

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доцент Олексій Юрійович Нипорко
Протокол № ____ засідання кафедри
від “ ____ ” _____ 20__ р.

**Дослідження фармакологічних властивостей активації
пуринорецепторів та її зв'язку зі структурою ортостеричних
центрів**

Випускна кваліфікаційна робота магістра
студента спеціальності
091 Біологія
ОП «Біоінформатика і структурна біологія»
Пантелєвої Анастасії Сергіївни

Науковий керівник
Професор кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
д.б.н. **Цимбалюк Ольга Володимирівна**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Пантелєєва А.С. Дослідження фармакологічних властивостей активації пуринорецепторів та її зв'язку зі структурою ортостеричних центрів. – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 091 Біолгія ОП «Біоінформатика і структурна біологія».

У роботі проведено молекулярне моделювання ортостеричних центрів пуринорецепторів та дослідження участі пуринорецепторів у функціонуванні гладеньких м'язів шлунку щурів. Встановлено, що гладеньком'язові препарати антрального відділу шлунку щурів є зручною моделлю для подальшого вивчення фармакологічних ефекторів (агоністів і антагоністів) пуринорецепторів та процесів АТФ-індукованого гальмування-розслаблення кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку. Та було виявлено амінокислотний склад ортостеричних центрів пуринорецепторів, що надалі може бути використаним для рецептор-орієнтованого драг дизайну,

Ключові слова: пуринорецептори, ортостеричні центри, комп'ютерне моделювання, АТФ, гладенькі м'язи, antrum.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	8
1.1. Пуринорецептор P2X, його будова та функціонування.....	8
1.2. Представники пуринорецепторів P2X.....	11
1.2.1. P2X1 рецептор.....	11
1.2.2. P2X2 рецептор.....	12
1.2.3. P2X3 рецептор.....	13
1.2.4. P2X2/3 рецептор.....	13
1.2.5. P2X4 рецептор.....	14
1.2.6. P2X5 рецептор.....	14
1.2.7. P2X6 рецептор.....	14
1.2.8. P2X7 рецептор.....	14
1.3. Терапевтичний потенціал пуринорецепторів P2X.....	16
1.3.1. Серцево-судинна система.....	16
1.3.2. Клітини крові, імунітет, запалення та тромбоз.....	16
1.3.3. Нервова система.....	18
1.3.4. Травна система.....	18
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	20
2.1. Комп'ютерна візуалізація ортостеричних центрів пуринорецепторів.....	20
2.2. Підготовка гладеньком'язових препаратів та їх реєстрація скорочувальної активності.....	20
2.3. Механокінетичний аналіз методом Костеріна-Бурдиги.....	21
2.4. Методи статистичного аналізу експериментальних даних.....	22
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ....	23
3.1. Виявлення протеїн-лігандових взаємодій в ортостеричних центрах пуринорецепторів.....	23
3.1.1. Протеїн-лігандові взаємодії ортостеричного центра P2X3....	23
3.1.2. Протеїн-лігандові взаємодії ортостеричного центра P2X4....	26
3.1.3. Протеїн-лігандові взаємодії ортостеричного центра P2X7....	27
3.2. Дослідження участі пуринорецепторів у функціонуванні гладеньких м'язів шлунку щура.....	29
3.3. Планування дослідження <i>in silico</i> та <i>in vitro</i> фармакологічних властивостей сполук-агоністів і антагоністів пуринорецепторів.....	31
ВИСНОВКИ.....	34

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	35
---------------------------------	----

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ - аденозинтрифосфат

ЦТФ - цитозинтрифосфат

P2XR – рецептор P2X

TM2 – трансмембранний домен 2

ТНФ-АТФ – тринітрофенил-аденозинтрифосфат

ВСТУП

Пуринорецептори – мембранні рецептори, які активуються позаклітинними пуриновими нуклеотидами, широко експресуються у тканинах організму людини (нейронах центральної і периферійної нервової системи, вісцеральних і судинних гладеньких м'язах, нирках, шкірі, повітроносних шляхах, серцевому м'язі, печінці тощо). До пуринорецепторів відносять P2Y (метаботропні, відомо вісім підтипів) і P2X (іонотропні, тримерні іонні канали, які формуються з семи ізоформ субодиниць) рецептори, а також рецептори аденозину P1 (метаботропні, відомо чотири підтипи A₁-A₄). Позаклітинна поява АТФ і інших нуклеотидів пояснюється їх вивільненням з клітин в нормі (за рахунок синаптичної трансмісії та екзоцитозу) та при стресі і пошкодженні клітин (за гіпоксії, ішемії та механічному пошкодженні клітин).

З порушеннями вивільнення пуринів, а також експресії, регуляції і функціонування пуринорецепторів пов'язані поширені захворювання, зокрема, рак, діабет і гіпертонічна хвороба, а також патологічні стани як нейродегенерація, запалення, тромбоз і вісцеральний біль. Наразі затвердженими лікарськими засобами є протитромботичні препарати (антагоністи P2Y₁₂), засіб від синдрому сухого ока (агоніст P2Y₂), а також препарати-ефектори P₁-рецепторів для лікування тахікардії шлуночків (агоніст аденозинових рецепторів A₁) і хвороби Паркінсона (антагоніст A_{2A}-рецепторів). Також провідними науковими центрами світу активно проводяться дослідження, спрямовані на розробку лікарських засобів, діючими речовинами яких є ефектори пуринорецепторів. До прикладу, натепер клінічні випробування проходять препарати на основі антагоністів P2X₃-пуринорецепторів для терапії гіпертонічної хвороби і хронічного вісцерального болю.

Наразі отримані кристалографічні структури P1- і P2Y-рецепторів, досить добре вивчені їх молекулярні властивості. Також отримані канонічні, селективні агоністи і антагоністи всіх підтипів аденозинових рецепторів і

окремих підтипів P2Y-пуринорецепторів. Втім, натепер фармакохімія P2X-пуринорецепторів залишається слабо розробленою, а пошук фармакологічних інструментів (агоністів і антагоністів) цих рецепторів переважно базується на емпіричних дослідженнях *in vitro*. Оскільки терапевтичний потенціал вибіркової модуляції саме P2X-пуринорецепторів надзвичайно широкий (саме ці рецептори пов'язані із онкологічними захворюваннями, діабетом, запаленнями, больовими відчуттями в нормі за патологій, ішемією тощо), наразі мають надзвичайну актуальність комплексні дослідження *in silico* та *in vitro* фармакологічних властивостей активації P2X-пуринорецепторів та встановлення їх зв'язків зі структурою ортостеричних центрів – як перспективний напрямок спрямованого пошуку селективних агоністів та антагоністів цих іонних каналів.

Мета роботи полягає у здійсненні аналізу ортостеричних сайтів окремих (найбільш перспективних фармакологічних мішеней для терапії поширених патологій людини) P2X-пуринорецепторів (P2X₃, P2X₄ і P2X₇), визначенні їх фармакологічних властивостей та моделюванні зв'язування з агоністами та конкурентними антагоністами.

Відповідно до мети було поставлено наступні **задачі**:

1. Змоделювати та порівняти сайти зв'язування P2X₃-пуринорецепторів з лігандами АТФ, 2-метилтіо-АТФ, конкурентним антагоністом А-317491 та ТНФ-АТФ.
2. Змоделювати та порівняти сайти зв'язування P2X₄-пуринорецепторів з лігандами АТФ та ЦТФ.
3. Змоделювати та порівняти сайти зв'язування P2X₇-пуринорецепторів з лігандами АТФ та ТНФ-АТФ.
4. Дослідити участь активації пуринорецепторів у функціонування гладеньких м'язів шлунку щурів.
5. Розробити схему дослідження *in silico* та *in vitro* фармакологічних властивостей сполук-агоністів і антагоністів пуринорецепторів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Пуринорецептор P2X, його будова та функціонування

Пуринорецептори підтипу P2X відносяться до неселективних іонних каналів, що зазвичай пропускають катіони та активуються позаклітинним АТФ. [1,2]. Існує 7 генів пуринорецептору (P2XR1-7), котрі кодують 7 різних мономерів (P2X1-7) [1]. Структурно рецептор P2X складається з трьох субодиниць, які можуть бути як однойменними, так і різнойменними. При такому різноманіттю комплексів все ж зберігається неселективність іонного каналу, але має вплив на чутливість до АТФ-подібних агоністів та до малих молекул антагоністів. [1,3].

Кожна субодиниця (див. Рис.1.1) має внутрішньоклітинні С- і N-кінці, два трансмембранні домени та позаклітинний домен, що відповідає за активацію рецептора. Ортостеричний центр, за дельфіноподібною моделлю [4] представлення просторової структури (див. Рис.1.1, Рис.1.2), розташовуються між головою та лівим і спинним плавцем сусідньої субодиниці [5].

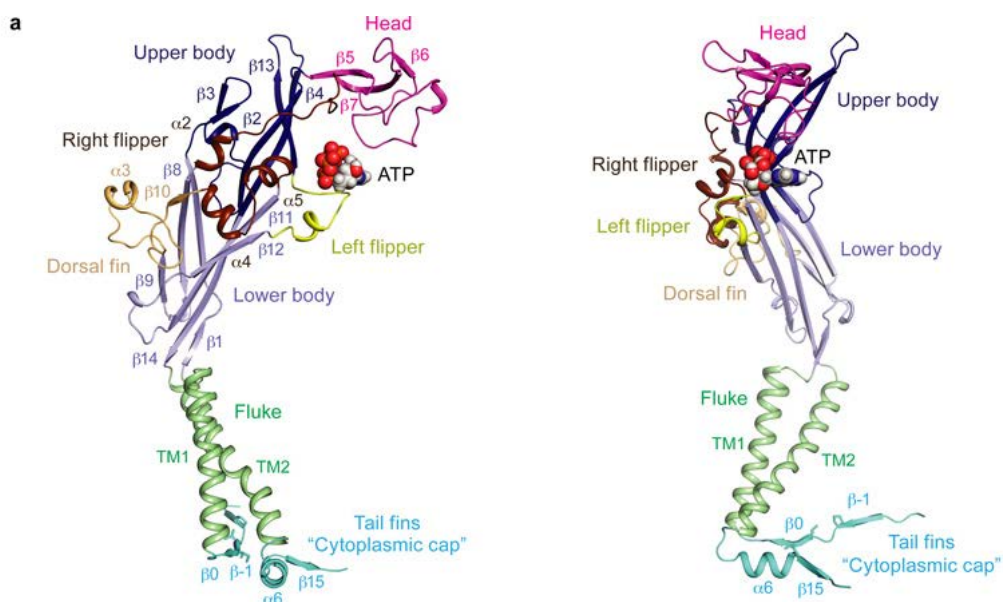


Рис.1.1. Просторова будова мономеру пуринорецептору P2X. Стрічкове представлення однієї субодиниці структури відкритого стану людського

