

**АКВАПОРИНИ: СТРУКТУРА, ФУНКЦІЇ ТА
ЗНАЧЕННЯ ДЛЯ МЕДИЦИНИ**

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Резюме. У статті розглянута молекулярна структура та аспекти функціонування природних водних каналів – аквапоринів. Наведена інформація щодо існування різних типів даних трансмембранних протеїнів у організмі людини. Узагальнені наукові дані щодо ролі аквапоринів у перебігу фізіологічних та розвитку патофізіологічних процесів у організмі людини. Розглянуті результати та перспективи досліджень з розробки каналомодуючих лікарських засобів для застосування у медицині та фармакології.

Ключові слова: аквапорин, водний канал, селективність, аквапоринопатія.

Вступ. Останні 30 років вчені світу приділяють значну увагу дослідженню властивостей нанорозмірних матеріалів. Такі наукові розробки виконуються в Україні, зокрема, у Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця. В січні 2008 року за ініціативи президента Національної академії наук, академіка Б.Є. Патона та ректора Національного медичного університету, академіка НАМН України В.Ф. Москаленка створена спільна лабораторія з нанофармакології. Насьогодні розроблена технологія синтезу наночастинок металів (срібло, мідь, залізо). Встановлено, що наносрібло та наномідь проявляють виражену протимікробну активність. Така ж направленість дії має місце у лікарських формах: мазь, гель. У композита наноміді з цефтріаксоном виявлена більш виражена протимікробна активність та властивість впливати на антибіотикостійкі штами мікроорганізмів [3].

В плані продовження спільних досліджень з нанофармакології розпочаті наукові розробки з Інститутом біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України з вивчення властивостей композиту нанозаліза з аскорбіновою кислотою з метою впровадження в медичну практику як нового протианемічного засобу [7].

Нині вчені світу приділяють значну увагу проведеному дослідженню з вивчення фізіологічних, біохімічних та імунологічних процесів у нанорозмірних біологічних системах, адже це допоможе краще зрозуміти принципи функціонування живих організмів, а також створити високоефективні прилади, подібні до досконалих машин природи [1, 2, 4]. З огляду на таку тенденцію, цікавим є дослідження механізмів клітинного транспорту води у живих системах, адже цей про-

цес відбувається у нанорозмірних каналах, природу поведінки рідин у яких вивчає спеціальна наука – нанофлюїдика [5, 6, 17].

Так, кожна жива клітина має плазматичну мембрану у вигляді ліпідного бішару. Загалом біомембрана гідрофобна та, у більшості випадків, непроникна для хімічних сполук, що допомагає клітині підтримувати сталий склад внутрішнього середовища, проводити необхідні для життєдіяльності біохімічні реакції. Молекули малого розміру, такі як вода, здатні до повільної пасивної дифузії крізь клітинну мембрану. Але у разі потреби швидкого та інтенсивного руху частинок через біомембрану ключову роль у транспорті відіграють канали та насоси, що є трансмембранними протеїнами – макромолекулами з дивовижною структурною та функціональною різноманітністю.

Унікальні властивості води роблять її центральною молекулою в біології. Вода, завдяки полярності молекули та здатності утворювати водневі зв'язки з різними сполуками, є універсальним біологічним розчинником. Найдавніші форми життя зародились у воді близько 4 мільярдів років тому, і нині ця речовина виступає головним компонентом всіх живих організмів.

Одним з фундаментальних принципів біології є властивість клітин регулювати вміст рідини. Транспорт води крізь біологічні мембрани контролюється специфічними трансмембранними протеїнами, що функціонують як водні канали. Дані структури широко розповсюджені у природі майже на всіх рівнях організації живої матерії – від бактерій та грибів до рослин, тварин, людини.

