

УДК 577.113

МЕХАНИЗМЫ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ НУКЛЕОТИДОВ. МИНИОБЗОР**¹Муравлёва Л.Е., ¹Молотов-Лучанский В.Б., ²Муравлёв В.К., ¹Клюев Д.А.***¹Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда,
email: muravlev@inbox.ru, vilen53@mail.ru;**²Карагандинский государственный технический университет, Караганда*

В миниобзоре приведены результаты исследований механизмов высвобождения нуклеотидов из клеток во внеклеточное пространство. Основные механизмы высвобождения нуклеотидов из клеток: экзоцитоз, при участии специфических растворимых переносчиков, а также различных типов каналов (Maxi анионные каналы, регулируемые объемом анионные каналы, порообразующие каналы, образованные коннексинами, паннексинами, катионные каналы и т.д.). Суммированы представления о регуляции спонтанного и конститутивного высвобождения нуклеотидов. Обсуждается роль внеклеточных нуклеотидов, в частности, в процессе активации нейтрофилов.

Ключевые слова: внеклеточные нуклеотиды, механизмы высвобождения, регуляция**THE MECHANISMS OF NUCLEOTIDE RELEASE. MINI – REVIEW****¹Muravlyova L.E., ¹Molotov-Luchanskiy V.B., ²Muravlyov V.K., ¹Kluyev D.A.***¹Karaganda State Medical University, Karaganda, e-mail: muravlev@inbox.ru; vilen53@mail.ru;**²Karaganda State Technical University, Karaganda*

In the mini-review there are results of investigations of the nucleotide release mechanisms out of cell into the extracellular space. The basic pathways of cell release nucleotides include all exocytosis, specific soluble carriers and various types of channels (Maxi anion channels, volume-regulated anion channels, pore-forming channels, including connexins/ pannexins hemi-channels, cationic channels, etc.). The ideas about the regulation of spontaneous and constitutive release of nucleotides are summarized. The role of extracellular nucleotides, in particularly in the process of neutrophil activation is discussed.

Keywords: extracellular nucleotides, releasing mechanisms, regulation

В настоящее время не вызывает сомнения, что внеклеточные нуклеотиды/нуклеозиды играют большую роль в регуляции нормальных метаболических процессов, равно как участвуют в развитии и прогрессировании патологических состояний. Внимание исследователей, главным образом, направлено на изучение эффектов внеклеточных АТФ, АДФ и АМФ. В последнее время высказано мнение, что УДФ-глюкоза и другие комплексы УДФ с сахарами также высвобождаются из клеток во внеклеточное пространство для выполнения сигнальной функции. Это мнение основано на способности УДФ-глюкозы активировать P2Y₁₄ рецепторы. P2Y₁₄-рецепторы экспрессируются на мембранах клеток глии и периферических лейкоцитов, что позволило предположить участие УДФ-глюкозы в реализации воспалительного ответа [16].

Во внеклеточном пространстве АТФ и АДФ активируют P2Y рецепторы (ассоциированные с G-белками) [14]. АТФ также взаимодействует с P2X рецепторами (управляемые лигандом ионные каналы) [12] и с аденозиновыми рецепторами, ассоциированными с G-белками [8].

Внимание исследователей привлекает изучение механизмов выхода нуклеотидов во внеклеточное пространство. По мнению Lazarowski E.R. [16], высвобождение АТФ –

процесс регулируемый, характерный для большинства клеток, и сопровождающийся во многих случаях выходом уридиновых нуклеотидов. В физиологических условиях высвобождение нуклеотидов может происходить спонтанно и/или конститутивно, так и в ответ на стимул [15, 27]. Существуют два основных способа высвобождения нуклеотидов в физиологических условиях: экзоцитоз и проводящие/транспортные механизмы [15,16].

Praetorius H.A., Leipziger J. [27] предлагают следующую классификацию механизмов высвобождения нуклеотидов (АТФ) из клеток:

- 1) лизис, некроз, апоптоз;
- 2) транспорт через проводящую пору (канал);
- 3) транспорт при участии специфических растворимых носителей;
- 4) экзоцитоз.

