.G. et al.* Functional and structural assessment of intercellular communication. Increased conduction velocity and enhanced connexin expression in dibutyryl cAMP-treated cultured cardiac myocytes // Circ. Res. 1996. V. 79. № 2. P. 174.
12. *Matsuda T., Fujio Y., Nariai T. et al.* N-cadherin signals through Rac1 determine the localization of connexin 43 in cardiac myocytes // J. Mol. Cell. Cardiol. 2006. V. 40. № 4. P. 495.
13. *Salameh A., Frenzel C., Boldt A. et al.* Subchronic alpha- and beta-adrenergic regulation of cardiac gap junction protein expression // FASEB J. 2006. V. 20. № 2. P. 365.
14. *Somekawa S., Fukuhara S., Nakaoka Y. et al.* Enhanced functional gap junction neoformation by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes // Circ. Res. 2005. V. 97. № 7. P. 655.
15. *Lee T.M., Lin S.Z., Chang N.C.* Both PKA and Epac pathways mediate N-acetylcysteine-induced Connexin43 preservation in rats with myocardial infarction // PLoS One. 2013. V. 8. № 8. e71878.
16. *Duquesnes N., Derangeon M., Métrich M. et al.* Epac stimulation induces rapid increases in connexin43 phosphorylation and function without preconditioning effect // Pflugers. Arch. 2010. V. 460. № 4. P. 731.
17. *Communal C., Singh K., Pimentel D.R., Colucci W.S.* Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular activation of the beta-adrenergic pathway // Circulation. 1998. V. 98. № 13. P. 1329.
18. *Fujita T., Ishikawa Y.* Apoptosis in heart failure. The role of the β-adrenergic receptor-mediated signaling pathway and p53-mediated signaling pathway in the apoptosis of cardiomyocytes // Circ. J. 2011. V. 75. № 8. P. 1811.
19. *Kwak H.J., Park K.M., Choi H.E. et al.* PDE4 inhibitor, roflumilast protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways // Cell. Signal. 2008. V. 20. № 5. P. 803.
20. *Wu X.M., Ou Q.Y., 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. V. 122. № 10. P. 608.
21. *Mangmool S., Hemplueksa P., Parichatikanond W., Chattipakorn N.* Epac is required for GLP-1R-mediated inhibition of oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes // Mol. Endocrinol. 2015. V. 29. № 4. P. 583.
22. *Aoyama M., Kawase H., Bando Y.K. et al.* Dipeptidyl peptidase 4 inhibition alleviates shortage of circulating glucagon-like peptide-1 in heart failure and mitigates myocardial remodeling and apoptosis via the exchange protein directly activated by cyclic AMP 1/Ras-related protein 1 axis // Circ. Heart Fail. 2016. V. 9. № 1. e002081.
23. *Wang Z., Liu D., Varin A. et al.* A cardiac mitochondrial cAMP signaling pathway regulates calcium accumulation, permeability transition and cell death // Cell. Death Dis. 2016. V. 7. e2198.
24. *Litvin T.N., Kamenetsky M., Zarifyan A. et al.* Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 18. P. 15922.
25. *Acin-Perez R., Salazar E., Kamenetsky M. et al.* Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation // Cell. Metab. 2009. V. 9. № 3. P. 265.
26. *Kumar S., Kostin S., Flacke J.P. et al.* Soluble adenylyl cyclase controls mitochondria-dependent apoptosis in coronary endothelial cells // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. № 22. P. 14760.
27. *Calderón-Sánchez E., Díaz I., Ordóñez A., Smani T.* Urocortin-1 mediated cardioprotection involves XIAP and CD40-ligand recovery: Role of EPAC2 and ERK1/2 // PLoS One. 2016. V. 11. № 2. e0147375
28. *Kang J.H., Lee H.S., Park D. et al.* Context-independent essential regulatory interactions for apoptosis and hypertrophy in the cardiac signaling network // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 34.
29. *Engelhardt S., Hein L., Wiesmann F., Lohse M.J.* Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adren-

ergic receptor transgenic mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 12. P. 7059.

30. *Krum H.* Sympathetic activation and the role of beta-blockers in chronic heart failure // Aust. N Z J. Med. 1999. V. 29. № 3. P. 418.

31. *Morisco C., Zebrowski D., Condorelli G. et al.* The Akt-glycogen synthase kinase 3beta pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 19. P. 14466.

32. *Zheng M., Han Q.D., Xiao R.P.* Distinct beta-adrenergic receptor subtype signaling in the heart and their pathophysiological relevance // Acta Phisiol. Sinica. 2004. V. 56. № 1. P. 1.

33. *Colomer J.M., Mao L., Rockman H.A., Means A.R.* Pressure overload selectively up-regulates Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo // Mol. Endocrinol. 2003. V. 17. № 2. P. 183.

34. *Morel E., Marcantoni A., Gastineau M. et al.* cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy // Circ. Res. 2005. V. 97. № 12. P. 1296.

35. *Métrich M., Lucas A., Gastineau M. et al.* Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy // Circ. Res. 2008. V. 102. № 8. P. 959.