У 1992 році Пітер Егр та співавт. відкрили молекулярний канал, що відповідає за рух води

крізь клітинні мембрани. Надалі виявилось, що у живих організмах існує ціла родина таких структур, названих згодом аквапоринами (АП). Насьогодні, згідно з он-лайн базою даних PubMed, налічується близько 6500 статей, що стосуються аквапоринів; багато наукових груп по всьому світу займаються дослідженням властивостей цих нанорозмірних водних каналів, їх функцій, фізіології та патофізіології, а також розробкою медикаментів для лікування каналопатій та інших пов'язаних з транспортом води патологій. Створюються штучні біоміметичні наноструктури, розробляються новітні підходи квантової хімії та квантової фармакології для проведення досліджень у даних напрямках. Головною подією у історії вивчення аквапоринів стало вручення Пітеру Егру у 2003 році Нобелівської премії з хімії, що підтвердило важливість даної проблеми на сучасному етапі розвитку наукової думки.

Структура та функції аквапоринів. Структура водних каналів є оптимальною для здійснення важливої біологічної функції – транспорту води. Шляхом складання тривимірних карт із використанням криоелектронної мікроскопії встановлено, що аквапорини мають будову «піщового годинника» [33]. У структурі водних каналів виділяють шість -спіральних трансмембранних ділянок, позначуваних цифрами I–VI, та п'ять сполучних петель, відповідно, А–Е. Кінцеві карбоксильні та аміногрупи протеїну розташовані у внутрішньоклітинному середовищі. Петлі В та Е містять ділянки аспарагін-пролін-аланіну (NPA послідовність) – характерні елементи аквапоринів, що зустрічаються посередині ліпідного бішару (рис. 1). У мембрані аквапорини присутні у вигляді гомотетрамерів, кожна субодинаця функціонально повноцінна та містить водний канал, діаметр якого у найвужчому місці становить 0,28

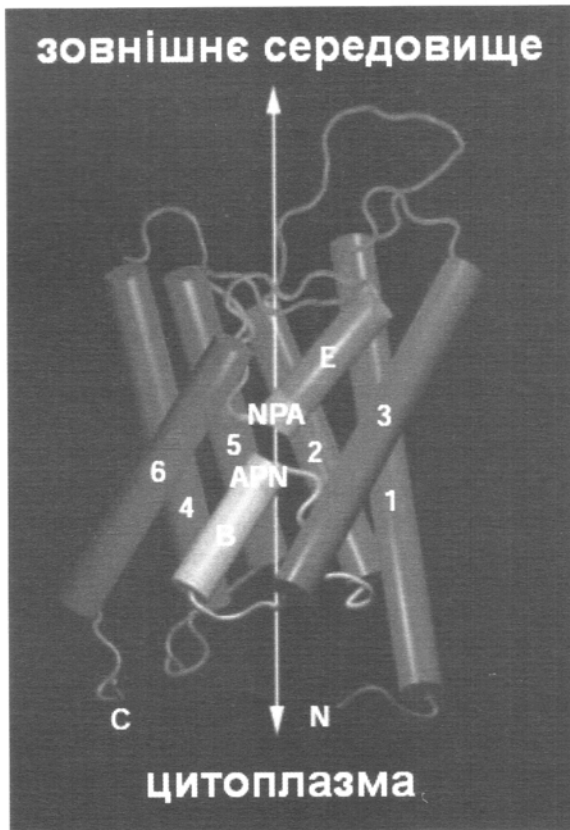


Рис. 1. Топографічна модель мономеру АП-1, боковий вигляд. Зображені дві сполучні петлі В та Е, кожна з яких перетинає половину ліпідного бішару у вигляді -спіралі та містить послідовність NPA, що забезпечує селективність аквапорину. Цифрами позначені шість-спіральних трансмембранних ділянок. Кінцеві карбоксильна та аміногрупа позначені буквами С та N, відповідно [30]