рецептора P2X3 показано в ортогональних видах. Новий домен «цитоплазматичної шапки» називається «хвостовим плавником» [3]

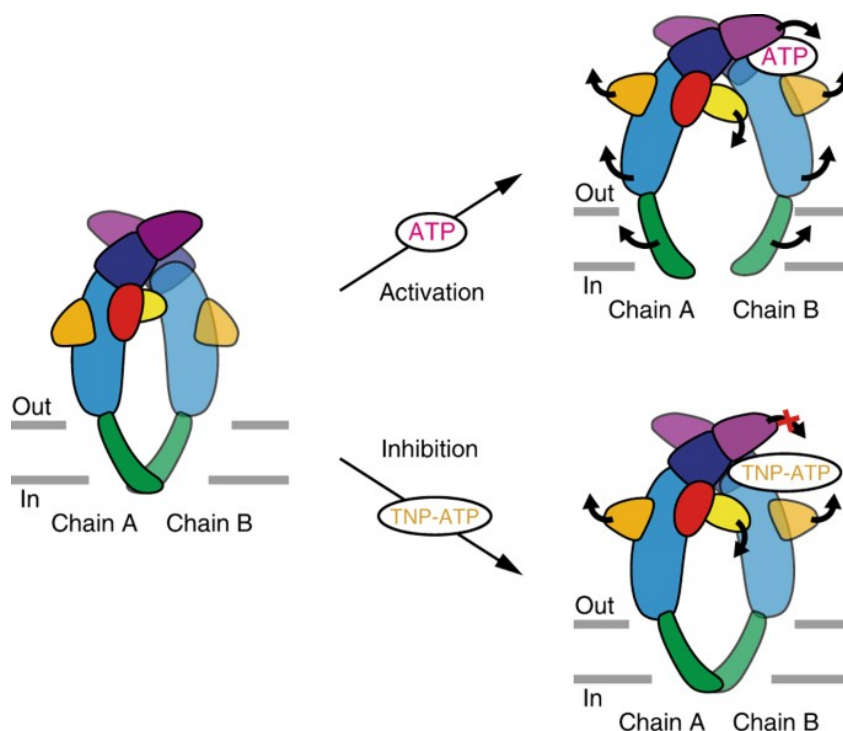


Рис.1.2. Механізм ТНФ-АТФ-залежного інгібування. Мультяшне представлення АТФ-залежного активування та ТНФ-АТФ-залежного інгібування. Чорні стрілки вказують на рухи, спричинені активуванням АТФ, з апо, закритого стану (ліворуч) до пов'язаного з АТФ, відкритого стану (праворуч, угорі). Чорна стрілка з червоним хрестом вказує на переміщення, викликане ТНФ-АТФ, з апо, закритого стану (ліворуч) до закритого стану, пов'язаного з ТНФ-АТФ (праворуч, унизу) [2]

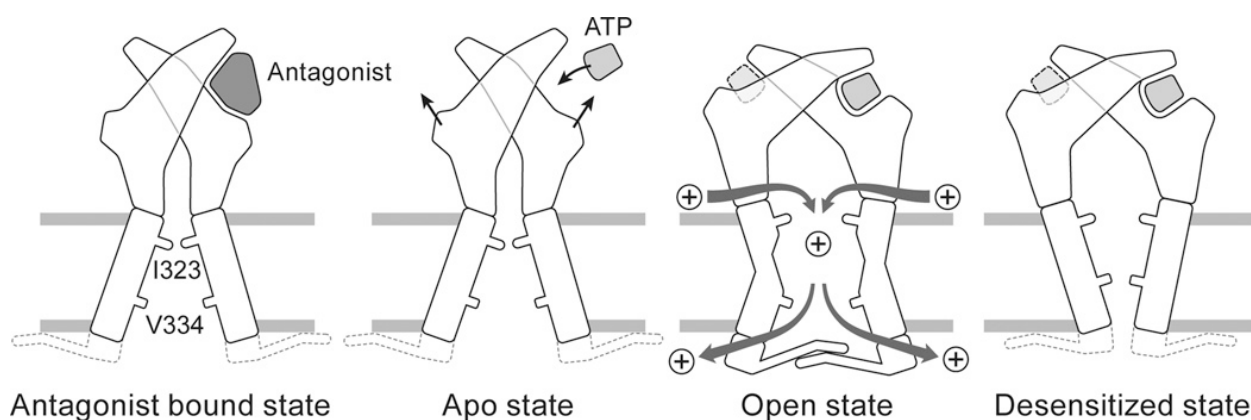


Рис.1.3. Схематична модель, що підсумовує механізми активації, десенсибілізації, проникнення/виходу іонів та дії антагоністів на рецептори P2X [3].

Загалом, функціонування каналу P2XR складається з трьох фаз (див. Рис.1.3): швидкої фази вхідного струму, індукованого застосуванням агоніста (фаза активації), фази повільного розпаду в присутності агоніста (фаза десенсибілізації) і швидкого спаду струму після видалення АТФ. (фаза дезактивації). Пуринорецептори P2XR відрізняються насамперед своєю чутливістю до агоністів і швидкістю десенсибілізації (див. Табл.1.1) [1,6.]. Нативний іонний канал зазвичай відкривається після зв'язування з 3 молекулами АТФ [7].

Табл.1.1. Властивості рекомбінантних P2X рецепторів [8]

Receptor	ATP EC ₅₀ (μM)	α,β-meATP sensitive	Time course	Commercially available selective antagonist
P2X1	~1	Yes	Rapid desensitization	NF449
P2X2	~10	No	Minimal desensitization	None
P2X3	~1	Yes	Rapid desensitization	A-317491
P2X4	~10	No	Intermediate desensitization	5-BDBD
P2X5	~3–10	No	Minimal desensitization	None
P2X6	Rarely forms functional channels	Yes	Minimal desensitization	None
P2X7	~300	No	Currents show run-up to repeated applications of ATP and little or no desensitization	AZ1061620, A740003, A438079
P2X2/3	~1	Yes	Minimal desensitization	A-317491
P2X1/5	~0.1	Yes	Rapid and sustained components	NF449

Функціональний цикл рецептора P2X починається зі зв'язування АТФ між двома субодиницями, що індукує закриття щілини і, через структурне з'єднання, «згинання» нижньої частини тіла назовні (див. Рис.1.2). Оскільки β-листки домену нижньої частини тіла безпосередньо з'єднані з трансмембранними спіралями, їх рух назовні «тягне» цитоплазматичні частини трансмембранних доменів. Ця конформаційна зміна в позаклітинному домені викликає три основні структурні зміни в трансмембранних доменах і цитоплазматичних доменах під час переходу з апо у відкритий стан: обертання ТМ2 проти годинникової стрілки, щоб відкрити пору, зміна спірального кроку для повороту ТМ2 від α-спіралі до спіралі 3₁ о і, нарешті,

утворення «цитоплазматичної шапки», яка закріплює цитоплазматичну поверхню трансмембранних доменів і забезпечує «цитоплазматичні фенестрації», через які іони виходять з пори [3].

Перехід з відкритого стану в десенсибілізований (див. Рис.1.3) має дві основні особливості: цитоплазматичний шапка розгортається або розбирається, і TM2 «відкатується» вгору, повертаючи короткий відрізок спіралі Z_1 до α -спіралі, дозволяючи порі закритися при новому сайті звуження, що розташований глибше в мембранному бішарі. Таким чином, перехід TM2 з відкритого стану в десенсибілізований нагадує відкат пружини, яка була розтягнута зверху і згодом випущена знизу. Ця модель десенсибілізації рецепторів називається «спіральною віддачею» і припускається, що структура цитоплазматичної шапки стабілізує відкритий стан, а її стабільність налаштовує швидкість і ступінь десенсибілізації рецепторів. [1, 9-11]

Ранні дослідження, що вивчали шлях іонного проникнення P2XR, виявили мутації в трансмембранних доменах, які призводять до спонтанної активації рецептора [12-13]. Це показало, що канал може відкриватися за відсутності зв'язування АТФ, що свідчить про притаманні успадковані рухи рецептора в стані спокою за винятком переломної точки, що призводить до відкриття каналу. Цікаво, що частота спонтанних розкриттів у цих мутантів може бути збільшена шляхом зв'язування цинку в сайті зв'язування металу поблизу ортостеричного центру для АТФ [14], що додатково підтверджує наявність прямого зв'язку між порою та сайтом зв'язування агоніста.

Структурна характеристика варіацій у процесах зв'язування ортостеричних антагоністів і відкриття окремих P2XR паралог-специфічних алостеричних сайтів зв'язування, зокрема, показують великі перспективи для розробки ліків P2XR [15, 16].

1.2. Представники пуринорецепторів P2X

1.2.1. P2X1 рецептор

Сайт зв'язування рецептора P2X1 складається з ароматичних амінокислотних залишків, так само як і для інших АТФ-зв'язуючих рецепторів. Такий склад може забезпечувати селективність зв'язування з нуклеотидними основами та рибозним кільцем, при цьому амінокислотні залишки є позитивно зарядженими та можуть взаємодіяти з негативно зарядженими фосфатними групами [17].

Визначною особливістю рецепторів P2X1 є швидка десенсибілізація під час взаємодії з АТФ, яка пов'язана з взаємодією між гідрофобними трансмембранними доменами. Рецептори P2X1 можуть збиратися в гетеромерні комплекси разом з субодиницями P2X4 [1].

За реконструкцією просторової структури методом моделювання за гомологією, можна виділити амінокислотні залишки ортостеричного центру пуринорецептору P2X1, до них відносяться позитивно заряджені Lys68, Lys70, Arg292 та Lys309, що взаємодіють з негативно зарядженими киснем фосфатних груп АТФ, Val67, Phe100, Phe289, Phe291 і Phe92 – з аденіном, Phe92 і Ala88 – з рибозою [1].