36. *Monceau V., Llach A., Azria D. et al.* Epac contributes to cardiac hypertrophy and amyloidosis induced by radiotherapy but not fibrosis // Radiother. Oncol. 2014. V. 111. № 1. P. 63.

37. *Métrich M., Laurent A.C., Breckler M. et al.* Epac activation induces histone deacetylase nuclear export via a Ras-dependent signalling pathway // Cell Signal. 2010. V. 22. № 10. P. 1459.

38. *Lezoualc'h F., Métrich M., Hmitou I. et al.* Small GTP-binding proteins and their regulators in cardiac hypertrophy // J. Mol. Cell. Cardiol. 2008. V. 44. № 4. P. 623.

39. *Li L., Cai H., Liu H., Guo T.* β-Adrenergic stimulation activates protein kinase Cε and induces extracellular signal-regulated kinase phosphorylation and cardiomyocyte hypertrophy // Mol. Med. Rep. 2015. V. 11. № 6. P. 4373.

40. *Métrich M., Morel E., Berthouze M. et al.* Functional characterization of the cAMP-binding proteins Epac in cardiac myocytes // Pharmacol. Rep. 2009. V. 61. № 1. P. 146.

41. *Laudette M., Coluccia A., Sainte-Marie Y. et al.* Identification pharmacological inhibitor Epac1 that protects heart against acute and chronic modelscardiac stress // Cardiovasc. Res. 2019. V. 115. № 12. P. 1766.

42. *Berthouze-Duquesnes M., Lucas A., Saulière A. et al.* Specific interactions between Epac1, β-arrestin2 and PDE4D5 regulatereceptor differential on cardiac hypertrophic signaling // Cell. Signal. 2013. V. 25. № 4. P. 970.

43. *Jin H., Fujita T., Jin M. et al.* Cardiac overexpression of Epac1 in transgenic mice rescues lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction and inhibits Jak-STAT pathway // J. Mol. Cell. Cardiol. 2017. V. 108. P. 170.

44. *Eghbali M.* Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation // Basic Res. Cardiol. 1992. V. 87. Suppl. 2. P. 183.

45. *Swaney J.S., Roth D.M., Olson E.R. et al.* Inhibition of cardiac myofibroblast formation and collagen synthesis by activation and overexpression of adenylyl cyclase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 2. P. 437.

46. *Yokoyama U., Patel H.H., Lai N.C. et al.* The cyclic AMP effector Epac integrates pro- and anti-fibrotic signals // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 17. P. 6386.

47. *Insel P.A., Murray F., Yokoyama U. et al.* cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis // Br. J. Pharmacol. 2012. V. 166. № 2. P. 447.

48. *Miller C.L., Cai Y., Oikawa M. et al.* Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1A: a key regulator of cardiac fibroblast activation and extracellular matrix remodeling in the heart // Basic Res. Cardiol. 2011. V. 106. № 6. P. 1023.

49. *Chen C., Du J., Feng W. et al.* β-Adrenergic receptors stimulate interleukin-6 production through Epac-dependent activation of PKCδ/p38 MAPK signalling in neonatal mouse cardiac fibroblasts // Br. J. Pharmacol. 2012. V. 166. № 2. P. 676.

50. *Che X., Wang X., Zhang J. et al.* Vitexin exerts cardioprotective effect on chronic myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via inhibiting myocardial apoptosis and lipid peroxidation // Am. J. Transl. Res. 2016. V. 8. № 8. P. 3319.

51. *Lorenzen J.M., Schauerte C., Hübner A. et al.* Osteopontin is indispensible for AP1-mediated angiotensin II-related miR-21 transcription during cardiac fibrosis // Eur. Heart J. 2015. V. 36. № 32. P. 2184.

52. *Pollard C.M., Desimine V.L., Wertz S.L. et al.* Deletion of osteopontin enhances β_2-adrenergic receptor-dependent anti-fibrotic signaling in cardiomyocytes // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 6. P. E1396.

53. *Surinkaew S., Aflaki M., Takawale A. et al.* Exchange protein activated by cyclic-adenosine monophosphate (Epac) regulates atrial fibroblast function and controls cardiac remodeling // Cardiovasc. Res. 2019. V. 115. № 1. P. 94.

54. *Fazal L., Laudette M., Paula-Gomes S. et al.* Multifunctional mitochondrial Epac1 controls myocardial cell death // Circ. Res. 2017. V. 120. № 4. P. 645.

55. *Hothi S.S., Gurung I.S., Heathcote J.C. et al.* Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart // Pflugers. Arch. 2008. V. 457. № 2. P. 253.

56. *Pereira L., Cheng H., Lao D.H. et al.* Epac2 mediates cardiac β1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca2+ leak and arrhythmia // Circulation. 2013. V. 127. № 8. P. 913.

57. *Neef S., Heijman J., Otte K. et al.* Chronic loss of inhibitor-1 diminishes cardiac RyR2 phosphorylation despite exaggerated CaMKII activity // Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2017. V. 390. № 8. P. 857.