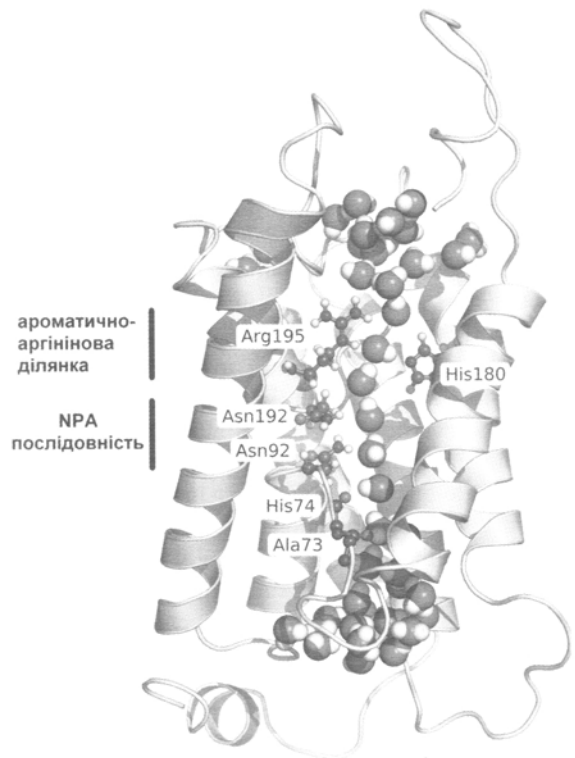


Рис. 2. Молекулярнодинамічна модель, що зображує транспорт молекул води через АП-1. Молекули води зображені у вигляді сфер, деякі амінокислоти, що взаємодіють з водою, показані у кульково-стрижневій формі. Дві NPA послідовності, розташовані на кінцях петель В та Е, утворюють з центральною молекулою води водневі зв'язки. Поблизу зовнішньоклітинного кінця каналу розташована ароматично-аргінінова ділянка – найбільш вузька ділянка пори [29]

ним, що дещо більше, ніж діаметр молекули води. Між мономерами існує центральна пора, біологічна функція якої досі достеменно не встановлена [47]. Існують дані, що даний утвір аквапорину 1 здатний проводити іони калію, цезію та натрію, що є цГМФ-залежним процесом [48].

За результатами моделювання із використанням молекулярної динаміки встановлено, що вода проходить через канал кожного мономера аквапорину у вигляді неперервного потоку товщиною в одну молекулу, селективність транспорту при цьому забезпечується електростатичним та стеричним факторами [29].

Багато тваринних аквапоринів, включаючи АП-1, АП-2, АП-4, АП-5 та АП-8, функціонують як двосторонні водно-селективні транспортери. Клітини з аквапоринами у плазматичній мембрані мають у 5–50 разів більшу осмотичну водну проникність, ніж клітини без водних каналів [45]. Через те, що транспорт води у вигляді потоку товщиною в одну молекулу через поодинокий канал є недостатнім для здійснення водного обміну, водні канали мають бути присутніми у мембрані у великій кількості. Так, клітини зазвичай мають декілька тисяч аквапоринів на μm^2 мембрани, порівняно з десятьма чи менше іонними каналами на μm^2 [44]. Кожен канал здатний проводити до 109 молекул води за секунду [9].

Важливою характеристикою аквапоринів є селективність, що обумовлена молекулярною будовою. Одна зі стінок каналу містить атоми кисню карбонільних груп, що утворюють водневі зв'язки з молекулами води, забезпечуючи рух останньої, тоді як інша стінка вкрита гідрофобними амінокислотами і не здатна до такої взаємодії. Водневі зв'язки допомагають вишикувати воду у потік товщиною в одну молекулу і орієнтувати ці молекули під чітко визначеним кутом. Канал аквапорину надзвичайно вузький для проходження гідратованих іонів, а дегідратація останніх є енергетично не вигідною, оскільки гідрофобна стінка пори не здатна компенсувати втрату води дегідратованим іоном. Такий принцип будови пояснює, чому аквапорини не пропускають іони калію, кальцію, натрію та хлору [9].

