

Received: 10.06.2018  
Accepted: 11.01.2019  
Published: 14.03.2019

## Możliwy udział erytrocytów w purynergicznej regulacji zaopatrzenia tkanek w tlen

### Possible contribution of erythrocytes to the purinergic regulation of tissue oxygen delivery

Jacek Sikora

Zakład Immunobiochemii, Katedra Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

#### Streszczenie

Uwalnianie ATP występuje we wszystkich typach komórek i tkanek, jest uznawane za główny element powszechnego, starego ewolucyjnie systemu komunikacji międzykomórkowej. Uważa się też, że regulowane uwalnianie ATP uczestniczy w mechanizmie ułatwiającym utrzymanie równowagi między podażą a popytem na tlen w tkankach. W artykule omówiono sygnalizację z udziałem ATP, przedstawiono zarys regulacji zaopatrzenia tkanek w tlen oraz koncepcję przypisującą erytrocytom udział w tym procesie przez uwalnianie ATP. Wysycenie hemoglobiny tlenem w erytrocytach wędrujących przez tkanki odzwierciedla poziom zużycia tlenu przez te tkanki. Erytrocyty mogą zatem pełnić rolę miejscowego czujnika poziomu tlenu. Według zaproponowanego mechanizmu, w wyniku odtlenowania hemoglobiny aktywacji ulega białko  $G_i$  w błonie komórkowej erytrocytu. W ten sposób uruchomiony zostaje zależny od cAMP szlak sygnałowy prowadzący do wypływu ATP przez kanały paneksynowe. Zewnątrzkomórkowy ATP działa wazodylatacyjnie poprzez receptory P2Y na powierzchni komórek śródbłonna naczyń krwionośnych, co zwiększa przepływ krwi w rejonach o podwyższonym zużyciu tlenu. Mimo wielu przekonujących dowodów, które mogą potwierdzać przedstawioną koncepcję, pewne szczegóły pozostają niewyjaśnione, zwłaszcza sposób aktywacji białka  $G_i$ . Kontrowersje budzi też udział cAMP i ostateczna droga wypływu ATP z erytrocytów. Dalszych badań *in vivo* wymagać będzie określenie faktycznego znaczenia fizjologicznego proponowanego mechanizmu regulacyjnego.

Słowa kluczowe:

sygnalizacja purynergiczna • erytrocyty • ATP • transport tlenu

#### Summary

ATP release occurs in virtually all cell types and tissues. It is considered to be a key component of a ubiquitous, evolutionary ancient cell-to-cell communication system. The regulated release of ATP is also believed to be a part of a mechanism which facilitates matching tissue oxygen supply with demand. In this paper, ATP signaling is reviewed, regulation of tissue oxygen supply is outlined, and a concept attributing a role in this process to erythrocytes releasing ATP is discussed. Oxygen saturation of hemoglobin in erythrocytes traveling through a tissue reflects the level of oxygen utilization of that tissue. Therefore, erythrocytes can serve as local oxygen sensors. In the proposed mechanism, upon hemoglobin deoxygenation,  $G_i$  protein in the erythrocyte plasma membrane is activated. The activation of  $G_i$  protein initiates a cAMP-dependent pathway, leading to ATP efflux through pannexin channels. Extracellular ATP triggers vasodilatation via P2Y receptors on the surface of vascular endothelial cells, increasing blood

	flow in tissue regions of elevated oxygen consumption. Despite the abundance of compelling evidence in support of this concept, some details remain elusive, in particular, the process of G <sub>i</sub> protein activation in response to hemoglobin desaturation. Furthermore, the involvement of cAMP, as well as the final conduit of ATP release from erythrocytes, remains controversial. Finally, the actual physiological relevance of the proposed regulatory mechanism will require further in vivo research.
<b>Keywords:</b>	<b>purinergic signaling • erythrocytes • ATP • oxygen delivery</b>
<b>GICID</b>	01.3001.0013.1087
<b>DOI:</b>	10.5604/01.3001.0013.1087
<b>Word count:</b>	4382
<b>Tables:</b>	1
<b>Figures:</b>	2
<b>References:</b>	89

**Adres autora:** Jacek Sikora, Zakład Immunobiochemii, Katedra Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań; e-mail: jmsikora@ump.edu.pl

**Wykaz skrótów:** **AC** – cyklaza adenylanowa (adenylyl cyclase); **ADP** – adenozyndifosforan (adenosine diphosphate); **AMP** – adenozynomonofosforan (adenosine monophosphate); **ANP** – przedsionkowy peptyd natriuretyczny (atrial natriuretic peptide); **ATP** – adenozynotrifosforan (adenosine triphosphate); **cAMP** – cykliczny adenozynomonofosforan (cyclic adenosine monophosphate); **CFTR** – przezłonowy regulator transportu jonów (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator); **cGMP** – cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan (cyclic guanosine monophosphate); **cPLA<sub>2</sub>** – cytozolowa fosfolipaza A<sub>2</sub> (cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>); **EDCF** – czynnik skurczający pochodzenia śródbłonkowego (endothelium-derived constricting factor); **EDHF** – czynnik hiperpolaryzujący pochodzenia śródbłonkowego (endothelium-derived hyperpolarizing factor); **EDRF** – czynnik rozluźniający pochodzenia śródbłonkowego (endothelium-derived relaxing factor); **EET** – kwas epoksyekoizatrienowy (epoxyeicosatrienoic acid); **eNOS** – śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (endothelial nitric oxide synthase); **ENTPD1** – ektonukleotydaza difosfohydrolaza trifosforanów nukleozydów-1 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1, CD39); **ER** – retikulum endoplazmatyczne (endoplasmic reticulum); **GPCR** – receptor sprzężony z białkiem G (G-protein-coupled receptor); **GSNO** – S-nitrozoglutation (S-nitrosoglutathione); **IP** – receptor dla prostacykliny (prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin) receptor); **IP<sub>3</sub>** – trifosforan inozytoli (inositol trisphosphate); **L-NAME** – ester metylowy N<sup>ω</sup>-nitro-L-argininy, inhibitor syntazy tlenu azotu (N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester); **MDR** – białko oporności wielolekowej (multidrug resistance protein); **ORCC** – kanał usuwający jony chlorkowe z komórki (outwardly rectifying chloride channel); **Panx1, 2, 3** – paneksyna 1, 2, 3, (pannexin 1, 2, 3); **PDE3B** – fosfodiesteraza 3B (phosphodiesterase 3B); **PGI<sub>2</sub>** – prostacyklina (prostacyclin, prostaglandin I<sub>2</sub>); **PKA** – kinaza białkowa A (protein kinase A); **pl-VDAC-1** – kanał anionowy zależny od napięcia-1, wariant splicingowy swoisty dla błony komórkowej (voltage-dependent anion channel-1, plasmalemmal splice variant); **pO<sub>2</sub>** – ciśnienie cząstkowe tlenu; **SNO-Hb** – S-nitrozoooksyhemoglobina; **SOC** – kanał wapniowy aktywowany w wyniku opróżnienia wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia (store-operated calcium channel); **SUR** – receptor dla sulfonilomocznika (sulphonylurea receptor); **UDP** – urydyno-5'-difosforan (uridine diphosphate); **VDAC** – kanał anionowy zależny od napięcia (voltage-dependent anion channel); **VIP** – wazoaktywny peptyd jelitowy (vasoactive intestinal peptide); **VSOAC** – kanał anionowy dla osmolitów zależny od objętości (volume-sensitive organic osmolyte and anion conductance, syn.); **VSOR** – volume-sensitive outwardly rectifying anion channel; **VRAC** – volume-regulated anion channel.

## WPROWADZENIE

Długo sądzono, że funkcja erytrocytów w zaopatrywaniu tkanek w tlen sprowadza się do biernego przeniesienia gazów oddechowych. Wiele dowodów wskazuje jednak, że ich rola może być bardziej złożona. Podobnie

jak komórki innych typów, erytrocyty zdolne są do uwalniania adenozyno-5'-trifosforanu (ATP) do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. ATP oraz produkty jego rozkładu działają tu jako cząsteczki sygnałowe i za pośrednictwem receptorów nukleotydowych mogą oddziaływać autokrynowo i parakrynowo, na same erytrocyty i na

inne komórki krwi oraz na komórki śródbłonka naczyń. Uważa się, że erytrocyty uwalniając ATP mogą aktywnie uczestniczyć w kontroli zaopatrzenia tkanek w tlen przez regulację światła naczyń krwionośnych, za pośrednictwem receptorów nukleotydowych na powierzchni komórek śródbłonka [34].