Різноманітні протеїни, що взаємодіють з P2X1R, було ідентифіковано [18]. Функціональні дослідження показали, що інгібування шаперону HSP90 [19], порушення цитоскелету [19] або виснаження холестерину за допомогою метил- β -циклодекстрину знижують P2X1R-опосередковані реакції [18]. Цікаво, що стабілізація цитоскелета захищає рецептор від зниження рівня холестерину, що демонструє взаємодію цитоскелета і холестерину в регуляції P2X1R [15].

1.2.2. P2X2 рецептор

Рецептор P2X2 експресується на сенсорних нейронах та характеризується повільною десенсибілізацією [6,20-21].

Було показано, що С-кінцева область P2X2R взаємодіє з вісінін-подібним білком (VILIP1) [22]. Цей нейрональний датчик кальцію зменшив чутливість АТФ, але збільшив експресію та щільність струму, а також рухливість рецепторів. Спричинені АТФ конформаційні зміни в С-кінцевій області

P2X2R посилює взаємодію з VILIP1. P2X2R також коімунопреципітують і спільно локалізуються з циклінзалежною кіназою 5, яка може регулювати властивості каналу в нативних і рекомбінантних системах [23].

Ймовірно сайт зв'язування АТФ складається з Lys69, Lys71, Asn140, Leu186, Lys188, N288, Phe289, Arg290 і Lys308. Наявність лізину у сайті зв'язування характерна для рецепторів P2X, що ймовірно свідчить про важливу роль у активності каналу. Lys69 одночасно зв'язується з α , β і γ фосфатними групами, і його відсутність або незначне порушення може порушити функціональність рецептора [24,1].

1.2.3. P2X3 рецептор

Рецептор P2X3 експресується на сенсорних нейронах [6] та характеризується швидкою десенсибілізацією, й різною мірою реагує на модифікації АТФ агоністів [25;26].

Pirt — це невеликий трансмембранний білок, який, як було показано, є ендogenousним інгібітором P2X3R (а також регулятором TRPV1 і TRPM8))[27]. Дослідження на мишах показали важливий внесок P2X3R у контроль сечового міхура (наприклад, зменшення сечовипускання та збільшення об'єму під час сечовипускання у миші з нокаутом P2X3R). Узгоджується з цим і висновок про те, що при Pirt дефіциті у мишей спостерігалось збільшення щільності струму P2X3R і збільшення випорожнення сечового міхура.

Вважається, що сайт зв'язування АТФ в рецепторі P2X3 людини містить залишки Lys63, Gly66, Thr172, Lys176, Asn177, Ser275, Asn279, Arg281, Arg295 і Lys299 [1]. У рецепторі P2X3 залишок D266 пов'язаний з алостеричною модуляцією, при якій позаклітинний іон кальцію діє як алостеричний ефектор. У 2011 р. було запропоновано, що залишок D266 відіграє стабілізуючу роль у ділянці лівого плавника, що бере участь у зв'язуванні агоніста [28].

1.2.4. P2X2/3 рецептор

Як приклади гетеромерних конфігурацій рецепторів P2X, P2X1 може поєднуватися з P2X2, P2X5 або P2X6, а P2X2 може утворювати асоціації з P2X3, P2X4 або P2X5. Гетеромерний рецептор P2X2/3 демонструє фармакологічну поведінку, подібну до P2X3, але профіль десенсибілізації подібний до профілю P2X2R [29].

1.2.5. P2X4 рецептор

Рецептор P2X4 є одним з найбільш вивчених підтипів P2X. За допомогою метода рентгенівської кристалografії було підтверджено топологію субодиниць, що має два трансмембранні сегменти, пов'язані з великою позаклітинною петлею, що складається в основному з мотивів бета-листів, та тримерну структуру, яка має трансмембранний домен у формі пісочного годинника, що складається з шести альфа-спіральних сегментів (трьох TM1 і трьох TM2), з трьома спіралями TM2, що перетинають половину його довжини в центрі пори і нахиляються під 45° відносно осі мембрани, таким чином обмежуючи ворота каналу [1].

Ранні дослідження щодо десенсибілізації та зменшення реакцій, опосередкованих P2X4R, показали, що рецептор конститутивно інтерналізується і повертається до мембрани динамінозалежним чином [30]. Подальша робота показала, що існує неканонічний сайт для клатринового адаптерного комплексу AP2 на С-кінці P2X4R, а кристалічна структура С-кінцевого фрагмента в комплексі з AP2 підвищує ступінь взаємодії [31]. Ця область була відрізана від кристалічних структур P2XR, але була б доступною на периферії/зовнішній поверхні шапки структури людського P2X3R [3].

1.2.6. P2X5 рецептор

Рецептор P2X5 – найменш вивчений серед усіх рецепторів P2X, оскільки є найменш консервативним щодо амінокислотної послідовності. Та являться єдиним аніон-селективним рецептором в підродині. Рецептор P2X5 може утворювати гетеротримери з P2X1 і P2X2 [32-33].

1.2.7. P2X6 рецептор

Про тривимірну структуру рецептора P2X₆ відомо дуже мало, насамперед тому, що цей рецептор не гомо-олігомеризується, що запобігає утворенню каналу в гомомерній формі; цей рецептор функціонує лише при олігомеризації з P2X₂ або P2X₄ [34-35].

1.2.8. P2X₇ рецептор

Загальна структура P2X₇ схожа на структуру інших членів сімейства P2X, за винятком С-кінця [36]. Довга С-кінцева послідовність (239 амінокислотні залишки) P2X₇ є унікальною серед членів сімейства P2X і включає кілька інших мотивів розпізнавання білків і ліпідів, а також багатий цистеїном домен. Крім того, P2X₄ набагато більш чутливий до АТФ, ніж P2X₇ [1].

Передбачуваний сайт зв'язування АТФ розташований між двома сусідніми субодиницями, і більшість його залишків заряджені позитивно (Lys64, Lys66 і Lys197 в одній субодиниці і Arg294 і Lys311 в іншій) [1].

Нем'язовий міозин був ідентифікований як білок, що взаємодіє з P2X₇R, та забезпечує зв'язок між рецептором і цитоскелетом [37]. Активація за допомогою АТФ призводить до дисоціації міозину від P2X₇R і пов'язана з поглинанням барвника/утворенням пор великого каналу. HSP90 також може регулювати функцію, оскільки лікування інгібітором HSP90 гелданамицином збільшує амплітуду відповідей P2X₇R; цей ефект не спостерігався після скорочення С-кінця [38]. Кальцій-залежна фосфоліпідна скрамблаза та активований кальцієм хлоридний канал аноктамін 6 спільно імунопреципітують з P2X₇R у макрофагах. Це може бути важливим у відповіді на тривалу активацію P2X₇R, оскільки P2X₇R-опосередковане внутрішньоклітинне підвищення кальцію активує аноктамін 6 і поглинання барвника, і, що цікаво, P2X₇R знижується після нокдауну аноктаміну [39].

Опосередкована P2X₇R активність каналів зросла після експериментального зниження рівня холестерину [40;41], а утворення каналів чутливе до ліпідного середовища [42]. Як внутрішньоклітинний N-кінець, так і проксимальний С-кінець сприяють підвищенню чутливості до холестерину [41], а нещодавні дослідження виявили, що пальмітоїлювання С-кінця

зменшує інгібуючий ефект мембранного холестерину [42]. Чутливість до холестерину має патофізіологічний зв'язок із синдромом Маджида при запальному захворюванні, який пов'язаний з мутацією *Lipin-2*. Мутація призводить до усунення негативного регуляторного впливу на MAPK, а також до зниження рівня холестерину, таким чином збільшуючи активність P2X7R [38]. С-кінцева область, яка є відмінною для P2X7R, також може бути місцем регуляції за допомогою Src-залежного фосфорилування за участю залишків тирозину 382–384 (консервованих у щурів, мишей і людини), що призводить до потенціювання відповідей і сприяє толерантності у відповідь на повторне лікування морфіном [43].

1.3. Терапевтичний потенціал пуринорецепторів P2X

1.3.1. Серцево-судинна система

Тонус кров'янистих судин частково регулюється рецептором P2X1, що сприяє загальному нейрогенному звуженню артерій та ауторегуляції кровотоку в нирках [44]. Активація рецептора P2X4, що експресується на ендотелії, призводить до вироблення оксиду азоту та розширення артерій [44], що в свою чергу підвищує пульсовий тиск [45]. Крім того, АТФ бере участь у більш централізованому контролі артеріального тиску, діючи на аортні P2XR та хеморецептори каротидного тіла [46]. Неконкурентний алостеричний антагоніст рецептора P2X3 - AF-219 (ліцензований для лікування кашлю) знижував кров'яний тиск, частоту серцевих скорочень і частоту дихання у щурів зі спонтанною гіпертензією без впливу на тварин з нормальним тиском. Ці результати підкреслюють потенціал антагоністів P2X3R для лікування гіпертонії [47].

Атеросклероз є важливим фактором серцево-судинного ризику і має запальний компонент, що свідчить про можливе задіяння рецептора P2X7, який відповідає за запалення. З цим узгоджується приблизно в 20 разів вища експресія P2X7R в бляшках сонної артерії людини в порівнянні з здоровими ділянками [48]. Додаткове підтвердження теорії надходить від мишачих

моделей атеросклерозу, які демонструють 50% зменшення площі ураження в бляшках у мишей з дефіцитом P2X7R [8].

1.3.2. Клітини крові, імунітет, запалення та тромбоз

На ряді клітин крові експресуються рецептори P2X1, P2X4 P2X7. Переважну роль відіграють P2X1R у згортанні крові, P2X7R в імунних реакціях і P2X4R у посередницьких реакціях мікроглії. Були описані функціональні реакції макрофагів, опосередковані P2X1, P2X4 P2X7 [49; 50]. Однак останній інтерес зосереджується на внеску P2X7R в інфекційні та запальні явища [51]. Потенційна терапевтична роль антагоністів P2X7R була підтверджена, після демонстрації ролі цього рецептора у відторгненні трансплантата [52, 53.]. Активація P2X7R є частиною природного захисного механізму організму, до того ж P2X7R макрофагів беруть участь у реагуванні на сепсис шляхом потенційного внутрішньоклітинного знищення бактерій [50].