Имеются определенные достижения в понимании механизма эвакуации АТФ из тромбоцитов и нейроэндокринных тканей. АТФ хранится в виде секреторных гранул, которые высвобождаются путем экзоцитоза [3]. Но и в этом случае могут быть вовлечены разные механизмы. В частности, обсуждается роль электрохимического потенциала и градиента рН, который создается V/H⁺-ATPase. В процессе экзоцитоза гранул

принимают участие компоненты цитоскелета, ионы кальция [2].

Кроме этого, описан другой механизм высвобождения АТФ путем везикулярного экзоцитоза. Найден белок (solute carrier, SLC 17A9), представитель семейства ионных транспортеров SLC17, который в настоящее время рассматривается как везикулярный нуклеотидный транспортер (VNUT), участвующий в процессе высвобождения АТФ из клеток различных тканей [29,10].

Во многих клетках высвобождение нуклеотидов происходит в отсутствие аппарата везикулярного экзоцитоза. Было предположено, что хлорные каналы, порообразующие белки и рецепторы ответственны за высвобождение АТФ. В частности, речь идет о Maxi анионных каналах (Maxi anion channels). Эти каналы имеют достаточно широкую пору, позволяющую осуществлять селективный транспорт натрия и галогенидов, а также разрешающую прохождение сигнальных молекул, таких как глутамат, АТФ и УДФ. Maxi анионные каналы также активируются при осмотическом сморщивания клеток, при ишемии и гипоксии [31, 32, 5].

Обсуждается роль других хлорных каналов – регулируемых объемом анионных каналов (volume-regulated anion channel, VRAC) в процессе высвобождения АТФ. Вероятная причина активации – осмотическое сморщивание клеток [22, 13].

Достаточно много исследований посвящено обсуждению механизмов высвобождения АТФ через порообразующие каналы. Лидирующие позиции в этих исследованиях занимают полуканалы, образованные коннексинами, паннексинами и другими белками [35]. Известно, что 6 коннексиновых субъединиц образует коннексон или полуканал. Два коннексона, расположенных на соседних клетках, образуют щелевой контакт, позволяющий клеткам обмениваться небольшими молекулами [21]. Получены данные о том, что некоторые коннексоны расположены не только в местах клеточных контактов. Такие полуканалы проницаемы для АТФ. Открытие каналов запускается деполяризацией мембраны, а также зависит от внутриклеточной концентрации ионов кальция. Увеличение уровня внутриклеточного кальция приводит к открытию полуканалов и к высвобождению АТФ из клеток. Снижение концентрации внеклеточного кальция путем Ca^{2+} – зависимой индукции конформационных изменений канала приводит к закрытию поры [19].

Также высказано мнение, что высвобождение АТФ из клеток при участии коннексинов связано с ответом на патологическое

воздействие [16]. Считается, что высвобождение АТФ при наличии медиаторов воспаления также может проходить при участии коннексинов и рассматривается как основной механизм, необходимый для активации нейтрофилов и иммунной защиты [6, 28, 9].

Паннексины (Panx) включают в себя три генных продукта: Panx1, Panx2 и Panx3. Паннексины не связаны с коннексинами. Но, также как и коннексины, паннексины образуют канал паннексон, который проницаем для небольших молекул, включая АТФ. Имеются противоречивые данные о влиянии ионов кальция на Panx. Так, Losovei S et al. [17] приводят данные о влиянии изменения цитозольной концентрации ионов кальция на Panx1 –активность. По мнению других исследователей, работа паннексона не зависит от концентрации внеклеточного кальция, но на нее влияет деполяризация мембраны. Panx1 открыт при потенциале покоя [35, 4, 24].

Высказано предположение, что высвобождение АТФ через Panx1 усиливается при увеличении концентрации калия. Эритроциты человека демонстрируют высокую механочувствительную канальную проводимость: при экспонировании клеток в среде с высокой концентрацией K^+ или при гипотоническом стрессе увеличивается высвобождения АТФ через Panx1 [18, 34].

Рассматриваются два возможных механизма участия Panx1 в высвобождении АТФ. Первый связан с формированием поры (канала), второй предполагает взаимодействие Panx1 с транспортером [11]. Высказано предположение, что Panx1 – опосредованное высвобождение АТФ в эпителиальных клетках воздухоносных путей связано с активацией Rho сигнальной системы. Вовлечение Rho/Rho киназ в перестройки цитоскелета облегчает транслокацию Panx1 к плазматической мембране и /или его взаимодействие с регуляторными белками [30].