## ATP JAKO CZĄSTECZKA SYGNAŁOWA

### Fizjologiczne działanie ATP

Działanie fizjologiczne pochodnych adeniny dostrzeżono już w 1929 r. – tym samym, w którym Karl Lohmann i Cyrus Hartwell Fiske niezależnie odkryli rolę ATP jako źródła energii w mięśniach [36, 56]. Obserwacji tej dokonano w eksperymentach wykazujących występowanie bradykardii zatokowej i spadek ciśnienia krwi u psów, którym dożylnie podawano nukleozydy i nukleotydy adeninowe [28, 61]. Badania te uznaje się za pierwsze, w których dostrzeżono regulacyjne działanie pozakomórkowych puryn. W latach pięćdziesiątych XX w. po raz pierwszy opisano wazodylatacyjne działanie ATP [29]. W następnej dekadzie natomiast wykazano rolę adenozyliny jako czynnika regulującego przepływ krwi w naczyniach wieńcowych [3]. Zaproponowano wtedy mechanizm negatywnego sprzężenia zwrotnego, w którym wzrost zapotrzebowania na tlen w kardiomiocytach (np. podczas wysiłku fizycznego), odzwierciedlany przez spadek ciśnienia cząstkowego tlenu ( $pO_2$ ) w tych komórkach, doprowadza do wypływu adenozyliny, która działa na swoiste receptory na powierzchni komórek mięśni gładkich ściany tętniczek wieńcowych, powodując wazodylację. Wywołuje to wzrost przepływu krwi, dzięki czemu  $pO_2$  w kardiomiocytach wraca do równowagi. W latach siedemdziesiątych ub.w. odkryto rolę sygnałową ATP w układzie nerwowym. W 1972 r. Geoffrey Burnstock przedstawił koncepcję neurotransmisji purynergiczej (nazwa utworzona przez analogię do sygnalizacji cholinergiczej i adrenergicznej) z udziałem nukleotydów purynowych, a następnie przedstawił dowody na to, że ATP działa jako kotransmitter w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym [6, 11]. Ze względu na dobrze ugruntowaną wiedzę o roli ATP jako przenośnika energii w układach biologicznych, do koncepcji przypisującej ATP rolę cząsteczki sygnałowej długo odnoszono się ze sceptycyzmem [10]. Obecnie jednak rola sygnałowa ATP nie budzi wątpliwości i uważa się, że ATP, inne nukleotydy oraz nukleozydy purynowe, są uwalniane przez komórki wszystkich typów i działają zarówno w neurotransmisji, jak i w oddziaływaniach autokrynowych i parakrynowych [69]. Funkcja sygnałowa ATP i innych nukleotydów purynowych opisano zarówno u kręgowców jak i bezkręgowców, tak w świecie zwierząt jak i roślin, grzybów, protistów i bakterii, co skłania do uznania puryn za najpowszechniejsze cząsteczki sygnałowe [15, 18, 85].

Sygnalizację purynergiczną uważa się za mechanizm stary ewolucyjnie. Dowiedziono, że ATP działa jako chemorepelent u dwóch przedstawicieli protistów: *Tetrahymena*

*thermophila* i *Paramecium tetraurelia*. W organizmach tych ATP wywołuje depolaryzację błony i działa poprzez zmiany w wewnątrzkomórkowym poziomie jonów  $Ca^{2+}$  [52, 89]. Wydaje się prawdopodobne, że sygnalizacja z udziałem ATP wyewoluowała z wczesnych układów, w których zewnątrzkomórkowy ATP, uwalniający się z uszkodzonych komórek był sygnałem o niebezpieczeństwie [20]. Wykazany w badaniach z użyciem mysich tymocytów i komórek linii Jurkat wpływ ATP z komórek apoptotycznych działa jako stymulujący fagocytozę, sygnał parakrynowy, uczestniczący w rekrutacji monocytów i makrofagów [30]. Wykazano też, że ATP ukierunkowuje migrację ludzkich i mysich neutrofilów na zasadzie oddziaływań autokrynowych. Uwalniany na czele komórki (w rejonie umiejscowionym najbliżej źródła sygnału chemotaktycznego), wzmacnia pierwotny sygnał chemotaktyczny i wyznacza kierunek migracji [17].

Sygnalizacja purynergiczna działa w układzie nerwowym [9], w odpowiedzi immunologicznej [12, 48], stanach zapalnych [43], przewodnictwie bólowym [51], agregacji płytek [14], wazodylatacji z udziałem komórek śródbłonka [22] oraz regulacji proliferacji [75] i śmierci komórek [60, 86]. Ekspresję receptorów nukleotydowych wykryto w błonie komórek nabłonkowych, mięśni gładkich budujących ścianę naczyń krwionośnych, w błonie erytrocytów oraz na powierzchni komórek wszystkich układów i narządów [14, 42, 71, 80]. Wyczerpujący przegląd literatury donoszącej o występowaniu poszczególnych podtypów receptorów przedstawił G. Burnstock i G. E. Knight [13].

## RECEPTORY NUKLEOTYDOWE

Zidentyfikowano wiele receptorów nukleotydowych, dla których agonistami są zarówno ATP, jak i inne pochodne adeniny oraz UTP, UDP i UDP-glukoza. Ponieważ działanie nukleotydów pirymidynowych jako ich agonistów zaobserwowano później, w literaturze cały czas funkcjonuje określenie „receptory purynergiczne” (purinergic receptors) [58]. Receptory nukleotydowe dzieli się na dwa typy, P1 dla adenozyliny i P2 dla ATP/ADP, UTP/UDP. Ze względu na mechanizm transdukcji sygnału typ P2 dzieli się dalej na rodzinę P2X, do której należą receptory będące kanałami jonowymi bramkowanymi ligandem (jonotropowe) i rodzinę P2Y, do której zalicza się receptory związane z białkiem G (metabotropowe) (tab. 1) [7].

Aktywacja receptorów rodziny P2X zmienia konformację w obrębie kanału błonowego, która powoduje otwarcie kanału i napływ do wnętrza komórki jonów  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$  i depolaryzację błony komórkowej. Depolaryzacja aktywuje kanały wapniowe bramkowane napięciem, umożliwiając dalszy napływ jonów  $Ca^{2+}$ , wzmagający depolaryzację. Receptory z rodziny P2Y należące do grupy receptorów GPCR (G-protein-coupled receptors) wiążą z różnym powinowactwem i w zależności od podtypu: ATP, ADP lub UTP i UDP. Współdziałają one z

białkami  $G_q$ ,  $G_i$  lub  $G_s$ , a ich aktywacja zmienia wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP lub  $Ca^{2+}$ , uwalniane z retikulum endoplazmatycznego przez kanały otwierane z udziałem trifosforanu inozytolu ( $IP_3$ ). Dotąd zidentyfikowano siedem podtypów receptorów w obrębie rodziny P2X ( $P2X_1 - P2X_7$ ) i osiem – w obrębie rodziny P2Y ( $P2Y_1, P2Y_2, P2Y_4, P2Y_6, P2Y_{11} - P2Y_{14}$ ) [53].

Selektywne blokery receptorów nukleotydowych znajdują zastosowanie terapeutyczne. Kłopidogrel, nieodwracalnie hamujący receptory  $P2Y_{12}$  na powierzchni płytek krwi jest szeroko stosowany w zapobieganiu zakrzepom w chorobach układu krążenia. Przedmiotem badań jest możliwość wykorzystania związków hamujących inne receptory nukleotydowe, mogących mieć znaczenie w terapii bólu, reumatoidalnego zapalenia stawów, zespołu suchego oka, zespołu jelita nadwrażliwego, chorób zapalnych jelit oraz w terapii nowotworów [51].

Poziom zewnątrzkomórkowego ATP w świetle naczyń krwionośnych jest ściśle kontrolowany, a jego rozkład może być źródłem cząsteczek, które również pełnią funkcje sygnałowe. W degradacji ATP uczestniczą egzonukleotydazy wydzielane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz związane z błoną ektonukleotydazy, których część katalityczna jest umiejscowiona po stronie zewnątrzkomórkowej. Jedną z nich jest ektonukleotydaza difosfohydrolazatrifosforanów nukleozydów – 1 (ENTPDaza-1, CD39) występująca w układzie naczyniowym, katalizująca rozkład ATP do ADP i ADP do AMP. AMP może ulec dalszej degradacji przez defosforylację z udziałem ekto-5'-nukleotydazy (CD73) [27].