P2X1R експресується на тромбоцитах і діє як канал для швидкого надходження кальцію, який відіграє посилюючу роль у передачі сигналів, пов'язаних з низкою тромботичних шляхів. Маніпулювання активністю P2X1R за допомогою нокаутів, селективного антагоніста NF449 та специфічної для клітинного типу гіперекспресії P2X1R показало, що рецептор сприяє тромбозу, але мало впливає на нормальну кровотечу [54]. P2X1R також експресується на нейтрофілах і сприяє їх функціям; в місці пошкодження кровоносної судини нейтрофіли накопичуються першими та ініціюють рекрутинг тромбоцитів. Експресія P2X1R як на нейтрофілах, так і на тромбоцитах необхідна для тромбозу [55].

Підвищений вміст внутрішньоклітинного кальцію опосередковує активацію Т-лімфоцитів, значний вплив у цьому процесі мають P2X1, P2X4 P2X7 [56]. Цікаво, що P2X5R активує людські Т-клітини (збільшення мРНК у 13 разів), а дослідження нокдауну показали, що рецептор також може сприяти полярності Т-клітин [57]. Активація Т-клітин призводить до вивільнення АТФ і аутокринної та паракринної передачі сигналів. У

лімфатичних вузлах це призводить до опосередкованих P2XR кальцієвих хвиль у сусідніх лімфоцитах та зниження рухливості [58].

На додаток до своєї функціональної ролі в імунних клітинах, P2X7R також експресуються в ряді карцином, що каже про підвищений рівень АТФ. Більше того, передача сигналів P2X7R регулює як імунні, так і ракові клітини та забезпечує потенціал для нових терапевтичних методів лікування [59-60].

1.3.3. Нервова система

Нейрони, гліальні клітини та імунні клітини нервової системи (мікроглія) не тільки зберігають і вивільняють АТФ, але й експресують P2XR. Приклади функцій P2XR у нервовій системі варіюються від регуляції моторики кишечника до забезпечення потенційного лікування епілепсії, нервово-психічних розладів, хвороби Паркінсона та хвороби Альцгеймера (огляд в 115–120) [6,61-65].

1.3.4. Травна сиситема

P2X-рецептори широко експресуються в травній системі. В основному експресуються в аферентних вагальних нейронах стравоходу і гладких м'язових клітинах стравоходу. У шлунку P2X-рецептори в основному експресується в підслизовому нервовому сплетенні, мієнтерічному нервовому сплетенні, гладком'язових клітинах і клітинних лініях раку шлунка. До того ж вони широко експресується в клітинах паренхіми печінки, а також у деяких непаренхімних клітинах, таких як клітинах жовчних проток, фібробластах печінки, зірчастих клітинах печінки та гепатоцелюлярній карциномі. У підшлунковій залозі рецептори експресується в епітеліальних клітинах протоки підшлункової залози. У кишечнику рецептори P2X в основному експресуються в підслизовому нервовому сплетенні, міжм'язовому нервовому сплетенні, клітинах Кахала (ICC), імунних клітинах кишечника (макрофаги та клітини глії) та клітинах колоректального раку. Фізіологічні функції P2X-рецепторів у травній системі доволі різноманітні,

до них відносяться нейротрансмісія, транспорт іонів, проліферація і апоптоз, скорочення і розслаблення м'язів в органах травлення (див. Рис.1.4) [66].

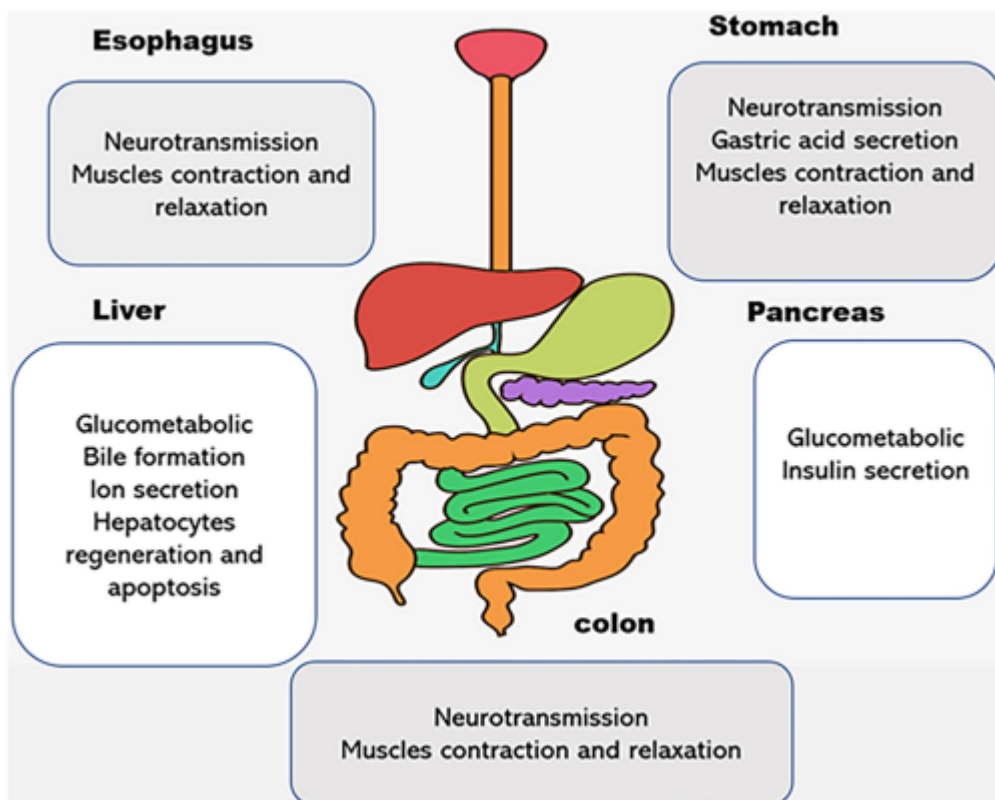


Рис.1.4. Фізіологічні функції P2X-рецепторів у травній системі [66]

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Комп'ютерна візуалізація ортостеричних центрів пуринорецепторів

Визначення ортостеричних центрів проводилося на базі експериментально підтверджених комплексів 6AH4, 5SVK, 5SVM, 5SVL, 5SVR, 5SVQ, 4DW1, 5WZY, 5XW6, 6U9W з RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Протеїн-лігандові взаємодії оцінювалися за допомогою безкоштовної версії програмного пакету BIOVIA Discovery Studio Visualizer (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer>).

2.2. Підготовка гладеньком'язових препаратів та їх реєстрація скорочувальної активності

Тензометричні дослідження проводили на препаратах кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку (*antrum*) щурів. В експериментах використовували самців щурів (вага 200 – 250 г). Робота з лабораторними тваринами проводилася згідно з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовується в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) та Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Забій тварин здійснювали шляхом дислокації шийних хребців в умовах ефірного наркозу. Після вилучення шлунку, його промивали розчином Кребса та звільняли від слизової оболонки. Препарати (кільцеві смужки м'язової тканини середнього розміру 2 x 10 мм) поміщали в робочу камеру тензометричного устаткування (ефективний об'єм 2 мл) з проточним розчином Кребса (швидкість протікання - 5 мл/хв, термостатуванням підтримувана температура 37 °C). Препаратам надавали пасивний натяг на 10 мН та залишали на 1 годину (до появи спонтанних скорочень постійної амплітуди і частоти а також скорочень, індукованих гіперкалієвим розчином, з постійними механокінетичними параметрами). Скоротливу активність досліджували в ізометричному режимі за допомогою ємнісного датчика сили; сигнали реєстрували, використовуючи АЦП та комп'ютер.

У дослідах використовували нормальний розчин Кребса (мМ): 120,4 NaCl; 5,9 KCl; 15,5 NaHCO₃; 1,2 NaH₂PO₄; 1,2 MgCl₂; 2,5 CaCl₂; 11,5 глюкоза; рН розчину при 37 °С становив 7,4. Гіперкалієвий розчин (містив іони K⁺ у концентрації 80 мМ) готували шляхом ізотонічної заміни в вихідному розчині Кребса необхідної частини іонів Na⁺ на еквімолярну кількість іонів K⁺.

2.3. Механокінетичний аналіз методом Костеріна-Бурдиги

Аналіз механокінетичних параметрів процесу скорочення-розслаблення гладеньком'язових препаратів здійснювали відповідно до методу Костеріна-Бурдиги [80]. В основу даного методу покладено лінеаризацію фази розслаблення механокінетичної кривої в координатах $\{\ln[(f_m - f)/f]; \ln t\}$, де f_m – величина максимальної сили скорочення (у випадку АТФ-індукованого розслаблення цей показник становив значення сили тонічного компонента скорочення, індукованого гіперкалієвим розчином). Час, в який досягається f_m , приймається початковою точкою відліку фази розслаблення $t = 0$ (момент аплікування АТФ); поточному значенню часу t відповідає значення миттєвої сили f .

З лінеаризованої кривої визначали робочі параметри:

- характеристичний час - $\ln \tau$ - відрізок, який відсікає на осі абсцис лінія, проведена через експериментальні точки,
- емпіричний параметр n – тангенс кута нахилу цієї лінії, який характеризує крутизну залежності $f(t)$: $n = \ln[(f_m - f)/f] / \ln(t/\tau)$.

Характеристичний час фази розслаблення τ має кінетичне трактування як час, за який механічне напруження м'язу спадає до напівмаксимального рівня ($1/2 f_m$). Сенс визначення транзитних параметрів (n і τ) є їх використання для розрахунку головної кінетичної характеристики процесу розслаблення, що не залежить від амплітуди, – нормованої максимальної швидкості розслаблення:

$$V_n = \frac{(n - 1)^{\frac{n-1}{n}} \cdot (n + 1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau}$$

Даний метод дозволяє розраховувати механокінетичні параметри, які характеризують спонтанні або викликані скоротливі відповіді та не залежать від амплітуди. Таким чином, він є важливим розрахунковим методом для порівняння скорочень, отриманих на гладеньком'язових препаратах різного розміру та за дії різних ефекторів скорочувальної активності (зокрема агоністів і антагоністів поуринорецепторів).

2.4. Методи статистичного аналізу експериментальних даних

Статистичну обробку результатів тензометричних експериментів та механокінетичний аналіз проводили в програмі OriginPro2018 (OriginLab Corporation, США). У випадку лінеаризованих механокінетичних графіків типове значення коефіцієнту детермінації R^2 становило 0,97 – 0,99.