Водні канали мають бути також непроникні для протонів, адже градієнт останніх використовується біологічним наномотором, АТФазою клітин, для генерування енергії. У воді протони існують у вигляді іонів гідроксонію H_3O^+ та переміщуються із великою швидкістю за допомогою механізму Гротгуса, що полягає у транспорті

заряджених частинок завдяки утворенню та розриву водневих зв'язків між сусідніми молекулами води. У аквапорині даний транспорт не є можливим, оскільки канал містить дві NPA послідовності, два позитивно заряджених аспарагіну яких відіграють ключову роль у блокуванні потоку протонів [20]. Електростатичне поле навколо NPA послідовностей забезпечує чітку орієнтацію молекул води, тоді як аспарагіни зв'язуються з атомом кисню центральної молекули води у каналі, таким чином унеможливаючи участь кисню у формуванні водневих зв'язків, а отже – у транспорті протонів. Ланцюжок руху протонів, створений за механізмом Гротгуса, переривається. Згідно з іншими дослідженнями протони не здатні потрапляти у аквапорин завдяки позитивно зарядженому електростатичному полю каналів та його відштовхуючій дії на маленькі позитивно заряджені частинки [21].

Розглянутий вище електростатичний фактор поєднується зі стеричним фактором, що разом забезпечують селективність аквапоринів. Просторовою перешкодою для проходження молекул великого розміру є найбільш вузька частина пори – ароматично-аргінінова ділянка, селективний фільтр, утворений чотирма амінокислотами та розташований біля зовнішньоклітинного закінчення каналу (рис. 2). У даному місці діаметр каналу становить 2,8 Е для аквапоринів та 3,4 Е для аквагліцеропоринів [47].

Типи аквапоринів людини. На сьогодні відомо про існування в організмі людини тринадцяти типів аквапоринів. Водні канали поділяються на три підгрупи: звичайні (АП-0, АП-1, АП-2, АП-4, АП-5, АП-6, АП-8), що транспортують переважно воду, аквагліцеропорини (АП-3, АП-7, АП-9, АП-10), що переносять воду і гліцерин, та супер-аквапорини (АП-11, АП-12), транспортні функції яких ще не достатньо вивчені [39] (табл. 1).

Кожен з аквапоринів має структурні та функціональні особливості, відіграє унікальну фізіологічну роль. Так, АП-0, чи основний внутрішній білок волокон кришталіка, поряд із транспортуванням води бере участь у міжклітинній адгезії. Люди з мутаціями АП-0 страждають від катаракти [13].

Протеїн АП-1 на сьогодні є найбільш вивченим, це модельний аквапорин для проведення наукових досліджень. Точний механізм гейтингу для нього не відомий, але встановлено, що зміна осмотичних властивостей середовища може спричинити зворотну зміну локалізації АП-1 (процес, залежний від протеїнкінази С), що доз-

воляє зробити припущення про регуляцію функціонування даної структури за допомогою процесу міграції [19]. У людей та дослідних мишей з недостатністю АП-1 спостерігаються порушення концентраційної функції нирок, адже даний водний канал відповідає за реабсорбцію води у проксимальних канальцях нефрону та низхідній частині петлі Генле [34].

АП-1, як нещодавно встановлено, приймає участь у ангиогенезі, загоюванні ран, регенерації органів та канцерогенезі [41]. Відомо, що аквапорин 1 присутній в мікросудинах пухлин, а у мишей з відсутністю експресії даного водного каналу зменшуються темпи росту та васкуляризації імплантованих пухлин. Клітини ендотелію аорти мишей без АП-1 у відповідь на хемотаксичний стимул мігрують повільніше, ніж у здорових тварин. Також відомо, що міграція клітин, які у нормі не мають аквапоринів, зростає при трансфекції у них генетичного матеріалу, що кодує водні канали. Подальші спостереження, серед яких накопичення аквапоринів у ділянці переднього кінця мігруючої клітини та посилена рухова активність ламеллоподій у клітинах з водними каналами, дозволили зробити припущення про існування аквапорин-залежного механізму міграції [35, 40].