#### Uwalnianie ATP z komórek

Sposób, w jaki ATP pokonuje barierę błony komórkowej w wielu przypadkach pozostaje niewyjaśniony [8]. Bez względu na typ komórki, uwalnianie ATP może być wynikiem lizy komórki, nekrozy lub apoptozy, odbywać się na drodze transportu przez pory lub kanały błonowe, albo transportu z udziałem swoistych przekaźników błonowych lub dokonywać się w procesie egzocytozy. Lityczny wypływ ATP w badaniach nad kontrolowanym uwalnianiem ATP jest na ogół pomijany, bo większość

badaczy nie przypisuje tej drodze dużego znaczenia w warunkach fizjologicznych. Sugeruje się najwyżej, że mogłaby odgrywać rolę w stanach patologicznych [69].

W układzie nerwowym mechanizm uwalniania ATP został stosunkowo dobrze poznany; odbywa się w wyniku egzocytozy pęcherzyków na błonie presynaptycznej [6]. Natomiast w doniesieniach na temat możliwych dróg nielitycznego wypływu ATP z komórek innych typów obok egzocytozy sugeruje się przekaźniki błonowe, takie jak białka mające kasetę wiążącą ATP (ABC transporters), a w szczególności CFTR, MDR (multidrug resistance protein) oraz receptory sulfonilomocznika (SUR), a ponadto półkanały koneksynowe oraz kanały paneksynowe, anionowe (VSOAC, p1-VDAC-1) i receptor  $P2X_7$  [54, 76]. Wydaje się, że wzrost zewnątrzkomórkowej puli ATP może zachodzić też w procesie syntezy *de novo* przez  $F_1-F_0$  ATP-azę obecną w błonie komórkowej niektórych typów komórek [64].

#### Rola CFTR

Jednym z kanałów błonowych, który - jak sugerowano - mógłby uczestniczyć w mechanizmie wypływu ATP z erytrocytów jest przezbłonowy regulator transportu jonów (CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Białko to, samo będące kanałem dla jonów  $Cl^-$ , odpowiada w komórkach epitelialnych za regulację przepływu tych jonów przez ORCC – kanały usuwające jony chlorkowe z komórki (outwardly rectifying chloride channels). Oprócz komórek epitelialnych obecność tego transportera wykazano w błonie komórek mięśni gładkich, komórkach śródbłonna, a także w błonie erytrocytów. Mimo przesłanek o uczestnictwie CFTR w uwalnianiu ATP, jego właściwa rola w tym procesie pozostaje niewyjaśniona. Dowodzone, że aktywacja CFTR pod wpływem kinazy białkowej A (PKA), zależna od cAMP, powoduje wypływ ATP przez CFTR, co wywołuje stymulację wypływu  $Cl^-$  przez ORCC za pośrednictwem receptorów P2 [77]. Jednak w późniejszych badaniach nie zdołano potwierdzić występowania wypływu ATP bezpośrednio przez CFTR [41, 78]. Mimo to, udział tego kanału na jakimś etapie uwalniania ATP został potwierdzony w eksperymentach z udziałem inhibitorów farmakologicznych oraz w doświadczeniach na erytrocytach

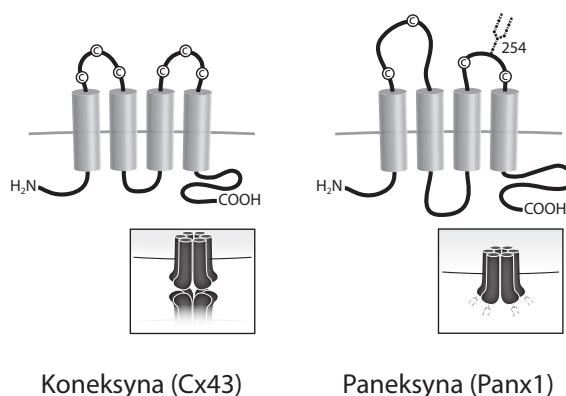
**Tabela 1.** Najsilniejsze endogenne agonisty receptorów nukleotydowych człowieka

Agonista	Receptor
ATP	$P2X_1 - P2X_7, P2Y_2, P2Y_{11}$
ADP	$P2Y_1, P2Y_{12}, P2Y_{13}$
UTP	$P2Y_2, P2Y_4$
UDP	$P2Y_6, P2Y_{14}$
UDP-glukoza	$P2Y_{14}$
Adenozyna	$A_{1r}, A_{2Ar}, A_{2Br}, A_3$

osób chorych na mukowiscydozę, w wyniku mutacji pozbawionych aktywnego CFTR. U chorych tych nie występował, stwierdzony u osób zdrowych wpływ ATP z krwinek czerwonych pod wpływem deformacji mechanicznej [81]. Wydaje się zatem, że sam CFTR nie jest drogą, którą wypływa ATP, natomiast może pełnić rolę regulatora innego szlaku uwalniania tej cząsteczki. Podejrzewano, że rola CFTR mogłaby polegać na regulacji równowagi jonowej po obu stronach błony erytrocytu, podczas uwalniania silnie ujemnie naładowanych cząsteczek ATP [2]. Przede wszystkim jednak, upatruje się rolę CFTR w kontroli kanałów paneksynowych (Panx1) [83].

### Kanały paneksynowe

Kanały paneksynowe (paneksyny) są zbudowane z paneksyn. Białka te występują u człowieka i innych kręgowców, zaklasyfikowano je jako białka tworzące połączenia szczelinowe (gap junctions) ze względu na częściową homologię z ineksynami, białkami tworzącymi tego typu połączenia u bezkręgowców [67]. Strukturalnie paneksyny wykazują cechy wspólne z koneksynami, wcześniej opisaną rodziną białek tworzących połączenia szczelinowe u kręgowców, choć ich sekwencja aminokwasowa nie wykazuje z nimi homologii (ryc. 1). Tak jak koneksyny, paneksyny mają cztery domeny przezbłonowe, dwie pętle zewnętrzkomórkowe, pętlę cytoplazmatyczną i końce N i C po stronie cytoplazmy. W obrębie pętli zewnętrzkomórkowych paneksyny zawierają cztery a koneksyny sześć konserwatywnych reszt cysteinowych. Ponadto, Panx1 i Panx3 mają po jednym rejonie ulegającym glikozylacji w obrębie odpowiednio drugiej i pierwszej pętli. Panx1 w błonie komórkowej tworzą heksamery (paneksyny) [74]. Wydaje się, że paneksyny, zbudowane z białek ulegających glikozylacji nie tworzą połączeń szczelinowych, ponieważ taka modyfikacja w obrębie fragmentów zewnętrzkomórkowych białka uniemożliwia połączenie z kanałami w błonie sąsiednich komórek. Umożliwiają raczej wymianę cząsteczek między przestrzenią wewnątrz- i zewnętrzkomórkową. Wiele właściwości tych kanałów sprawia, że paneksyny (Panx1) są dobrym kandydatem na pośrednika w uwalnianiu ATP: Są nieselektywnie przepuszczalne dla cząsteczek o masie <900 Da [68]. Ponadto, mogą ulegać aktywacji pod wpływem depolaryzacji błony w fizjologicznym zakresie (w odróżnieniu od kanałów koneksynowych, których otwarcie w warunkach eksperymentalnych wymaga bardzo silnej depolaryzacji). Ulegają aktywacji przy zewnętrzkomórkowych stężeniach jonów  $Ca^{2+}$  w zakresie fizjologicznym, mogą ulegać aktywacji pod wpływem stymulacji mechanicznej i w warunkach spadku poziomu energetycznego komórki, a także pod wpływem wzrostu wewnętrzkomórkowego stężenia jonów  $Ca^{2+}$ . W eksperymentach na oocytach *Xenopus* z ekspresją kanałów paneksynowych wykazano przepuszczalność tych kanałów dla ATP pod wpływem depolaryzacji i stymulacji mechanicznej [1].