Результати значень нормованої максимальної швидкості розслаблення представлені як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього, n – кількість дослідів.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Виявлення протеїн-лігандових взаємодій в ортостеричних центрах пуринорецепторів

3.1.1. Протеїн-лігандові взаємодії ортостеричного центра P2X3

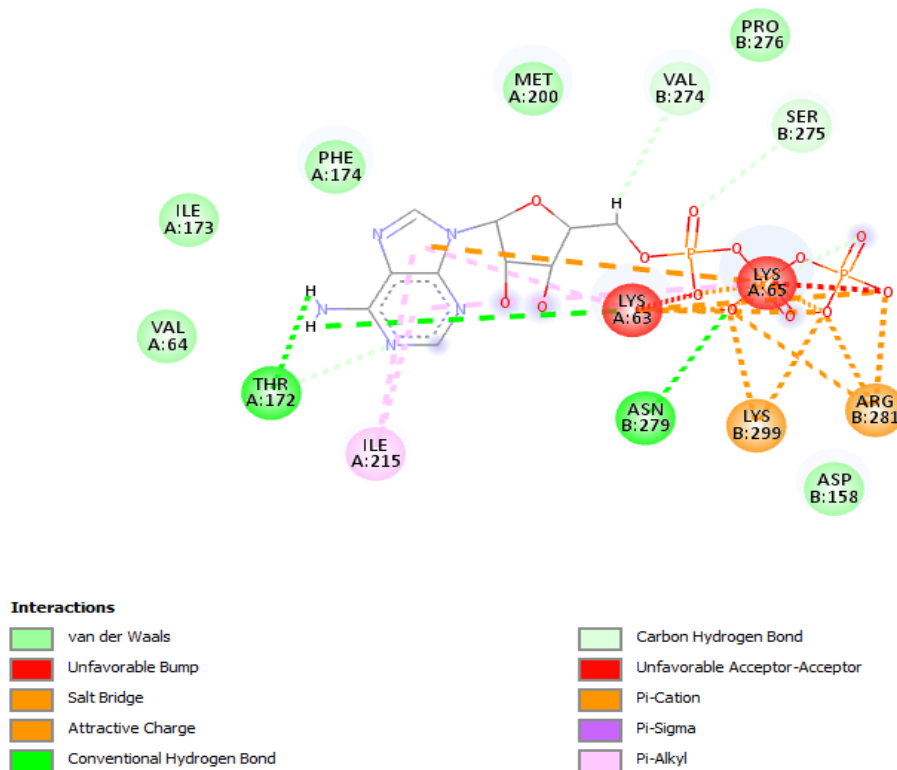


Рис.2.1. Двовимірна діаграма сайту зв'язування рецептора з АТФ

При візуалізації структури рецептора P2X3 (PDB: 6AH4), чітко видно, що ортостеричний центр (див. Рис.2.1) формують амінокислотні залишки двох субодиниць, а саме Lys63, Lys65, Ile215, Thr172, Val64, Ile173, Phe174, Met200 субодиниці А та Ser275, Arg281, Lys299, Asn279, Asp158, Val274, Pro276 субодиниці В. До того ж субодиниця В взаємодіє з рибозою та фосфатними групами АТФ, а субодиниця А в основному взаємодіє з пуриною частиною АТФ. Значна частина зв'язків припадає на вандерваальсові взаємодії амінокислотних залишків Asp158, Val64, Ile173, Phe174, Met200, Pro276. Сольові містки формуються з Lys63, Arg281, Lys299. У водневих зв'язках беруть участь Asn279, Lys63, Thr172, Lys65, Ser275,

Lys299, Val274. З π -орбітальми формують взаємодії амінокислотні залишки Lys65, Lys63, Ile215.

Оскільки кристалізовані структури рецептора P2X3 найчастіше зустрічаються у вигляді мономеру, подальший аналіз ортостеричних центрів P2X3R буде стосуватися лише взаємодій з однією субодиницею.

Порівнюючи сайти зв'язування таких агоністів як 2-метилтіо-АТФ та АТФ (див. Табл.2.1), маємо однакові набори амінокислотних залишків та типів взаємодій. Сольові містки з Arg281, Lys299 та водневі зв'язки з Ser275, Val274, Asn279.

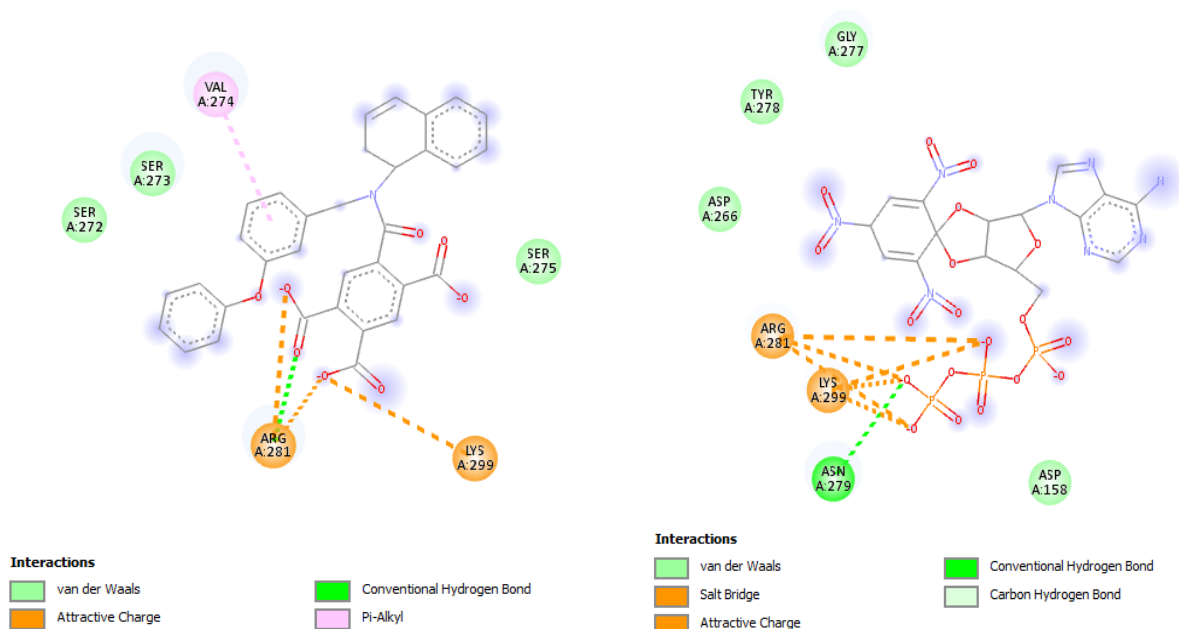


Рис.2.2. Двовимірні діаграми сайтів зв'язування рецептора P2X3 з лігандами: Зліва – конкурентним антагоністом А-317491; справа – конкурентним антагоністом ТНФ-АТФ

Аналізуючи сайти зв'язування рецептора P2X3 з конкурентними антагоністами А-317491 та тринітрофеніл-АТФ (див. Рис.2.2), можна виділити взаємодії у вигляді сольових містків з Arg281 та Lys299, характерні для обох антагоністів та й в загальному для всіх досліджуваних лігандів (див. Табл.2.1). Також слід відзначити наявність додаткових нехарактерних амінокислотних залишків, що формують вандерваальсові взаємодії: для

антагоніста А-317491 це Ser273, Ser272, для ТНФ-АТФ - Gly277, Tyr278, Asp266.

Окремо слід виділити амінокислотні залишки Ser275 та Val274 у сайті зв'язування рецептора P2X3 з конкурентним антагоністом А-317491, їх наявність характерна для ортостеричного центру, проте тип взаємодій відмінний. Val274 формує π -алкільний зв'язок з бензеновим кільцем, а Ser275 бере участь у вандерваальсових взаємодіях.

В той же час амінокислотні залишки Asp158 та Asn279 у сайті зв'язування рецептора P2X3 з конкурентним антагоністом ТНФ-АТФ, аналогічні по типу взаємодій для всіх досліджуваних лігандів.

Табл.2.1. Порівняння амінокислотних залишків, що формують сайт зв'язування рецептора P2X3 з лігандом

Код PDB	Ліганд	Амінокислотний залишок											
		Asp158				Val274	Ser275	Pro276			Asn279	Arg281	Lys299
6AH4	ATP					Val274	Ser275	Pro276			Asn279	Arg281	Lys299
5SVM	2-methylthio ATP					Val274	Ser275	Pro276			Asn279	Arg281	Lys299
5SVR	A-317491			Ser272	Ser273	Val274	Ser275	Pro276				Arg281	Lys299
5SVQ	TNP-ATP	Asp158	Asp266					Pro276	Gly277	Tyr278	Asn279	Arg281	Lys299
5SVK	ATP (open state)					Val274	Ser275	Pro276			Asn279	Arg281	Lys299
5SVL	ATP (closed state)					Val274	Ser275	Pro276			Asn279	Arg281	Lys299

Підсумовуючи все вище зазначене в Табл.2.1, маємо таку тенденцію по наявності амінокислотних залишків, що взаємодіють у ортостеричному центрі: найчастіше зустрічаються Arg281 та Lys299; далі йдуть Ser275, Val274, Asn279; рідше трапляються Asp158 та Pro276.

Табл.2.2. Порівняння амінокислотних залишків, що формують сайт зв'язування рецептора P2X3 з АТФ

Джерело структури	Амінокислотний залишок									
	Lys63	Val64	Lys65		Asp158	Thr172	Ile173	Phe174		
6AH4	Lys63	Val64	Lys65		Asp158	Thr172	Ile173	Phe174		
гомологія	Lys63			Gly66		Thr172			Lys176	Asn177

6AH4	Met20	Ile21	Val27	Ser27	Pro27	Asn27	Arg28		Lys29
------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--	-------

	0	5	4	5	6	9	1		9
гомологія				Ser27 5		Asn27 9	Arg28 1	Arg29 5	Lys29 9

У Табл.2.2 наводиться порівняння амінокислотних залишків обох субодиниць, що формують ортостеричний центр, рецепторів, чия просторова структурна інформація отримана шляхом рентгеноструктурного аналізу (PDB: 6AH4) та шляхом моделювання структури за гомологією [1]. Дане порівняння ще раз ілюструє стабільність амінокислотного складу у відповідних позиціях - Arg281, Lys299, Ser275, Asn279. Також наявні додаткові збіги - Thr172, Lys63.