Аквапорин-залежна міграція клітин є розповсюдженим явищем, що пояснює інтенсивність процесів ангиогенезу, розростання злоякісної тканини, загоювання ран та хемотаксису імунних клітин. Експресія водних каналів у клітинах пухлини підвищує здатність останніх до проходження крізь стінки кровоносних судин та інвазії у прилеглі тканини [28], що підтверджується високим рівнем експресії аквапоринів у багатьох типах пухлин та кореляцією між експресією водних каналів та ступенем злоякісності пухлини [46].

АП-2, відкритий невдовзі після АП-1, локалізується у збірних трубочках нирок, тому й отримав відповідну назву «водний канал збірних трубочок» (WCH-CD). АП-2 – перший аквапорин, для якого встановлена зміна клітинної локалізації у відповідь на стимул. Міграція АП-2 – один з найбільш вивчених механізмів регуляції функціонування аквапоринів. Процес починається зі зв'язування вазопресину з V2-рецепторами у базолатеральних мембранах збірних трубочок. Внаслідок цього активується аденилатциклаза, підвищується рівень внутрішньоклітинного цАМФ, активується протеїнкіназа А, яка діє на внутрішньоклітинні везикули з АП-2, фосфори-

Таблиця 1. Різноманітність типів аквапоринів людини з вказанням їх локалізації в організмі та транспортаних речовин [15, 16, 30]

| Тип АП | Транспортована речовина | Переважна локалізація в організмі |
|--------|--|---|
| АП-0 | Вода | Кришталік |
| АП-1 | Вода | Еритроцити, нирки, легені, головний мозок, око, ендотелій, бронхи |
| АП-2 | Вода | Нирки |
| АП-3 | Вода, гліцерин, сечовина | Шкіра, нирки, легені, око, тонкий кишечник, ободова кишка |
| АП-4 | Вода | Головний та спинний мозок, нирки, легені, м'язи, шлунок |
| АП-5 | Вода | Слинні, слізні та потові залози, легені, око |
| АП-6 | Вода, аніони | Нирки |
| АП-7 | Вода, гліцерин, сечовина, арсеніт | Жирова тканина, нирки, сім'яники |
| АП-8 | Вода | Нирки, печінка, підшлункова залоза, тонкий кишечник, сім'яники, ободова кишка |
| АП-9 | Вода, гліцерин, сечовина, малі молекули, арсеніт | Печінка, лейкоцити, головний мозок, сім'яники |
| АП-10 | Вода, гліцерин, сечовина | Тонкий кишечник |
| АП-11 | ? | Головний мозок, печінка, нирки |
| АП-12 | ? | Підшлункова залоза |

люючи серин-256 біля карбоксильного кінця аквапорину. Модифікований АП-2 мігрує у апікальну мембрану, де й підвищує проникність збірної трубочки та, відповідно, посилює реабсорбцію первинної сечі [38]. Коли рівень вазопресину знижується, АП-2 підлягає ендоцитозу, а проникність мембрани повертається у початкове положення. Мутація АП-2 викликає нефрогенний нецукровий діабет, що полягає у порушенні реабсорбції первинної сечі, призводить до поліурії, полідипсії та зневоднення організму [22, 42]. З огляду на відомі дані щодо функціонування аквапоринів у каналцях нирок, можна зробити висновок про важливість даних молекулярних структур. Адже водні канали попереджають зневоднення організму шляхом реабсорбції води з первинної сечі, в той самий час захищаючи організм від ацидозу шляхом запобігання реабсорбції протонів [8].

АП-3, вперше знайдений у базолатеральній мембрані збірної трубочки нирки, отримав назву внутрішнього гліцеринового протеїну (GLIP) завдяки здатності транспортувати гліцерин та сечовину. Даний аквапорин також локалізується у кератиноцитах базального шару епідермісу [34]. Наслідок мутації АП-3 у мишей – зменшення еластичності шкіри, затримка загоєння ран, зменшення вмісту гліцерину у тканинах та сухість шкірних покривів [23]. Вчені світу зацікавлені у проведенні досліджень зі встановлення ролі недостатності АП-3 у розвитку захворювань шкіри [24].