**Ryc. 1.** Schemat struktury koneksyn i paneksyn w błonie komórkowej na przykładzie białek Cx43 i Panx1; u góry: mimo braku homologii na poziomie sekwencji aminokwasowej topologicznie oba białka mają wiele cech wspólnych. Zawierają cztery domeny przezbłonowe, dwie pętle po zewnętrznej stronie błony oraz jedną pętlę i domeny N- i C-końcowe po stronie cytoplazmatycznej. Koneksyny mają trzy, a paneksyny dwie reszty cysteinowe w obrębie każdej z pętli zewnętrzkomórkowych (oznaczone symbolem ©). Panx1 ma miejsce glikozylacji w pozycji 254 łańcucha aminokwasowego; u dołu: koneksyny i paneksyny ulegają oligomeryzacji, tworząc heksamery określane mianem koneksonów i paneksonów. Koneksyny w błonach dwóch sąsiadujących komórek tworzą połączenia szczelinowe, natomiast paneksyny prawdopodobnie tworzą kanały otwierające się do przestrzeni zewnętrzkomórkowej

### MOŻLIWOŚĆ UWALNIANIA ATP PRZEZ ERYTROCYTY

W erytrocytach, brak organelli i przedziałów wewnętrzkomórkowych determinuje niezdolność tych komórek do efektywnej egzocytozy [70]. Zatem, skoro w dojrzałych erytrocytach zjawisko egzocytozy, w takim sensie jak w komórkach jądrazystych nie występuje, jedynym możliwym mechanizmem regulowanego uwalniania ATP wydaje się wypływ przez pory albo kanały błonowe lub transport w poprzek błony przez swoiste przenośniki.

Wiele komórek, w których stwierdzono wypływ ATP przez kanały, wykazuje w błonie obecność Panx1. Należą tu erytrocyty, komórki nabłonka dróg oddechowych, astrocyty, makrofagi, hepatocyty, limfocyty, komórki kanalików nerkowych i komórki przysadki mózgowej. W erytrocytach, astrocytach, komórkach nabłonka dróg oddechowych, makrofagach i komórkach przysadki stwierdzono osłabienie lub całkowite zniesienie wypływu ATP w wyniku wyciszenia lub wyłączenia ekspresji Panx1, co wskazuje na udział paneksonów w uwalnianiu ATP, przynajmniej w niektórych typach komórek [23]. Sridharan i wsp. dostarczyli dowodów potwierdzających hipotezę o pośrednictwie kanałów paneksynowych erytrocytów, w uwalnianiu ATP pod wpływem hipoksji, wykazując, że stymulowany w ten sposób wypływ ATP jest hamowany przez karbenoksolon, probenecyd i peptyd  $^{10}panx1$  – trzy odmienne strukturalnie inhibitory paneksyny-1. Opisali też brak hamującego działania tych inhibitorów na wypływ ATP



stymulowany iloprostem, agonistą receptora prostacykliny (IP), co skłoniło autorów do wniosku, że poza paneksonami w erytrocytach funkcjonuje jeszcze inna droga wypływu ATP [83]. Ci sami autorzy w innej pracy dowodzą, że rolę tę mogłyby pełnić kanały anionowe zależne od napięcia VDAC1, których obecność w błonie erytrocytów wykazano za pomocą swoistych przeciwciał. Hipoteza ta sformułowana została w oparciu o wyniki eksperymentów z udziałem inhibitorów VDAC, Bcl-xL BH44 -23 i TRO19622, w których wykazano hamowanie wypływu ATP z erytrocytów stymulowanych agonistami receptora prostacykliny [84].

Hamujący wpływ karbenoksolonu oraz <sup>10</sup>Panx1 na uwalnianie ATP przez erytrocyty stwierdzono też w przypadku stymulacji przez zwiększenie stężenia cAMP (wskutek działania forskoliny i papaweryny) [63]. Jednak w cytowanej pracy dostrzeżono również wpływ ATP niewrażliwy na karbenoksolon, który wydawał się występować bez związku ze stymulacją wzrostu poziomu cAMP. Jak twierdzą autorzy, było to raczej rezultatem mechanicznych perturbacji, na które narażone były erytrocyty w zastosowanym układzie eksperymentalnym.

Do wypływu ATP dochodzi też pod wpływem stymulacji receptorów  $\beta$ -adrenergicznych na powierzchni erytrocytów, za pomocą izoprenaliny (isoproterenol) lub adrenaliny. Znaczenie tego szlaku pozostaje jednak niewyjaśnione. Sugeruje się, że może odgrywać rolę w przebiegu dojrzewania komórek erytroidalnych, przed uwolnieniem ich do krwiobiegu, a w dojrzałych erytrocytach jest pozostałością po wcześniejszych etapach ich rozwoju. Próby ustalenia mechanizmu uwalniania ATP pod wpływem tego rodzaju stymulacji za pomocą inhibitorów farmakologicznych dają częściowo sprzeczne wyniki, niemniej sugerują istnienie innej, jak dotąd niezidentyfikowanej drogi wypływu ATP, niezależnej zarówno od paneksyn jak i kanałów VDAC [63, 84].

Tak więc, za najważniejszą drogę wypływu ATP z erytrocytów uznaje się obecnie kanały paneksynowe. Aktywacja receptora prostacykliny powoduje natomiast wypływ ATP, prawdopodobnie z udziałem kanałów VDAC [84]. Wiele dowodów wskazuje jednak, że wypływ ATP z erytrocytów odbywa się również, jak dotąd niezidentyfikowanymi drogami, niezależnymi od paneksyn i kanałów VDAC. Do potencjalnych mechanizmów uwalniania ATP z erytrocytów należy również hemoliza [40, 55, 57].

## REGULACJA ZAOPATRZENIA TKANEK W TLEN

Zapewnienie optymalnego ukrwienia odbywa się przez modulację działania dwóch efektorów, jakimi są mięsień sercowy oraz mięśnie gładkie naczyń krwionośnych. W odpowiedzi na zapotrzebowanie metaboliczne zmienia się ilość krwi tłoczzonej przez serce oraz szerokość naczyń krwionośnych. Regulacja ukrwienia odbywa się z udziałem czynników nerwowych i humoralnych. Mechanizmy regulacyjne mają charakter ogólnoustrojowy (układ nerwowy i hormonalny), miejscowy (auto-

regulacja, metabolity o działaniu wazodylatacyjnym i wazokonstrykcyjnym) i zachodzą z udziałem nerwów okołonaczyniowych, hormonów i komórek śródbłonna i mięśniówki naczyń. Za regulację nerwową odpowiada układ autonomiczny, wysyłający działające antagoniście, współczulne i przywspółczulne zakończenia nerwowe do tętniczek, naczyń oporowych i wszystkich naczyń zawierających mięśnie gładkie. Współczulne nerwy noradrenergiczne zwiększają napięcie naczyń, podczas gdy przywspółczulne nerwy cholinergiczne działają rozkurczająco za pośrednictwem mediatorów, takich jak tlenek azotu (NO), uwalnianych przez komórki śródbłonna bądź same komórki mięśniówki naczyń [5, 37]. Na zakończeniach nerwów współczulnych uwalniana jest noradrenalina (NA) oraz ATP, działający synergistycznie, jako kotransmitter. ATP działa tu za pośrednictwem receptorów P2X, wywołując wraz z NA skurcz mięśniówki naczyń [7].

Endokrynowa, ogólnoustrojowa regulacja napięcia naczyniowego odbywa się z udziałem hormonów o działaniu rozkurczającym, takich jak kininy, VIP, przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ANP) i naczynioskurczowym - wazopresyna, adrenalina, angiotensyna II [47]. Regulacja miejscowa natomiast odbywa się na zasadzie autoregulacji miogennej (zdolność ścian naczyń do zmiany napięcia w zależności od mechanicznej siły rozciągającej ścianę) oraz z udziałem parakrynowych czynników wazoaktywnych wydzielanych przez komórki śródbłonna naczyniowego [16, 24]. Zalicza się do nich mediatory o działaniu wazodylatacyjnym i wazokonstrykcyjnym, uwalniane pod wpływem stymulacji nerwowej, działania hormonów, substancji pochodzenia płytkowego oraz w wyniku działania siły ścinającej. Do śródbłonkowych czynników rozluźniających (EDRF) należą tlenek azotu, a także prostacyklina (PGI<sub>2</sub>) i czynnik hiperpolaryzujący pochodzenia śródbłonkowego (EDHF). Natura EDHF pozostaje nieznana. Jego rolę przypisuje się jonom potasu, kwasom epoksy-eikozatrienowym (EET) i nadtlenu wodoru. Wydaje się też, że za skutki przypisywane EDHF mogą odpowiadać mioepitelialne połączenia szczelinowe [49, 73]. Do śródbłonkowych czynników skurczających (EDCF) zalicza się: endotelinę-1, angiotensynę, tromboksan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), prostaglandynę H<sub>2</sub> i reaktywne formy tlenu (ROS) [65]. Pozakomórkowy ATP pochodzący ze światła naczyń, uwalniany pod wpływem siły ścinającej przez komórki śródbłonna, agregujące płytki, a także przez erytrocyty, wpływa na komórki śródbłonna głównie za pośrednictwem receptorów P2Y działając w tym wypadku wazodylatacyjnie, przez stymulację uwalniania czynników rozkurczających pochodzenia śródbłonkowego (EDRF) [14]. Komórki śródbłonna pośredniczą w stymulacji rozkurczu mięśni gładkich powodującego poszerzenie światła naczyń, równoważąc wazokonstrykcyjne działanie noradrenaliny i uwalnianego wraz z nią ATP z okołonaczyniowych zakończeń nerwowych układu współczulnego. Zatem ATP, w zależności od miejsca uwalniania i typu receptorów na docelowych komórkach, ma działanie wazodylatacyjne lub wazokonstrykcyjne [9, 42].