Panx1 ассоциирован с P2X7 рецептором, активация которого приводит к образованию широкой поры, через которую могут проходить молекулы с массой до 900 Da, а также облегчает высвобождение АТФ [37]. Qiu F, Dahl G. предположили, что АТФ является аллостерическим ингибитором Panx1 по принципу отрицательной обратной связи. Высвобождение АТФ препятствует длительному открытию канала [39].

Показано, что фармакологические ингибиторы Panx1 тормозят высвобождение АТФ из клеток различных тканей, включая клетки легочного эпителия, эритроциты, нейтрофилы и т.д. [25, 30, 20, 28].

Обсуждается вопрос о возможном участии Panx1в гибели клетки. Механизмы

клеточной гибели связывают с длительной активацией *Panx1* и формированием большой поры, что нарушает градиенты ионов, или с путем длительной активации рецептора *P2X7* [26].

Кроме этого, в последнее время начато изучение участия канала *TRPV4* в процессе высвобождения АТФ. *TRPV4* канал – широко распространенный катионный канал, который действует как сенсор при различных физических стимулах, таких как тепло, осмотический стресс, сдвиг напряжения и растяжение [40,23]. Некоторые данные позволяют предположить, что *TRPV4* преобразуют физические раздражители для высвобождения АТФ. Предположено, что *TRPV4*-зависимый механизм вовлекает *Panx1* – опосредованный механизм высвобождения АТФ.

Внимание исследователей также привлекает вопрос о спонтанном или конститутивном высвобождении нуклеотидов. Спонтанное высвобождение АТФ имеет определенное физиологическое значение. Показано, что спонтанное высвобождение АТФ может быть связано с осцилляцией внутриклеточной концентрации ионов кальция [36].

Стимулированное высвобождение АТФ происходит по следующим механизмам: вследствие механической пертурбации клеток и в ответ на действие агонистов, в том числе, самих нуклеотидов [27].

Механическое стимулирование является общим триггером для высвобождения нуклеотидов если не из всех, то из большинства клеток. Механическое стимулирование может быть нефизиологическим, т.е. связанным с прямым повреждением мембран клеток, что и приводит к высвобождению АТФ. Слабое (не деструктивное) механическое воздействие на клетки стимулирует быстрый выход АТФ. Механизм и участники этого процесса до конца не ясны, но предположено, что наиболее подходящей кандидатурой является мультисенсорные каналы семейства *TRP* [41]. Выказано мнение, что ускорение движения крови по сосудам является триггером для высвобождения АТФ и других пиримидиновых нуклеотидов. Высвобождающиеся нуклеотиды участвуют в сдвиг-индуцированной регуляции сосудистого тонуса. Согласно этой модели, высвобождающиеся нуклеотиды связываются с эндотелиальными *P2* рецепторами, запуская синтез оксида азота и последующее расслабление гладкой мускулатуры.

Другим фактором, стимулирующим выход АТФ, является увеличение объема клеток в гипотонической среде [33]. Высвобождение АТФ наблюдается при увели-

чении объема эритроцитов (без гемолиза красных клеток), причем в процессе выхода АТФ непосредственное участие принимает *Panx1* [18].

Исследуется также агонист – стимулированный выход АТФ. Разнообразные по химической природе и свойствам соединения способны стимулировать выход АТФ. В частности, такой эффект был показан для альдостерона [1], тромбина [38] и ионов кальция. Имеющиеся результаты позволяют заключить, что агонист-стимулированный выход АТФ связан с механизмом экзоцитоза и с активацией образования пор, в частности, с участием *Panx1*.

Самостоятельный интерес вызывают исследования роли внеклеточных нуклеотидов в процессе активации нейтрофилов. Выказано мнение, что выход нуклеотидов является необходимым условием для активации нейтрофилов. *Chen et al.* показали, что нейтрофилы отвечают на инфекционные и воспалительные сигналы высвобождением АТФ (через полуканалы, образованные *Panx1*, по другим данным – коннексинами). Внеклеточная АТФ, взаимодействуя с рецепторами *P2Y2*, активировать нейтрофилы [7, 28, 9].