3.1.2. Протеїн-лігандові взаємодії ортостеричного центра P2X4

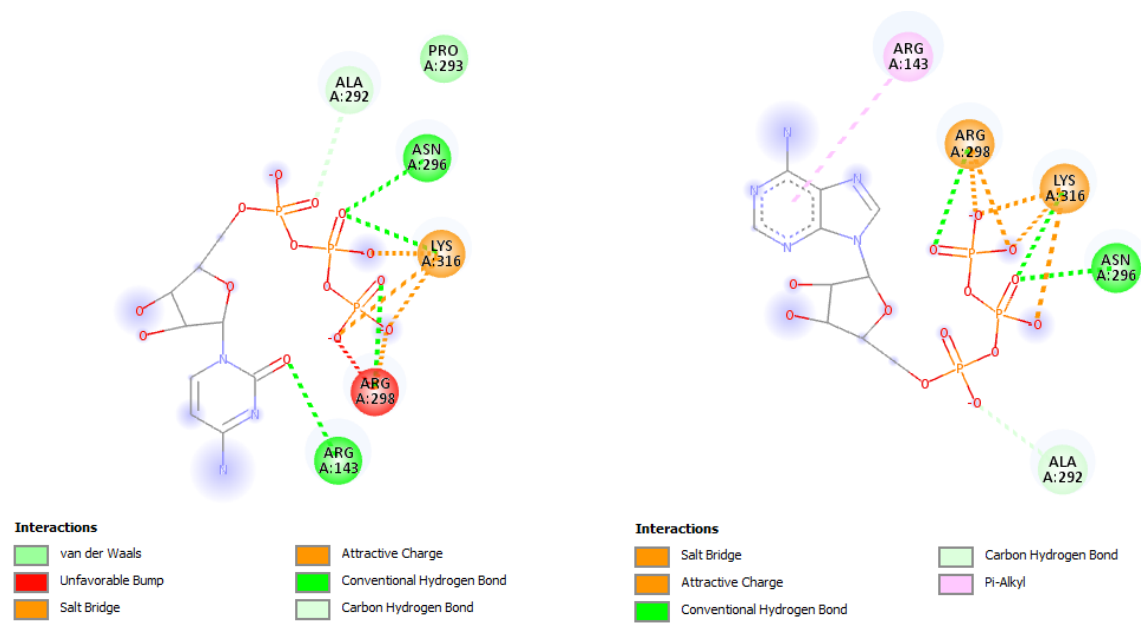


Рис.2.3. Двовимірні діаграми сайтів зв'язування. Зліва – іонний канал P2X4, зв'язаний з ЦТФ; справа - іонний канал P2X4 у зв'язаному з АТФ стані.

Аналізуючи сайти зв'язування рецептора P2X4 з ЦТФ та АТФ (див. Табл.2.3), спостерігаємо аналогічний амінокислотний склад ортостеричного центру, окрім наявності Pro293 у взаємодії з ЦТФ. Проте тип зв'язку для амінокислотного залишку Arg143 має відмінний характер (див. Рис.2.3) – водневий зв'язок з цитозином та π -алкільний зв'язок з аденіном.

Табл.2.3. Порівняння амінокислотних залишків, що формують сайт зв'язування рецептора P2X4 з лігандом

Код PDB	Ліганд	Амінокислотний залишок					
		Arg143	Ala292	Pro293	Asn296	Arg298	Lys316
5WZY	ЦТФ	Arg143	Ala292	Pro293	Asn296	Arg298	Lys316
4DW1	АТФ	Arg143	Ala292		Asn296	Arg298	Lys316

3.1.3. Протеїн-лігандові взаємодії ортостеричного центра P2X7

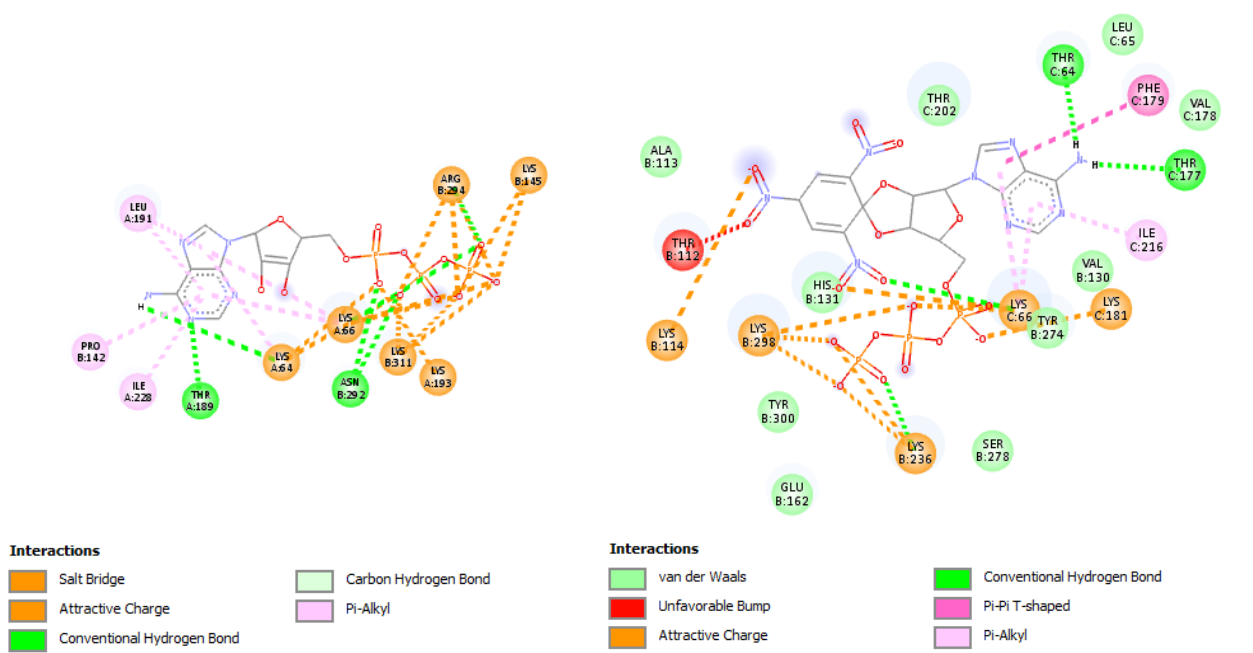


Рис.2.4. Двовимірні діаграми сайтів зв'язування. Зліва – іонний канал P2X7, зв'язаний з АТФ; справа - іонний канал P2X7 у зв'язаному з ТНФ-АТФ стані

Сайт зв'язування рецептора P2X7 з АТФ формують амінокислотні залишки двох субодиниць: до субодиниці А відносяться Lys66, Lys64, Lys193, Leu191, Ile228, Thr189, тоді як Pro142, Asn292, Lys311, Arg294, Lys145 до субодиниці В. Типи взаємодій в ортостеричному центрі P2X7 є характерними для таких серед інших досліджених ортостеричних центрів. Сольові містки утворюються з амінокислотними залишками Lys66 та Lys311. Електростатичні взаємодії з Lys66, Lys64, Lys193, Lys311, Arg294, Lys145. Водневі зв'язки формуються з Lys66, Thr189, Asn292, Arg294, Lys64. В π-алкільних зв'язках беруть участь Lys66, Lys64, Leu191, Ile228, Pro142.

У сайті зв'язування рецептора P2X7 з ТНФ-АТФ також беруть участь дві субодиниці, з таким амінокислотним складом: Ala113, Thr112, Lys114, Lys298, His131, Tyr300, Glu162, Lys236, Ser278, Tyr274, Val130 для субодиниці В; Thr202, Thr64, Leu65, Phe179, Val178, Thr177, Ile216, Lys181, Lys66 для субодиниці С. В електростатичних взаємодіях задіяні Lys66, Lys181, Lys114, Lys236, Lys298. Водневі зв'язки формують амінокислотні залишки Lys66, Lys236, Thr64, Thr177. П-алкільні зв'язки утворюють Lys66 та Ile216. Окрім характерних електростатичних, водневих та π -алкільних взаємодій, наявний π - π Т-подібний зв'язок Phe179 з аденозином, до того ж значна частина амінокислотних залишків формує вандерваальсові взаємодії, а саме Ala113, Tyr300, Glu162, Ser278, Thr202, Leu65, Val178, Val130, Tyr274.

Табл.2.4. Порівняння амінокислотних залишків двох субодиниць, що формують сайт зв'язування рецептора P2X7 з лігандом

P2X7R	Ліганд	Амінокислотний залишок												
5XW6	ТНФ-АТФ	Thr64	Leu65	Lys66	Thr177	Val178	Phe179	Lys181				Thr202	Ile216	
6U9W	АТФ	Lys64		Lys66					Thr189	Leu191	Lys193			Ile228
гомологія	АТФ	Lys64		Lys66						Leu191	Lys197			

P2X7R	Ліганд	Амінокислотний залишок							
5XW6	ТНФ-АТФ	Thr112	Ala113	Lys114	Val130				
6U9W	АТФ					His131	Pro142	Lys145	
гомологія	АТФ							Lys145	

Амінокислотний залишок											
	Glu162	Lys236	Tyr274			Ser278			Lys298	Tyr300	
							Asn292	Arg294			Lys311
				Arg276	Arg277			Arg294			Lys311

У Табл.2.4 проведено порівняння амінокислотного складу ортостеричних центрів, сформованих двома субодиницями рецептора P2X7, просторова структура яких отримана шляхом рентгеноструктурного аналізу та моделюванням за гомологією. Аналізуючи Табл.2.4, спостерігаємо незначну кількість стабільних амінокислотних залишків у відповідних

позиціях: Lys64/Thr64, Lys66, Thr177/Thr189, Leu191, Lys181/Lys193/Lys197, Ile216/Ile228, Lys145, Arg294, Lys298/Lys311.

Підсумовуючи протеїн-лігандові взаємодії в ортостеричних центрах пуринорецепторів P2X, можна виділити такі пункти:

1. Ортостеричний центр рецептора P2X3 містить амінокислотні залишки Arg281, Lys299, що стабільно електростатично взаємодіють, Asn279, що стабільно входить до водневого зв'язку, та Ser275 і Val274, чия наявність є стабільною при відмінних типах взаємодій.
2. Ортостеричний центр рецептора P2X4 містить стабільні електростатичні та водневі взаємодії амінокислотних залишків Ala292, Asn296, Arg298, Lys316, присутність Arg143 також є характерною, але відмінною за типом взаємодії залежно від азотистої основи.
3. Ортостеричний центр рецептора P2X7 містить незначну кількість амінокислотних залишків з однаковими типами взаємодій, електростатичні, водневі та π -алкільні взаємодії з Lys66, водневі - з Thr177/Thr189, електростатичні - з Lys181/Lys193, π -алкільні - з Ile216/228, та значну кількість вандерваальсових взаємодій з конкурентним антагоністом.