58. *Li M., Hothi S.S., Salvage S.C. et al.* Arrhythmic effects of Epac-mediated ryanodine receptor activation in Langendorff-perfused murine hearts are associated with reduced conduction velocity // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2017. V. 44. № 6. P. 686.

59. *Lezcano N., Mariángelo J.I.E., Vittone L. et al.* Early effects of Epac depend on the fine-tuning of the sarco-

plasmic reticulum Ca^{2+} handling in cardiomyocytes // J. Mol. Cell. Cardiol. 2018. V. 114. P. 1.

60. *Bobin P., Varin A., Lefebvre F. et al.* Calmodulin kinase II inhibition limits the pro-arrhythmic Ca^{2+} waves induced by cAMP-phosphodiesterase inhibitors // Cardiovasc. Res. 2016. V. 110. № 1. P. 151.

61. *Pereira L., Bare D.J., Galice S. et al.* β-Adrenergic induced SR Ca2+ mediated Epac-NOS // J. Mol. Cell. Cardiol. 2017. V. 108. P. 8.

62. *Curran J., Tang L., Roof S.R. et al.* Nitric oxide-dependent activation of CaMKII increases diastolic sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes in response to adrenergic stimulation // PLoS One. 2014. V. 9. № 2. e87495.

63. *Maltsev V.A., Sabbah H.N., Higgins R.S. et al.* Novel, ultraslow inactivating sodium current in human ventricular cardiomyocytes // Circulation. 1998. V. 98. № 23. P. 2545.

64. *Belardinelli L., Giles W.R., Rajamani S. et al.* Cardiac late Na^+ current: proarrhythmic effects, roles in long QT syndromes, and pathological relationship to CaMKII and oxidative stress // Heart Rhythm. 2015. V. 12. № 2. P. 440.

65. *Dybkova N., Wagner S., Backs J. et al.* Tubulin polymerization disrupts cardiac β-adrenergic regulation of late INa // Cardiovasc. Res. 2014. V. 103. № 1. P. 168.

66. *Hegyi B., Bányász T., Izu L.T. et al.* β-adrenergic regulation of late Na^+ current during action potential is mediated by both PKA and CaMKII // J. Mol. Cell. Cardiol. 2018. V. 123. P. 168.

67. *Valli H., Ahmad S., Sriharan S. et al.* Epac-induced ryanodine receptor type 2 inhibits sodium currents in atrial and ventricular cardiomyocytes // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2018. V. 45. № 3. P. 278.

68. *Zhang M.X., Zheng J.K., Wang W.W. et al.* Exchange-protein activated by cAMP (EPAC) regulates L-type calcium channel in atrial fibrillation of heart failure model // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2019. V. 23. № 5. P. 2200.

69. *Doleschal B., Primessnig U., Wölkart G. et al.* TRPC3 contributes to regulation of cardiac contractility and arrhythmogenesis by dynamic interaction with NCX1 // Cardiovasc. Res. 2015. V. 106. № 1. P. 163.

70. *Tiapko O., Groschner K.* TRPC3 as a Target of Novel Therapeutic Interventions // Cells. 2018. V. 7. № 7. P. E83.

71. *Domínguez-Rodríguez A., Ruiz-Hurtado G., Sabourin J. et al.* Proarrhythmic effectsustained activation on TRPC3/4 in rat ventricular cardiomyocytes // J. Mol. Cell. Cardiol. 2015. V. 87. P. 74.

72. *Brette F., Blandin E., Simard C. et al.* Epac activator critically regulates action potential duration by decreasing potassium current in rat adult ventricle // J. Mol. Cell. Cardiol. 2013. V. 57. P. 96.

73. *Laudette M., Zuo H., Lezoualc'h F., Schmidt M.* Epac function and cAMP scaffolds in the heart and lung // J. Cardiovasc. Dev. Dis. 2018. V. 5. № 1. P. E9.

74. *Aflaki M., Qi X.Y., Xiao L. et al.* Exchange protein directly activated by cAMP mediates slow delayed-rectifier current remodeling by sustained β-adrenergic activation in guinea pig hearts // Circ. Res. 2014. V. 114. № 6. P. 993.

75. *Yang Z., Kirton H.M., Al-Owais M. et al.* Epac2-Rap1 signaling regulates species and susceptibility to cardiac arrhythmias // Antioxid. Redox. Signal. 2017. V. 27. № 3. P. 117.

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

S. A. Kryzhanovskii[a], *, T. D. Nikiforova[a], M. B. Vititnova[a], A. D. Durnev[a]

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

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

The second part of the review presents modern ideas about the role of Epac proteins in the regulation of inotropic and rhythmic functions of the heart, intercellular conjugation of cardiomyocytes and their apoptosis. The contribution of Epac proteins to the development of hypertrophy, fibrosis, and myocardial remodeling, as well as their role in the genesis of acute ischemic damage to the heart muscle and cardiac arrhythmias, is examined in detail.

Keywords: Epac1 proteins, Epac2 proteins, cardiomyocytes, inotropic and rhythmic activity, apoptosis, acute ischemia, hypertrophy, fibrosis, remodeling, cardiac arrhythmias, intracellular signaling pathways.