Znaczenie śródbłonka w kontroli napięcia ścian naczyń krwionośnych dobrze ilustruje działanie nukleotydów w sytuacji, gdy ulega on uszkodzeniu. W nienaruszonym naczyniu pozakomórkowy ATP, ADP i UTP są rozkładane przez zakotwiczone w błonie komórek śródbłonka ENTPD-azy. AMP, jest dalej rozkładany przez ekto-5'-nukleotydazę (CD73) do adenozy, która działa na płytki za pośrednictwem receptorów P1 hamując ich agregację. Działanie hamujące wywierają na płytki również NO i PGI<sub>2</sub>, uwalniane przez komórki śródbłonka pod wpływem ATP. Uszkodzenie śródbłonka powoduje, że nukleotydy uwalniane przez aktywowane płytki, działając autokrynowo, za pośrednictwem płytkowych receptorów P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> i P2X<sub>1</sub>, będą stymulować ich dalszą agregację. Adhezji i agregacji płytek pod wpływem uszkodzenia śródbłonka towarzyszy akumulacja leukocytów, które również mogą uwalniać ATP, ADP i UTP. Nukleotydy, które przy nienaruszonym śródbłonku miałyby działanie rozkurczające, promują skurcz naczyń działając bezpośrednio na komórki mięśniowe, przez receptory P2 na ich powierzchni, mogą się przyczyniać do miejscowego zahamowania przepływu krwi, a także stymulując proliferację miocytów i przebudowę ściany naczynia [14].

Opisane dotąd mechanizmy regulacyjne nie wyjaśniają zdolności organizmu do utrzymania precyzyjnej równowagi między podażą a popytem na tlen w dynamicznie zmieniających się warunkach. Uważa się, że wymaga to istnienia miejscowego „czujnika poziomu tlenu” (oxygen sensor), który wykrywałby stan zachwiania tej równowagi i uruchamiał odpowiedź w postaci rozszerzenia naczyń krwionośnych i wzrostu przepływu krwi w rejonie o zwiększonym zużyciu tlenu [32]. Mimo że miejscowe poszerzenie światła naczyń w odpowiedzi na stan hipoksji po raz pierwszy opisano już w 1879 r. przez Roya i Browna [72], jak dotąd nie udało się jednoznacznie określić, co pełni rolę takiego „czujnika” [38]. Część badaczy jego rolę przypisuje samej hemoglobinie. Przejście cząsteczki hemoglobiny z konformacji R (relaxed) do konformacji T (tense) na skutek utraty tlenu miałyby inicjować sygnał wazodylatacyjny [31]. Istnieją przynajmniej trzy hipotezy próbujące wyjaśnić naturę tego sygnału. Dwie z nich, hipoteza sformułowana przez Stamlera i wsp. [45] i postawiona przez Gladwina i wsp. [21] główną rolę w tym procesie przypisują tlenkowi azotu. Uwolnienie tlenu przez hemoglobinę miałyby powodować wypływ NO z erytrocytu i w następstwie rozszerzenie naczyń. Trzecia, funkcję kluczowej cząsteczki w sygnalizacji stanu hipoksji przypisuje ATP uwalnianemu przez erytrocyty, również w rezultacie uwalniania tlenu przez hemoglobinę [38].

Według hipotezy zaproponowanej przez Stamlera i wsp. w płucach, do których hemoglobina dociera w konformacji T, pod wpływem zmiany konformacyjnej dokonującej się w wyniku przyłączenia tlenu dochodzi do S-nitrozylacji hemoglobiny. NO jest w ten sposób transportowany na dalsze odległości w postaci S-nitrozoooksyhemoglobiny (SNO-Hb), która osiąga docelowe narządy

obwodowe w konformacji R. Utrata tlenu w przedwłośniczkowych naczyniach oporowych powoduje przejście z konformacji R do T, co wiąże się z uwolnieniem tlenu azotu działającego rozkurczająco na naczynia krwionośne. Uwalniany NO może docierać do komórek śródbłonka bezpośrednio lub w postaci małocząsteczkowych S-nitrozotoli, takich jak GSNO (S-nitrozoglutation) uwalnianych przez erytrocyty [45].

Znaczenie fizjologiczne tego mechanizmu zakwestionowali Gladwin i wsp., którzy zaproponowali alternatywny model. Przypisuje się w nim deoksyhemoglobinie aktywność regulowanej allosterycznie reduktazy azotynowej, która redukuje azotyny do tlenu azotu, umożliwiając w ten sposób erytrocytom udział w rozkurczu naczyń krwionośnych w odpowiedzi na spadek poziomu tlenu. Tym samym to azotyny, a nie S-nitrozotole miałyby pełnić rolę najważniejszych prekursorów aktywnego biologicznie tlenu azotu [21].

Trzecia hipoteza, zaproponowana przez Bergfelda i Forrestera [2], rozwinięta przez Ellsworth i Sprague'a, omówiona szczegółowo niżej, zakłada, że przejście hemoglobiny ze stanu R do T skutkuje wypływem ATP z erytrocytów, który następnie wiązany przez receptory nukleotydowe na powierzchni komórek śródbłonka wywołuje rozkurcz naczyń [33, 34]. Pytanie, który z zaproponowanych mechanizmów funkcjonuje *in vivo* lub, jeśli znaczenie fizjologiczne ma więcej niż jeden z nich – który i w jakich warunkach pełni podstawową rolę, pozostaje jak na razie bez odpowiedzi.

#### **ATP UWALNIANY PRZEZ ERYTROCYTY JAKO REGULATOR NAPIĘCIA NACZYŃ KRWIONOŚNYCH**

Zmiany średnicy naczyń oporowych pod wpływem aktywności autonomicznego układu nerwowego i działania mediatorów wazoaktywnych pochodzenia śródbłonkowego nie wydają się wystarczająco precyzyjne, by zapewnić optymalnie zaopatrzenie w tlen w warunkach dynamicznie zmieniającego się nań zapotrzebowania w pracujących mięśniach szkieletowych, mózgu i innych aktywnych metabolicznie narządach [25, 39]. Koncepcja przypisująca ATP rolę głównego miejscowego regulatora zaopatrzenia tkanek w tlen zakłada, że związek ten jest w kontrolowany w sposób uwalniany przez krążące erytrocyty [2, 35]. Do jego wypływu miałyby dochodzić pod wpływem spadku wysycenia hemoglobiny tlenem oraz działania siły ścinającej i stymulacji mechanicznej erytrocytów podczas przeciskania się tych komórek przez zwężone naczynia oporowe i kapilary, szczególnie w warunkach podwyższonego tempa przepływu krwi [66, 87].