АП-4, вперше клонований з легенів та головного мозку шурів, – це «нечутливий до ртуті водний канал» (MIWC), що не піддається інгібуванню ртуттю. На сьогодні відомі дві ізоформи даного аквапорину в організмі людини. Роль АП-4 – контролювання водного балансу у центральній нервовій системі. Для головного мозку людини надзвичайно важливою є підтримка гомеостазу води, адже кістки черепа не дозволяють мозковій тканині збільшуватися у об'ємі без ризику розвитку тяжкої патології [37]. Встановлено, що дефіцит АП-4 у клітинах центральної нервової системи мишей попереджає розвиток гіпонатріємічного набрякання тканин. Тому тварини з відсутністю АП-4 мають більш високий шанс виживання після гіпонатріємічного набряку мозку [15]. Дані факти дозволяють зробити припущення, що інгібітор експресії АП-4 може мати терапевтичний ефект при лікуванні набряку мозку [11].

АП-5, поряд з АП-1 та АП-4, – аквапорин з

добре вивченою структурою [26, 27]. У людини знайдений у апікальній мембрані слинних залоз, але у пацієнтів з синдромом Сьогрена локалізований на базальних мембранах, що призводить до розвитку дефектів у міграції АП-5, характеризується атрофією слізних, слинних та потових залоз з розвитком сухості очей, рота, носоглотки, піхви та шкіри. Наукові дані дозволяють зробити припущення про подібність фізіологічних та біохімічних механізмів регуляції функціонування АП-2 та АП-5 [32, 43].

АП-7, вперше клонований з сім'яників шурів, здатний транспортувати гліцерин. У людини вперше виявлений у жировій тканині, тому отримав назву «адипозний аквапорин». Роль даної структури – постачати гліцерин для глюконеогенезу [36]. Дорослі миші без АП-7 характеризуються значним збільшенням маси тіла, що свідчить про роль патологій цього аквапорину у розвитку ожиріння [25]. Біохімічні дослідження показали, що адипозна гіпертрофія у даному випадку є наслідком зменшення проникності плазматичних мембран для гліцерину, що призводить до накопичення даної сполуки, а також триацилгліцеролів, у клітинах. Таким чином, проникність адипоцитів для гліцерину може розглядатися як новий регулятор розмірів таких клітин та важливий чинник у розвитку ожиріння, а зміна експресії чи функції АП-7 може призвести до змін у жировій масі тіла [44].

Фармакологічна корекція аквапоринопатій. У людини трапляються випадки мутацій аквапоринів, що мають клінічне значення. Наприклад, як відмічено вище, мутація АП-2 призводить до розвитку нецукрового діабету [14]. У деяких осіб з мутаціями АП-1 при водному голодуванні порушувалася здатність нирок концентрувати сечу [31]. Мутації АП-0 у волокнах кристалика, у свою чергу, здатні призвести до розвитку катаракти за механізмом, що, можливо, полягає у порушенні міжклітинної адгезії [18].

Особливою аквапоринопатією, що нещодавно викликала значну зацікавленість вчених та лікарів, є запальне демієлінізуюче захворювання оптикомієліт (хвороба Девика). Це доволі рідка форма множинного склерозу, яка уражує зоровий нерв та спинний мозок, призводить до сліпоты, паралічу та смерті. Прогноз при даній патології несприятливий, навіть при проведенні імуносупресивної терапії. Однією з ознак оптикомієліту є присутність у сироватці крові антитіл до АП-4 (аутоантитіл NMO-IgG). Ведуться активні дослідження з розробки релевантних тваринних моде-

лей оптикомієліту, а також нових ефективних лікарських засобів, таких як моноклональні антитіла, що блокують зв'язування NMO-IgG з АП-4 – «аквапорумаби» [12, 44].