При патологических состояниях (гипоксия, ишемия, воспаление и др.) из различных клеток во внеклеточное пространство также высвобождаются нуклеотиды. Лизис клеток или некроз сопровождается прямым выходом нуклеотидов/нуклеозидов. При апоптозе выход АТФ происходит через полуканалы, образованные *Panx* [7].

Таким образом, высвобождение нуклеотидов из клеток в межклеточное пространство является феноменом, требующим систематического изучения. В настоящее время исследования механизмов выхода нуклеотидов во внеклеточное пространство носят достаточно разрозненный характер. В то же время ряд исследований, посвященных роли внеклеточных нуклеиновых кислот в развитии патологии у человека, включая наши результаты, показывает возможное направление поиска регуляторных имплементов становления и дальнейшего прогрессирования патологических клеточных инноваций. Вполне допустимо предполагать, что существуют как общие, так и специфичные для разных типов клеток механизмы высвобождения нуклеотидов/нуклеозидов. Систематизация и углубление исследований в этой области позволит расширить наши представления о фундаментальных ресурсных и активаторных началах гомеостатических и динамических молекулярных взаимодействий при развитии патологии у человека и определить новые мишени для лекарственного воздействия.

Список литературы

1. Aldosterone acts via an ATP autocrine/paracrine system: the Edelman ATP hypothesis revisited / Gorelik J., Zhang Y., Sanchez D. et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – № 102. – P. 15000–15005.
2. Burgoyne R.D., Morgan A. Secretory granule exocytosis // *Physiol Rev.* – 2003. – № 83. – P. 581–632
3. Corriden R., Insel P.A. Basal release of ATP: an autocrine–paracrine mechanism for cell regulation // *Sci Signal.* – 2010. – № 3. – P. 1–25
4. Dahl G, Locovei S. Pannexin: to gap or not to gap, is that a question? // *IUBMB Life.* – 2006. – № 58. – P. 409–419.
5. Dubyak G.R. Function without Form: An Ongoing Search for Maxi-Anion Channel Proteins // *Cell Research.* – 2008. – № 18. – P. 558–565.
6. Eltzschig H.K., Macmanus C.F. Colgan S.P. Neutrophils as sources of extracellular nucleotides: functional consequences at the vascular interface // *Trends Cardiovasc Med.* – 2008. – № 18. – P. 103–107.
7. Eltzschig H.K., Sitkovsky M.V., Robson S.C. Purinergic Signaling during Inflammation // *N Engl J Med.* – 2012. – № 367. – P. 2322–2333
8. Gessi S., Merighi S., Varani K., Borea P.A. Adenosine receptors in health and disease // *Adv Pharmacol.* – 2011. – № 61. – P. 41–75.
9. Grassi F. Purinergic Control of Neutrophil Activation // *J Mol Cell Biol.* – 2010. – № 2. P. 176–177.
10. Identification of a vesicular nucleotide transporter / Sawada K., Echigo N., Juge N. et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – № 105. – P. 5683–5686.
11. Imaging exocytosis of ATP-containing vesicles with TIRF 1 microscopy in lung epithelial A549 cells. / Akopova I, Tatur S, Grygorczyk M. et al. // *Purinergic Signal.* – 2012. – № 8. – P. 59–70.
12. Khakh B.S., North R.A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease // *Nature.* – 2006. – 442. – P. 527–532.
13. Koyama H.K., Droogmans T.K. C, Oike M.G. Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells // *J Gen Physiol.* – 2002. – № 119. P. 511–520.
14. Kügelgen I., Harden T.K. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors // *Adv Pharmacol.* – 2011. – № 61. – P. 73–415.
15. Lazarowski E.R., Sesma J.I., Seminario-Vidal L., Kreda S.M. Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release // *Adv Pharmacol.* – 2011. – № 61. – P. 221–261.
16. Lazarowski E.R. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release // *Purinergic Signal.* – 2012. – № 8. (3). – P. 359–373.