Jako mechanizm inicjujący szlak transdukcji sygnału zaangażowany w uwalnianie ATP pod wpływem obniżonego poziomu tlenu zaproponowano zmiany konformacyjne w cząsteczkach hemoglobiny [44]. Zmiany te, dotyczące szczególnie cząsteczek hemoglobiny umiejscowionych w bezpośrednim sąsiedztwie błony erytro-

cytu, będąc następstwem uwolnienia tlenu, prowadzą do deformacji błony komórkowej i aktywacji białka  $G_i$ , co powoduje aktywację cyklazy adenylanowej i wzrost poziomu cyklicznego AMP. Poziom cAMP jest regulowany przez swoiste fosfodiesterazy (PDE3B) hydrolicyzujące ten związek do 5'-AMP. Pod wpływem cAMP dochodzi do aktywacji kinazy białkowej A (PKA), uruchomienia CFTR i otwarcia paneksonu, co bezpośrednio umożliwia wypływ ATP do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (ryc. 2)

Do uwalniania ATP przez erythrocyty może też dochodzić pod wpływem  $PGI_2$  uwalnianej przez komórki śródbłonna w wyniku działania siły ścinającej, jak wykazano w doświadczeniach z użyciem analogów  $PGI_2$  (iloprost, UT-15C). W procesie tym mogą pośredniczyć receptory prostacykliny związane z białkiem G, obecne w błonie erythrocytu [4, 82].  $PGI_2$  uwolniona pod wpływem siły ścinającej, oprócz tego, że oddziałuje bezpośrednio na naczynia krwionośne, prowadząc od wazodylatacji, jednocześnie działa na erythrocyty, stymulując je do uwalniania ATP, który wpływa na ścianę naczyń krwionośnych, wzmacniając dodatkowo działanie wazodylatacyjne [35]. Pod wpływem  $PGI_2$  miałyby dochodzić do aktywacji szlaku, w którym wypływ ATP odbywa się przez kanały VDAC, a więc bez udziału kanałów paneksynowych [84].

### MIEJSCOWE DZIAŁANIE ATP

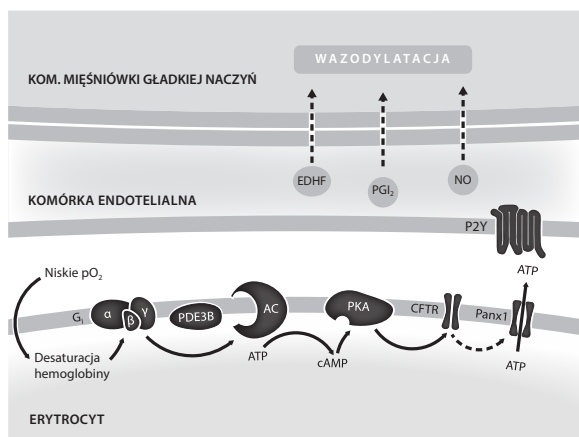
ATP uwolniony przez erythrocyty do światła naczynia krwionośnego może działać na receptory P2Y na powierzchni komórek śródbłonna, których pobudzenie aktywuje kaskadę fosfoinozitolową [32]. Związane z receptorem białko  $G_{q/11}$  aktywuje fosfolipazę C do uwolnienia 1,4,5-trifosforanu inozytolu ( $IP_3$ ) wiążącego się z receptorem  $IP_3$  w błonie retikulum endoplazmatycznego. Pobudzenie tego receptora uwalnia zmagazynowane w ER jony wapnia, a to prowadzi do wzrostu

poziomu  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie komórki śródbłonna. Powoduje to dalszy napływ jonów  $Ca^{2+}$  przez błonowe kanały wapniowe aktywowane w wyniku opróżnienia wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia (SOC), następuje stymulacja śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) do wytwarzania NO. Tlenek azotu dyfunduje do sąsiadującej ze śródbłonkiem komórki mięśnia gładkiego ściany naczynia krwionośnego, gdzie działa na część hemową rozpuszczalnej cyklazy guanylanowej (sGC) powodując jej aktywację i wzrost stężenia cGMP w komórce. Pobudza to aktywność zależnych od cGMP kinaz białkowych, prawdopodobnie fosforylujących pewne białka mięśnia, co ostatecznie powoduje rozkurcz. Ponadto, NO działa na białko  $G_i$  w błonie erythrocytów, ograniczając dalszy wypływ ATP z tych komórek. Pod wpływem jonów wapniowych w komórkach śródbłonna aktywacji ulega również cytozolowa fosfolipaza  $A_2$  (cPLA<sub>2</sub>), która uwalnia kwas arachidonowy z fosfolipidów błonowych, będący prekursorem prostacykliny ( $PGI_2$ ) i czynnika hiperpolaryzującego pochodzenia śródbłonkowego (EDHF) [59].  $PGI_2$  działa na komórki mięśni gładkich naczyń, za pośrednictwem receptora IP, stymulując cyklazę adenylanową do syntezy cAMP. Wzrost stężenia cAMP pod wpływem  $PGI_2$  wraz ze wzrostem cGMP zainicjowanym działaniem NO działają rozkurczająco na komórkę mięśniówki naczyń. Podobnie EDHF, działając za pośrednictwem kanałów potasowych aktywowanych jonami wapnia ( $K_{Ca^{2+}}$ , calcium-activated potassium channels) w błonie komórki mięśniowej, wywołuje wypływ jonów  $K^+$  powodujący hiperpolaryzację i rozkurcz komórki.

Wydaje się, że ATP uwolniony z erythrocytów działając autokrynowo może również stymulować syntezę i uwalnianie przez same erythrocyty kwasów epoksy-eikozatrienowych (EET), o działaniu wazodylatacyjnym [46]. W szlaku tym ATP uwalniany z erythrocytów aktywuje receptory P2X<sub>7</sub> na powierzchni erythrocytu, powodując napływ jonów  $Ca^{2+}$  do komórki, aktywację fosfolipazy  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) i syntezę oraz wydzielanie EET. Kwasy EET działają na komórki warstwy mięśniowej naczynia, stymulując otwarcie kanałów  $K_{Ca^{2+}}$ , powodując ich hiperpolaryzację i rozkurcz [26].

Wpływ ATP z erythrocytów mógłby być regulowany na zasadzie oddziaływań autokrynowych. Postuluje się istnienie pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego, w której ADP powstały w wyniku hydrolizy uwolnionego przez erythrocyt ATP aktywuje receptor P2Y<sub>13</sub> na powierzchni erythrocytu, indukując spadek poziomu cAMP w cytoplazmie krwinki i hamowanie wypływu ATP [88].

Należy uwzględnić, że przebieg odpowiedzi na ATP może przebiegać różnie, w zależności od rodzaju naczynia, w którym dochodzi do jego uwolnienia. Rodzaj mediatorów uwalnianych w odpowiedzi na pozakomórkowy ATP zależy od typu receptora, który uległ aktywacji i szlaku sygnałowego funkcjonującego w danym naczyniu krwionośnym [14, 32].



**Ryc. 2.** Proponowany mechanizm regulacji ukrwienia tkanek z udziałem ATP uwalnianego przez erythrocyty pod wpływem niskiego pO<sub>2</sub>; szczegóły w tekście



Aby mechanizm regulacyjny mógł skutecznie zwiększać perfuzję dokładnie w miejscu podwyższonego zapotrzebowania na tlen, odpowiedź na bodziec inicjujący rozszerzenie naczyń musiałaby się rozprzeżstrzeniać w górę w przebiegu naczyń krwionośnych. Występowanie takiego zjawiska pod wpływem ATP wykazano eksperymentalnie [19, 62]. Podanie ATP po stronie żyłnej naczyń zaopatrujących mięsień cofacz worka policzkowego chomika rozszerzało światło tętniczek doprowadzających i powodowało wzrost przepływu krwi obserwowany w naczyniach włosowatych. Działanie to było hamowane przez L-NAME (ester metylowy N<sup>ω</sup>-nitro-L-argininy), inhibitor syntazy tlenu azotu, co wskazuje, że pośredniczy w nim NO. Sposób w jaki dochodzi do obserwowanego rozprzeżstrzenia się działania wazodylatacyjnego pozostaje nieznyany. Autorzy podejrzewają, że mogłyby uczestniczyć w nim połączenia szczelinowe między komórkami śródbłonna lub połączenia mioepitelialne w obrębie ściany naczyń, którymi może się rozprzeżstrzeniać hiperpolaryzacja wywołana wpływem jonów K<sup>+</sup> [19].