Досліди на мишах показали, що перспективною може стати терапія інгібіторами аквапоринів, які проявили, зокрема, кращий діуретичний ефект, ніж відомі сечогінні препарати, при лікуванні вираженої серцевої недостатності. Інгібітори АП-4, можливо, виявлять нейропротекторний ефект при цитотоксичному набряку мозку, а отже, новітні препарати даних аквапоринів будуть рекомендовані для покращення стану хворого після травм головного мозку та інсультів, зменшуватимуть смертність від менінгіту [44].

Нині не існує селективних блокаторів АП-4, але відомо, що буметанід (петлевий діуретик короткої дії) здатний знижувати експресію даного аквапорину, паралельно інгібуючи натрій-хлор-калійовий ко-транспортер висхідної ділянки петлі Генле. Результати деяких досліджень показали інгібування водних каналів блокаторами карбоангідрази ацетазоламідом («Діакарб») та метазоламідом, а також солями тетраетиламонію та протиепілептичним препаратом вальпроєвою кислотою. Але дані результати є спірними та спростовуються деякими авторами. Відомо, що еритропоєтин здатен опосередковано зменшувати проникність АП-4 через активацію метаболічних глутаматних рецепторів [10].

Нещодавно за допомогою комбінації методів хімічного синтезу, біологічних експериментів та *in silico* моделювання розроблений новітній арилсульфонамід АqВ013, антагоніст АП-1 та АП-4. Основою для створення дослідного препарату став буметанід, який виявив протекторний вплив на клітини при набряку мозку у мишей. Комплексні дослідження АqВ013 *in vitro* та *in vivo* тривають, їх мета – проведення оцінки ефектів даної сполуки на клітинні та системні патофізіологічні моделі [49].

Висновки. Вода – головний компонент всіх живих клітин, тому регуляція водного гомеостазу у біологічних системах є надзвичайно важливою фізіологічною функцією. Механізм, за яким вода проходить крізь біомембрани, був предметом суперечок до відкриття водних каналів – аквапоринів, які представляють собою трансмембранні протеїни, що забезпечують селективний транспорт води та деяких інших малих молекул за осмотичним градієнтом. Детальні дослідження з експресії генів водних каналів та їх регуляції призведе до більш глибокого розуміння залучення даних структур у фізіологічні, біохімічні, та патофізіологічні процеси. Досконале вивчення механізмів селективності аквапоринів, а також розробка біоміметичних водних каналів прискорить створення каналомодулюючих лікарських засобів для застосування у медицині та фармакології.

АКВАПОРИНЫ: СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ И ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

Чекман И.С., Симонов П.В.

Резюме. В статье рассмотрена молекулярная структура и аспекты функционирования природных водных каналов – аквапоринов. Приведена информация касательно существования различных типов данных трансмембранных протеинов в организме человека. Обобщены научные данные о роли аквапоринов в протекании физиологических и развитии патофизиологических процессов в организме человека. Рассмотрены результаты и перспективы исследований по разработке каналомодулирующих лекарственных средств для применения в медицине и фармакологии.

Ключевые слова: аквапорин, водный канал, селективность, аквапоринопатия.

AQUAPORINS: STRUCTURE, FUNCTIONS AND MEDICAL VALUE

Chekman I.S., Simonov P.V.

Abstract. Molecular structure and functionality aspects of natural water channels aquaporins have been discussed in the article. The information concerning the existence of different types of such transmembrane proteins in a human organism has been raised. Scientific data on the role of aquaporins in maintenance of physiological and a development of pathophysiological processes in a human organism have been summarized. Results and a prospective of a design of channel-modulating drugs for a use in medicine and pharmacology have been reviewed.

Key words: aquaporin, water channel, selectivity, aquaporinopathy.

Список використаних джерел (49) в редакції.