17. Locovei S., Wang J., Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium // *FEBS Lett.* – 2006. – № 580. – P. 239–244.
18. Locovei S., Bao L., Dahl G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – № 103. – P. 7655–7659.
19. Muller D.J., Hand G.M., Engel A., Sosinsky G.E. Conformational changes in surface structures of isolated connexin 26 gap junctions // *EMBO J.* – 2002. – № 21. – P. 3598–3607.
20. Multiscale approach to link red blood cell dynamics, shear viscosity, and ATP release / Forsyth A.M., Wan J., Owrutsky P.D. et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – № 108. – P. 10986–10991
21. Nakagawa S., Maeda S., Tsukihara T. Structural and functional studies of gap junction channels // *Curr Opin Struct Biol.* – 2010. – № 20. – P. 423–430.
22. Nilius B, Droogmans G. Amazing chloride channels: an overview // *Acta Physiol Scand.* – 2003. – № 177. – P. 119–147.
23. O’Neil RG, Heller S. The mechanosensitive nature of TRPV channels // *Pflugers Arch.* – 2005. – № 451. – P. 93–203.
24. Pannexin 1 Channels Link Chemoattractant Receptor Signaling to Local Excitation and Global Inhibition Responses at the Front and Back of Polarized Neutrophils / Bao Y, Chen Y, Ledderose C et al. // *J. Biol. Chem.* – 2013. – № 288. – P. 22650–22657.
25. Pannexin 1 contributes to ATP release in airway epithelia / Ransford GA, Fregien N, Qiu F. et al. // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2009. – № 41. – P. 525–534.
26. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex / Locovei S., Scemes E., Qiu F. et al. // *FEBS Lett.* – 2007. – № 581. – P. 483–488.
27. Praetorius H.A., Leipziger J. ATP release from non-excitable cells // *Purinergic Signalling.* – 2009. – Vol 5. – Issue 4. – P. 433–446.
28. Purinergic signaling: a fundamental mechanism in neutrophil activation / Chen Y., Yao Y., Sumi Y. et al. // *Sci Signal.* – 2010. – № 3. – 45 p.
29. Reimer R.J., Edwards R.H. Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family // *Pflugers Arch.* – 2004. – № 447. – P. 629–635.
30. Rho signaling regulates pannexin 1-mediated ATP release from airway epithelia / Seminario-Vidal L, Okada S.F, Sesma J.I. et al. // *J Biol Chem.* – 2011. – № 286. – 26277–26286.
31. Sabirov R., Okada Y. ATP release via anion channels // *Purinergic Signal.* – 2005. – № 1. – P. 311–328.
32. Sabirov R.Z., Okada Y. The maxi-anion channel: a classical channel playing novel roles through an unidentified molecular entity // *The Journal of Physiological Sciences.* – 2009. – Vol. 59. – Issue 1. – P. 3–21.
33. Sabirov R.Z., Dutta A.K., Okada Y. Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release // *J Gen Physiol.* – 2001. – № 118. – P. 251–266.
34. Sandilos J.K., Bayliss D. A. Physiological mechanisms for the modulation of pannexin 1 channel activity // *J. Physiol.* – 2012. – № 590. – P. 6257–6266.
35. Scemes E., Spray D.C., Meda P. Connexins, pannexins, innexins: novel roles of «hemi-channels» // *Pflugers Arch.* – 2009. – № 457. – P. 1207–1226.
36. Slow spontaneous [Ca²⁺]_i oscillations reflect nucleotide release from renal epithelia / Geyti C.S., Odgaard E., Jensen M.E. et al. // *Pflugers Archiv.* – 2008. – № 455 (6). – P. 1105–1117.
37. Suadicani S.O., Brosnan C.F., Scemes E. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling // *J Neurosci.* – 2006. – № 26. – P. 1378–1385.
38. Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of Rho- and Ca²⁺-dependent signaling pathways / Seminario-Vidal L, Kreda S, Jones L et al. // *J Biol Chem.* – 2009. – № 284. – P. 20638–20648.
39. Qiu F., Dahl G. A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2009. – № 296. – P. C250–C255.
40. Venkatachalam K., Montell C. TRP channels // *Annu Rev Biochem.* – 2007. – № 76. – P. 387–417.
41. Voets T., Nilius B. TRPs make sense // *J Membr Biol.* – 2003. – № 192. – P. 1–8.