Występowanie propagacji efektu wazodylatacyjnego w górę względem kierunku przepływu krwi, od miejsca, w którym dochodzi do wykrycia spadku poziomu tlenu, stanowi o przewadze koncepcji zakładającej rolę ATP uwalnianego przez erytrocyty w miejscowej regulacji zaopatrzenia w tlen nad wspomnianymi wyżej propozycjami próbującymi wyjaśnić to zjawisko. Podobnego działania nie zaobserwowano ani dla S-nitrozotioili wskazywanych przez Stamlera i wsp. jako prekursorzy NO stymulującego wazodylatację pod wpływem hipoksji ani dla azotynów, podstawowych w hipotezie Gladwina i wsp., w której fizjologiczne znaczenie w generacji NO przypisuje się deoksyhemoglobinie, wykazującej aktywność reduktazy azotynowej [21, 32, 45].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Bao L., Locovei S., Dahl G.: Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett.*, 2004; 572: 65-68
- [2] Bergfeld G.R., Forrester T.: Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovasc. Res.*, 1992; 26: 40-47
- [3] Berne R.M.: Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J. Physiol.*, 1963; 204: 317-322
- [4] Bowles E.A., Moody G.N., Yeragunta Y., Stephenson A.H., Ellsworth M.L., Sprague R.S.: Phosphodiesterase 5 inhibitors augment UT-15C-stimulated ATP release from erythrocytes of humans with pulmonary arterial hypertension. *Exp. Biol. Med.*, 2015; 240: 121-127
- [5] Buchwalow I.B., Cacanyiova S., Neumann J., SamoiloVA V.E., Boecker W., Kristek F.: The role of arterial smooth muscle in vasorelaxation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 377: 504-507
- [6] Burnstock G.: Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.*, 1972; 24: 509-581
- [7] Burnstock G.: Introduction: P2 receptors. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004; 4: 793-803
- [8] Burnstock G.: Unresolved issues and controversies in purinergic signalling. *J. Physiol.*, 2008; 586: 3307-3312
- [9] Burnstock G.: Dual control of vascular tone and remodelling by ATP released from nerves and endothelial cells. *Pharmacol. Rep.*, 2008; 60: 12-20
- [10] Burnstock G.: Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays*, 2012; 34: 218-225
- [11] Burnstock G.: Purinergic signalling: from discovery to current developments. *Exp. Physiol.*, 2014; 99: 16-34
- [12] Burnstock G., Boeynaems J.M.: Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal.*, 2014; 10: 529-564
- [13] Burnstock G., Knight G.E.: Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.*, 2004; 240: 31-304
- [14] Burnstock G., Ralevic V.: Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol. Rev.*, 2013; 66: 102-192
- [15] Burnstock G., Verkhatsky A.: Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol.*, 2009; 195: 415-447
- [16] Carlson B.E., Arciero J.C., Secomb T.W.: Theoretical model of blood flow autoregulation: roles of myogenic, shear-dependent, and metabolic responses. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2008; 295: H1572-H1579

- [17] Chen Y., Corriden R., Inoue Y., Yip L., Hashiguchi N., Zinkernagel A., Nizet V., Insel P.A., Junger W.G.: ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science*, 2006; 314: 1792-1795
- [18] Choi J., Tanaka K., Cao Y., Qi Y., Qiu J., Liang Y., Lee S.Y., Stacey G.: Identification of a plant receptor for extracellular ATP. *Science*, 2014; 343: 290-294
- [19] Collins D.M., McCullough W.T., Ellsworth M.L.: Conducted vascular responses: communication across the capillary bed. *Microvasc. Res.*, 1998; 56: 43-53
- [20] Corriden R., Insel P.A.: Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci. Signaling*, 2010; 3: re1
- [21] Cosby K., Partovi K.S., Crawford J.H., Patel R.P., Reiter C.D., Martyr S., Yang B.K., Waclawiw M.A., Zalos G., Xu X., Huang K.T., Shields H., Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Cannon R.O.3rd., Gladwin T.: Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat. Med.*, 2003; 9: 1498-1505
- [22] Crecelius A.R., Kirby B.S., Luckasen G.J., Larson D.G., Dineno F.A.: ATP-mediated vasodilatation occurs via activation of inwardly rectifying potassium channels in humans. *J. Physiol.*, 2012; 590: 5349-5359
- [23] Dahl G.: ATP release through pannexon channels. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2015; 370: 20140191
- [24] Davis M.J.: Perspective: physiological role(s) of the vascular myogenic response. *Microcirculation*, 2012; 19: 99-114
- [25] Dietrich H.H., Ellsworth M.L., Sprague R.S., Dacey R.G.Jr.: Red blood cell regulation of microvascular tone through adenosine triphosphate. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2000; 278: H1294-H1298
- [26] Dietrich H.H., Horiuchi T., Xiang C., Hongo K., Falck J.R., Dacey R.G.Jr.: Mechanism of ATP-induced local and conducted vasomotor responses in isolated rat cerebral penetrating arterioles. *J. Vasc. Res.*, 2009; 46: 253-264
- [27] Donaldson S.H., Lazarowski E.R., Picher M., Knowles M.R., Stutts M.J., Boucher R.C.: Basal nucleotide levels, release, and metabolism in normal and cystic fibrosis airways. *Mol. Med.*, 2000; 6: 969-982
- [28] Drury A.N., Szent-Györgyi A.: The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.*, 1929; 68: 213-237
- [29] Duff F., Patterson G.C., Shepherd J.T.: A quantitative study of the response to adenosine triphosphate of the blood vessels of the human hand and forearm. *J. Physiol.*, 1954; 125: 581-589
- [30] Elliott M.R., Chekeni F.B., Trampont P.C., Lazarowski E.R., Kadl A., Walk S.F., Park D., Woodson R.I., Ostankovich M., Sharma P., Lysiak J.J., Harden T.K., Leitinger N., Ravichandran K.S.: Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 2009; 461: 282-286
- [31] Ellsworth M.L.: The red blood cell as an oxygen sensor: what is the evidence? *Acta Physiol. Scand.*, 2000; 168: 551-559
- [32] Ellsworth M.L., Ellis C.G., Goldman D., Stephenson A.H., Dietrich H.H., Sprague R.S.: Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. *Physiology*, 2009; 24: 107-116
- [33] Ellsworth M.L., Ellis C.G., Sprague R.S.: Role of erythrocyte-released ATP in the regulation of microvascular oxygen supply in skeletal muscle. *Acta Physiol.*, 2016; 216: 265-276
- [34] Ellsworth M.L., Forrester T., Ellis C.G., Dietrich H.H.: The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am. J. Physiol.*, 1995; 269: H2155-H2161
- [35] Ellsworth M.L., Sprague R.S.: Regulation of blood flow distribution in skeletal muscle: role of erythrocyte-released ATP. *J. Physiol.*, 2012; 590: 4985-4991
- [35] Fiske C.H., Subbarow Y.: Phosphorus compounds of muscle and liver. *Science*, 1929; 70: 381-382
- [37] Furchgott R.F., Zawadzki J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288: 373-376
- [38] Gladwin M.T.: Role of the red blood cell in nitric oxide homeostasis and hypoxic vasodilation. *W: Hypoxia and Exercise*, ed.: R.C. Roach, P.D. Wagner, P.H. Hackett. Springer US, Boston, MA, 2006: 189-205
- [39] González-Alonso J., Olsen D.B., Saltin B.: Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery: role of circulating ATP. *Circ. Res.*, 2002; 91: 1046-1055
- [40] Grygorczyk R., Orlov S.N.: Effects of hypoxia on erythrocyte membrane properties - implications for intravascular hemolysis and purinergic control of blood flow. *Front. Physiol.*, 2017; 8: 1110
- [41] Grygorczyk R., Tabcharani J.A., Hanrahan J.W.: CFTR channels expressed in CHO cells do not have detectable ATP conductance. *J. Membr. Biol.*, 1996; 151: 139-148
- [42] Hopwood A.M., Burnstock G.: ATP mediates coronary vasoconstriction via P2X-purinoreceptors and coronary vasodilatation via P2Y-purinoreceptors in the isolated perfused rat heart. *Eur. J. Pharmacol.*, 1987; 136: 49-54
- [43] Idzko M., Ferrari D., Eltzschig H.K.: Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, 2014; 509: 310-317
- [44] Jagger J.E., Bateman R.M., Ellsworth M.L., Ellis C.G.: Role of erythrocyte in regulating local O<sub>2</sub> delivery mediated by hemoglobin oxygenation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2001; 280: H2833-H2839
- [45] Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S.: S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, 1996; 380: 221-226
- [46] Jiang H., Zhu A.G., Mamczur M., Falck J.R., Lerea K.M., McGiff J.C.: Stimulation of rat erythrocyte P2X7 receptor induces the release of epoxyeicosatrienoic acids. *Br. J. Pharmacol.*, 2007; 151: 1033-1040
- [47] Joyner M.J., Casey D.P.: Regulation of increased blood flow (hyperemia) to muscles during exercise: a hierarchy of competing physiological needs. *Physiol. Rev.*, 2015; 95: 549-601
- [48] Junger W.G.: Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011; 11: 201-212
- [49] Kang K.T.: Endothelium-derived relaxing factors of small resistance arteries in hypertension. *Toxicol. Res.*, 2014; 30: 141-148
- [50] Keller A.S., Diederich L., Panknin C., DeLalio L.J., Drake J.C., Sherman R., Jackson E.K., Yan Z., Kelm M., Cortese-Krott M.M., Isakson B.E.: Possible roles for ATP release from RBCs exclude the cAMP-mediated Panx1 pathway. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2017; 313: C593-C603
- [51] Khakh B.S., Burnstock G.: The double life of ATP. *Sci. Am.*, 2009; 301: 84-90
- [52] Kim M.Y., Kuruvilla H.G., Raghu S., Hennessey T.M.: ATP reception and chemosensory adaptation in *Tetrahymena thermophila*. *J. Exp. Biol.*, 1999; 202: 407-416
- [53] Lazarowski E.R.: Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal.*, 2012; 8: 359-373
- [54] Lazarowski E.R., Sesma J.I., Seminario-Vidal L., Kreda S.M.: Molecular mechanisms of purine and pyrimidine nucleotide release. *Adv. Pharmacol.*, 2011; 61: 221-261
- [55] Lohman A.W., Billaud M., Isakson B.E.: Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovasc. Res.*, 2012; 95: 269-280
- [56] Lohmann K.: Über die pyrophosphatfraktion im muskel. *Naturwissenschaften*, 1929; 17: 624-625
- [57] Luneva O.G., Sidorenko S.V., Ponomarchuk O.O., Tverskoy A.M., Cherkashin A.A., Rodnenkov O.V., Alekseeva N.V., Deev L.I., Maksimov G.V., Grygorczyk R., Orlov S.N.: Deoxygenation affects composition of membrane-bound proteins in human erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2016; 39: 81-88