Таким чином, нами було виявлено амінокислотний склад ортостеричних центрів пуринорецепторів, що надалі може бути використаним для рецептор-орієнтованого драг дизайну, перспективного методу пошуку фармакологічних інструментів.

3.2. Дослідження участі активації пуринорецепторів у функціонуванні гладеньких м'язів шлунку щурів

Інгібіторна нейротрансмітерна складова ентеричної нервової системи у шлунково-кишковому тракті опосередковується оксидом азоту (NO) та агоністами пуринорецепторів (перш за все, АТФ, а також ADP, NAD⁺, ADP-рибозою, аденозином та диаденозиновими поліфосфатами). Оксид азоту спричиняє розвиток повільного компонента так званого неадренергічного нехолінергічного гальмування (nonadrenergic noncholinergic, NANC), тоді як

АТФ – швидкий компонент NANC, що опосередковується проведенням сигналу через активацію пуринорецепторів АТР.

Відомо, що АТФ є співнейромедіатором, який, який вивільняється з ентеричних нейронів разом з іншими нейромедіаторами (зокрема, норадреналіном, вазоінтестинальним пептидом та глутаматом) [67]. Також відомо [68, 69], що у міоцитах антрального відділу шлунку і сліпої кишки експресуються P2Y₁. Ймовірно, що саме вони опосередковують значну частину швидкого компоненту NANC [70]. Ці рецептори експресуються в міоцитах, тому ефект дії пуринів лише частково визначається реакцією на агоністи пейсмеркерних клітин Кахаля (ICC); хоча порушення експресії ICC призводить до втрати пуринергічної нейротрансмісії в гладеньком'язовій тканині кишечника [70]. Загалом, пуринергічне гальмування через P2Y₁-пуринорецептори реалізується за каскадом P2Y₁/Gαq/PLC/IP₃/Ca²⁺ і надалі через відкривання Ca²⁺-активованих K⁺-каналів малої провідності (каналів K_{Ca2.3}) [69, 71].

Інша суттєва складова пуринергічної трансмісії у вісцеральних гладеньких м'язах реалізується через іонотропні пуринорецептори [72]. Так, у міоцитах шлунку експресуються P2X₄-пуринорецептори [73]. Доведено, що у гладеньком'язовій тканині стінок судин і сечового міхура домінантним типом пуринорецепторів є іонотропні P2X₁-рецептори, які обумовлюють скорочувальну реакцію [74, 75, 76]; цікаво, що у випадку патології гіперчутливого сечового міхура експресія цих каналів суттєво зростає [77]. У механосернорингу ступеню розтягу порожнистих вісцеральних органів (стінок кишечника і сечового міхура) ключову роль відіграють P2X₃-пуринорецептори, які експресуються аферентних нейронах і ендотелії [78, 79].

У експерименті *in vitro* нами було досліджено ефект аплікування екзогенного АТФ на багатоклітинні препарати кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів. Оскільки АТФ фактично є релаксантом, його ефект вивчали за умови преконстрикції м'язових препаратів – на

тонічному компоненті K^+ -індукованого (80 мМ) скорочення. Зареєстроване АТФ-індуковане розслаблення (див. Рис.2.5) аналізували методом механокінетичного аналізу Костеріна-Бурдиги з розрахунком нормованої максимальної швидкості фази розслаблення [80]. Встановлено, що АТФ-ергічна релаксація м'язів антрального відділу шлунку характеризується нормованою максимальною швидкістю $0,69 \pm 0,03 \text{ хв}^{-1}$ ($n=7$).

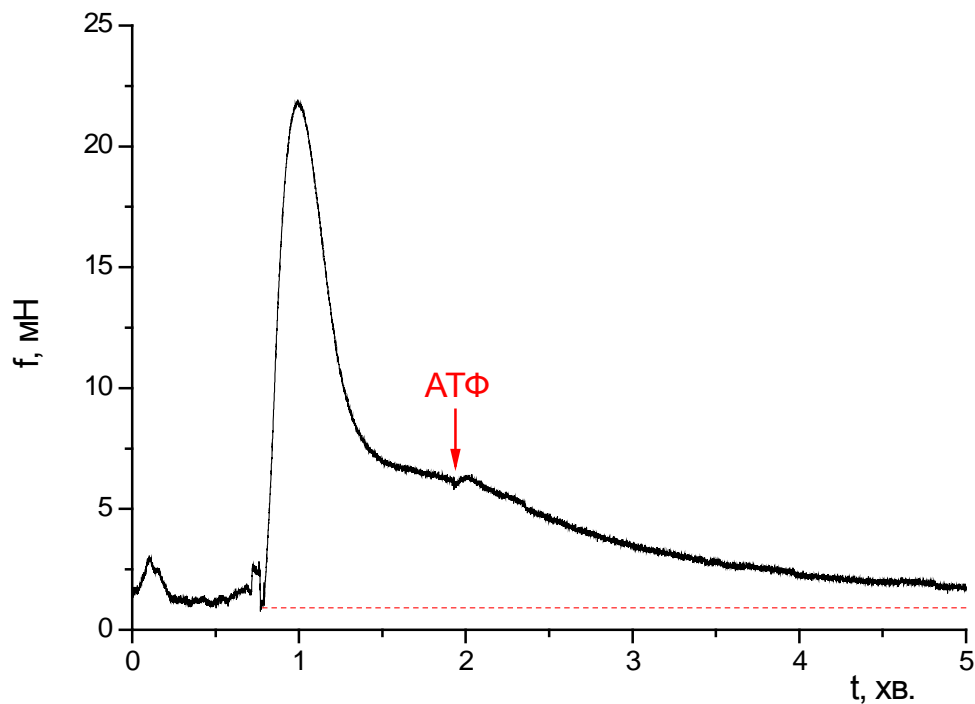


Рис.2.5. Розслаблення кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку щурів, індуковане аплікуванням аденозинтрифосфорної кислоти АТФ (10^{-5} M) на тонічній складовій скорочення, викликаному гіперкалієвим розчином (80 мМ) кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку:
Наведено типову механограму.

Отже, гладеньком'язові препарати антрального відділу шлунку щурів є зручною моделлю для подальшого вивчення фармакологічних ефекторів (агоністів і антагоністів) пуринорецепторів та процесів АТФ-індукованого гальмування-розслаблення кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку.

3.5. Планування досліджень *in silico* та *in vitro* фармакологічних властивостей сполук-агоністів і антагоністів пуринорецепторів

У рамках продовження досліджень фармакологічних властивостей пуринорецепторів, їх ролі у функціонуванні окремих гладеньких м'язів, а також розробці і дослідженні властивостей сполук-селективних агоністів і антагоністів, нами розроблено наступну схему проведення подальших досліджень *in silico* та *in vitro*:

I. Експерименти *in silico* передбачається здійснювати за алгоритмом:

1. Реконструювати тримерний комплекс пуринорецепторів та їх функціональний цикл в мембрані.
2. Перевірити гіпотези про необхідність 3 молекул агоніста для активації рецептора.
3. Реконструювати ортостеричні центри людських та щурячих пуринорецепторів, провести порівняльний аналіз.
4. Дослідити виявлені ортостеричні центри при взаємодіях з АТФ-подібними агоністами та відомими конкурентними антагоністами, наприклад, ГНФ-АТФ;
5. Сформулювати параметри для фармакофорного аналізу;
6. Провести фармакофорне моделювання;
7. Відбір сполук за фармакофорними ознаками, віртуальний скринінг лігандів.

II. Експерименти *in vitro* передбачається здійснювати із використанням тканин гладеньких м'язів: *antrum*, сечового міхура (зі збереженням і видаленням уротелієм) та міометрія щурів (у тканині цих м'язів пуринорецептори відіграють ключову роль у регуляції збудливості):

1. Здійснити реєстрацію скорочувальної активності в умовах тривалої попередньої інкубації (1 мкМ, упродовж 30 хв) з агоністами окремих типів пуринорецепторів (α, β -MeATP для P2X і УТФ для P2Y) для вибіркової інактивації десенситизацією одного з типів рецепторів та вивченням

фармакологічних властивостей іншого (недесенситизованого) типу пуринорецепторів.

2. Дослідити скорочувальну активність, індуковану відносно селективних агоністів різних типів пуринорецепторів (у концентраціях 10 нМ і 10 мкМ):

2.1. α, β -MeATP (неселективного агоніста P2X-пуринорецепторів);

2.2. β, γ -MeATP (селективного агоніста P2X₁- та P2X₃-пуринорецепторів);

2.3. УДФ (неселективного агоніста P2Y-пуринорецепторів).

3. Дослідити скорочувальну активність, індуковану α, β -MeATP, β, γ -MeATP та УТФ (у концентраціях 10 нМ і 10 мкМ) за дії тестованих сполук з передбачених дослідями *in silico* активністю агоністів і антагоністів.

4. Дослідити залежності “концентрація агоністу-ефект” (10^{-10} — 10^{-4} М) для агоністів АТФ, УТФ, α, β -MeATP, β, γ -MeATP та 2-метилтіо-АТФ:

4.1. в інтактному контролі;

4.2. на тлі дії ефекторів, які здатні інактивувати проведення сигналу через P2Y-рецептори (блокатор фосфоліпази С U-73122, 1 мкМ; номінально безкальцієвий розчин Кребса з 2 мМ хелатора іонів Ca²⁺ ЕГТА); на тлі антагоністів аденозинових рецепторів (підтипу A₁ DPСРХ, підтипу A₂ CGS-15943);

4.3. за дії тестованих сполук з передбачених дослідями *in silico* активністю агоністів і антагоністів, на тлі дії ефекторів, які здатні інактивувати проведення сигналу через P2Y-рецептори (блокатор фосфоліпази С U-73122, 1 мкМ; номінально безкальцієвий розчин Кребса з 2 мМ хелатора іонів Ca²⁺ ЕГТА); на тлі антагоністів аденозинових рецепторів (підтипу A₁ DPСРХ, підтипу A₂ CGS-15943).