- [58] Magier Z., Jarzyna R.: Udział receptorów nukleotydowych w regulacji funkcji naczyń krwionośnych. *Postepy Biochem.*, 2014; 60: 456-474
- [59] Malmjö M., Erlinge D., Högestätt E.D., Zygmunt P.M.: Endothelial P2Y receptors induce hyperpolarisation of vascular smooth muscle by release of endothelium-derived hyperpolarising factor. *Eur. J. Pharmacol.*, 1999; 364: 169-173
- [60] Martins I., Wang Y., Michaud M., Ma Y., Sukkurwala A.Q., Shen S., Kepp O., Métivier D., Galluzzi L., Perfettini J.L., Zitvogel L., Kroemer G.: Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell. Death Differ.* 2014; 21: 79-91
- [61] Maruyama K.: The discovery of adenosine triphosphate and the establishment of its structure. *J. Hist. Biol.*, 1991; 24: 145-154
- [62] McCullough W.T., Collins D.M., Ellsworth M.L.: Arteriolar responses to extracellular ATP in striated muscle. *Am. J. Physiol.*, 1997; 272: H1886-H1891
- [63] Montalbetti N., Leal Denis M.F., Pignataro O.P., Kobatake E., Lazarowski E.R., Schwarzbach P.J.: Homeostasis of extracellular ATP in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 38397-38407
- [64] Moser T.L., Kenan D.J., Ashley T.A., Roy J.A., Goodman M.D., Misra U.K., Cheek D.J., Pizzo S.V.: Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiotensin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001; 98: 6656-6661
- [65] Nava E., Llorens S.: The paracrine control of vascular motion. A historical perspective. *Pharmacol. Res.*, 2016; 113: 125-145
- [66] Olearczyk J.J., Stephenson A.H., Lonigro A.J., Sprague R.S.: Heterotrimeric G protein Gi is involved in a signal transduction pathway for ATP release from erythrocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2004; 286: H940-H945
- [67] Panchin Y., Kelmanson I., Matz M., Lukyanov K., Usman N., Lukyanov S.: A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr. Biol.*, 2000; 10: R473-R474
- [68] Pelegrin P., Surprenant A.: The P2X<sub>7</sub> receptor-pannexin connection to dye uptake and IL-1 $\beta$  release. *Purinergic Signal.*, 2009; 5: 129-137
- [69] Praetorius H.A., Leipziger J.: ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic Signal.*, 2009; 5: 433-446
- [70] Qiu F., Wang J., Spray D.C., Scemes E., Dahl G.: Two non-vesicular ATP release pathways in the mouse erythrocyte membrane. *FEBS Lett.*, 2011; 585: 3430-3435
- [71] Ralevic V., Mathie R.T., Alexander B., Burnstock G.: Characterization of P2X- and P2Y-purinergic receptors in the rabbit hepatic arterial vasculature. *Br. J. Pharmacol.*, 1991; 103: 1108-1113
- [72] Roy C.S., Brown J.G.: The blood-pressure and its variations in the arterioles, capillaries and smaller veins. *J. Physiol.*, 1880; 2: 323-446.1
- [73] Sandow S.L., Tare M., Coleman H.A., Hill C.E., Parkington H.C.: Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circ. Res.*, 2002; 90: 1108-1113
- [74] Scemes E.: Nature of plasmalemmal functional "hemichannels". *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1818: 1880-1883
- [75] Schiedel A.C., Lacher S.K., Linnemann C., Knolle P.A., Müller C.E.: Antiproliferative effects of selective adenosine receptor agonists and antagonists on human lymphocytes: evidence for receptor-independent mechanisms. *Purinergic Signal.*, 2013; 9: 351-365
- [76] Schwiebert E.M.: ABC transporter-facilitated ATP conductive transport. *Am. J. Physiol.*, 1999; 276: C1-C8
- [77] Schwiebert E.M., Egan M.E., Hwang T.H., Fulmer S.B., Allen S.S., Cutting G.R., Guggino W.B.: CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP. *Cell*, 1995; 81: 1063-1073
- [78] Schwiebert E.M., Zsembery A.: Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003; 1615: 7-32
- [79] Sikora J., Orlov S.N., Furuya K., Grygorczyk R.: Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes. *Blood*, 2014; 124: 2150-2157
- [80] Sluyter R.: P2X and P2Y receptor signaling in red blood cells. *Front. Mol. Biosci.*, 2015; 2: 60
- [81] Sprague R.S., Ellsworth M.L., Stephenson A.H., Kleinhenz M.E., Lonigro A.J.: Deformation-induced ATP release from red blood cells requires CFTR activity. *Am. J. Physiol.*, 1998; 275: H1726-H1732
- [82] Sprague R.S., Goldman D., Bowles E.A., Achilles D., Stephenson A.H., Ellis C.G., Ellsworth M.L.: Divergent effects of low-O<sub>2</sub> tension and iloprost on ATP release from erythrocytes of humans with type 2 diabetes: implications for O<sub>2</sub> supply to skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2010; 299: H566-H573
- [83] Sridharan M., Adderley S.P., Bowles E.A., Egan T.M., Stephenson A.H., Ellsworth M.L., Sprague R.S.: Pannexin 1 is the conduit for low oxygen tension-induced ATP release from human erythrocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2010; 299: H1146-H1152
- [84] Sridharan M., Bowles E.A., Richards J.P., Krantic M., Davis K.L., Dietrich K.A., Stephenson A.H., Ellsworth M.L., Sprague R.S.: Prostaglandin receptor-mediated ATP release from erythrocytes requires the voltage-dependent anion channel. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2012; 302: H553-H559
- [85] Tanaka K., Gilroy S., Jones A.M., Stacey G.: Extracellular ATP signaling in plants. *Trends Cell Biol.*, 2010; 20: 601-608
- [86] Trautmann A.: Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". *Sci. Signal.*, 2009; 2: pe6
- [87] Wan J., Ristenpart W.D., Stone H.A.: Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 16432-16437
- [88] Wang L., Olivecrona G., Göteborg M., Olsson M.L., Winzell M.S., Erlinge D.: ADP acting on P2Y<sub>13</sub> receptors is a negative feedback pathway for ATP release from human red blood cells. *Circ. Res.*, 2005; 96: 189-196
- [89] Wood C.R., Hennessey T.M.: PPNDs is an agonist, not an antagonist, for the ATP receptor of *Paramecium*. *J. Exp. Biol.*, 2003; 206: 627-636

Autor deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.