ВИСНОВКИ

Проведені нами дослідження *in silico* виявили амінокислотний склад ортостеричних центрів пуринорецепторів, що надалі може бути використаним для рецептор-орієнтованого драг дизайну:

1. Ортостеричний центр рецептора P2X3 містить амінокислотні залишки Arg281, Lys299, що стабільно електростатично взаємодіють, Asn279, що стабільно входить до водневого зв'язку, та Ser275 і Val274, чия наявність є стабільною при відмінних типах взаємодій.
2. Ортостеричний центр рецептора P2X4 містить стабільні електростатичні та водневі взаємодії амінокислотних залишків Ala292, Asn296, Arg298, Lys316, присутність Arg143 також є характерною, але відмінною за типом взаємодії залежно від азотистої основи.
3. Ортостеричний центр рецептора P2X7 містить незначну кількість амінокислотних залишків з однаковими типами взаємодій, електростатичні, водневі та π -алкільні взаємодії з Lys66, водневі - з Thr177/Thr189, електростатичні - з Lys181/Lys193, π -алкільні - з Pe216/228, та значну кількість вандерваальсових взаємодій з конкурентним антагоністом.

Дослідження *in vitro* підтвердили, що гладеньком'язові препарати антрального відділу шлунку щурів є зручною моделлю для подальшого вивчення фармакологічних ефекторів (агоністів і антагоністів)

пуринорецепторів та процесів АТФ-індукованого гальмування-розслаблення кільцевих гладеньких м'язів антрального відділу шлунку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Alves LA, da Silva JH, Ferreira DN, Fidalgo-Neto AA, Teixeira PC, de Souza CA, Caffarena ER, de Freitas MS. Structural and molecular modeling features of P2X receptors. *Int J Mol Sci.* 2014 Mar 14;15(3):4531-49.]
2. Kasuya, G., Yamaura, T., Ma, XB. et al. Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel. *Nat Commun* **8**, 876 (2017)
3. Mansoor SE, Lü W, Oosterheert W, Shekhar M, Tajkhorshid E, Gouaux E. X-ray structures define human P2X(3) receptor gating cycle and antagonist action. *Nature.* 2016 Oct 6;538(7623):66-71.
4. Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E. 2009. Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. *Nature* 460:592–98
5. Hattori M, Gouaux E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature.* 2012;485(7397):207-212. doi:10.1038/nature11010
6. Khakh, B.S.; North, R.A. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* 2012, 76, 51–69. 31. North, R.A.; Surprenant, A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000, 40, 563–580.

7. Fryatt AG, Dayl S, Cullis PM, Schmid R, Evans RJ. 2016. Mechanistic insights from resolving liganddependent kinetics of conformational changes at ATP-gated P2X1R ion channels. *Sci. Rep.* 6:32918
8. Schmid R, Evans RJ. ATP-Gated P2X Receptor Channels: Molecular Insights into Functional Roles. *Annu Rev Physiol.* 2019 Feb 10;81:43-62.
9. Koshimizu T, Tomić M, Koshimizu M, Stojilkovic SS. Identification of amino acid residues contributing to desensitization of the P2X2 receptor channel. *J Biol Chem.* 1998 May 22;273(21):12853-7.
10. Smith FM, Humphrey PP, Murrell-Lagnado RD. Identification of amino acids within the P2X2 receptor C-terminus that regulate desensitization. *J Physiol.* 1999;520 Pt 1(Pt 1):91-99. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.00091.x
11. Zemkova H, He ML, Koshimizu TA, Stojilkovic SS. Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P2X receptors. *J Neurosci.* 2004;24(31):6968-6978. doi:10.1523/JNEUROSCI.1471-04.2004\
12. Cao L, Young MT, Broomhead HE, Fountain SJ, North RA. 2007. Thr339-to-serine substitution in rat P2X2 receptor second transmembrane domain causes constitutive opening and indicates a gating role for Lys308. *J. Neurosci.* 27:12916–23
13. Cao L, Broomhead HE, Young MT, North RA. 2009. Polar residues in the second transmembrane domain of the rat P2X2 receptor that affect spontaneous gating, unitary conductance, and rectification. *J. Neurosci.* 29:14257–64
14. Jiang R, Taly A, Lemoine D, Martz A, Cunrath O, Grutter T. 2012. Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels. *EMBO J.* 31:2134–43
15. Schmid R, Evans RJ. ATP-Gated P2X Receptor Channels: Molecular Insights into Functional Roles. *Annu Rev Physiol.* 2019 Feb 10;81:43-62.
16. Wang J, Wang Y, Cui WW, Huang Y, Yang Y, Liu Y, Zhao WS, Cheng XY, Sun WS, Cao P, Zhu MX, Wang R, Hattori M, Yu Y. Druggable

- negative allosteric site of P2X3 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 May 8;115(19):4939-4944. doi: 10.1073/pnas.1800907115. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29674445; PMCID: PMC5948998.
17. Roberts, J.A.; Evans, R.J. ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 9043–9055
18. Lalo U, Roberts JA, Evans RJ. 2011. Identification of human P2X1 receptor-interacting proteins reveals a role of the cytoskeleton in receptor regulation. *J. Biol. Chem.* 286:30591–99
19. Lalo U, Jones S, Roberts JA, Mahaut-Smith MP, Evans RJ. 2012. Heat shock protein 90 inhibitors reduce trafficking of ATP-gated P2X1 receptors and human platelet responsiveness. *J. Biol. Chem.* 287:32747–54
20. Roberts, J.A.; Vial, C.; Digby, H.R.; Agboh, K.C.; Wen, H.; Atterbury-Thomas, A.; Evans, R.J. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 2006, 452, 486–500.
21. Virginio, C.; North, R.A.; Surprenant, A. Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones. *J. Physiol.* 1998, 510, 27–35.
22. Chaumont S, Compan V, Toulme E, Richler E, Housley GD, et al. 2008. Regulation of P2X2 receptors by the neuronal calcium sensor VILIP1. *Sci. Signal.* 1:ra8
23. Coddou C, Sandoval R, Castro P, Lazcano P, Hevia MJ, et al. 2017. Cyclin-dependent kinase 5 modulates the P2X2a receptor channel gating through phosphorylation of C-terminal threonine 372. *Pain* 158:2155–68
24. Jiang, L.H.; Rassendren, F.; Surprenant, A.; North, R.A. Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 34190–34196
25. Cockayne, D.A.; Dunn, P.M.; Zhong, Y.; Rong, W.; Hamilton, S.G.; Knight, G.E.; Ruan, H.Z.; Ma, B.; Yip, P.; Nunn, P.; et al. P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor

- subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *J. Physiol.* 2005, 567, 621–639
26. Bodnar, M.; Wang, H.; Riedel, T.; Hintze, S.; Kato, E.; Fallah, G.; Groger-Arndt, H.; Giniatullin, R.; Grohmann, M.; Hausmann, R.; et al. Amino acid residues constituting the agonist binding site of the human P2X3 receptor. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 2739–2749.
27. Gao XF, Feng JF, Wang W, Xiang ZH, Liu XJ, et al. 2015. Pirt reduces bladder overactivity by inhibiting purinergic receptor P2X3. *Nat. Commun.* 6:7650
28. Petrenko, N.; Khafizov, K.; Tvrdonova, V.; Skorinkin, A.; Giniatullin, R. Role of the ectodomain serine 275 in shaping the binding pocket of the ATP-gated P2X3 receptor. *Biochemistry* 2011, 50, 8427–8436.
29. Baker, N.A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M.J.; McCammon, J.A. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 10037–10041.
30. Bobanovic LK, Royle SJ, Murrell-Lagnado RD. 2002. P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J. Neurosci.* 22:4814–24
31. Royle SJ, Qureshi OS, Bobanovic LK, Evans PR, Owen DJ, Murrell-Lagnado RD. 2005. Non-canonical YXXG ϕ endocytic motifs: recognition by AP2 and preferential utilization in P2X4 receptors. *J. Cell Sci.* 118:3073–80
32. Lalo, U.; Pankratov, Y.; Wichert, S.P.; Rossner, M.J.; North, R.A.; Kirchhoff, F.; Verkhratsky, A. P2X1 and P2X5 subunits form the functional P2X receptor in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 2008, 28, 5473–5480
33. Compan, V.; Ulmann, L.; Stelmashenko, O.; Chemin, J.; Chaumont, S.; Rassendren, F. P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *J. Neurosci.* 2012, 32, 4284–4296.
34. King, B.F.; Townsend-Nicholson, A.; Wildman, S.S.; Thomas, T.; Spyer, K.M.; Burnstock, G. Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 2000, 20, 4871–4877.

35. Le, K.T.; Babinski, K.; Seguela, P. Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J. Neurosci.* 1998, 18, 7152–7159.
36. Costa-Junior, H.M.; Sarmiento Vieira, F.; Coutinho-Silva, R. C terminus of the P2X7 receptor: Treasure hunting. *Purinergic Signal.* 2011, 7, 7–19
37. Gu BJ, Rathsam C, Stokes L, McGeachie AB, Wiley JS. 2009. Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X7 complex: this dissociation regulates P2X7 pore formation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297:C430–39
38. Lorden G, Sanjuán-García I, de Pablo N, Meana C, Alvarez-Miguel I, et al. 2017. Lipin-2 regulates NLRP3 inflammasome by affecting P2X7 receptor activation. *J. Exp. Med.* 214:511–28
39. Ousingsawat J, Wanitchakool P, Kmit A, Romao AM, Jantarajit W, et al. 2015. Anoctamin 6 mediates effects essential for innate immunity downstream of P2X7 receptors in macrophages. *Nat. Commun.* 6:6245
40. Murrell-Lagnado RD. 2017. Regulation of P2X purinergic receptor signaling by cholesterol. *Curr. Top. Membr.* 80:211–32
41. Robinson LE, Shridar M, Smith P, Murrell-Lagnado RD. 2014. Plasma membrane cholesterol as a regulator of human and rodent P2X7 receptor activation and sensitization. *J. Biol. Chem.* 289:31983–94
42. Karasawa A, Michalski K, Mikhelzon P, Kawate T. 2017. The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition. *eLife* 6:e31186
43. Leduc-Pessah H, Weilinger NL, Fan CY, Burma NE, Thompson RJ, Trang T. 2017. Site-specific regulation of P2X7 receptor function in microglia gates morphine analgesic tolerance. *J. Neurosci.* 37:10154–72
44. Ralevic V, Dunn WR. 2015. Purinergic transmission in blood vessels. *Auton. Neurosci.* 191:48–66
45. Stokes L, Scurrah K, Ellis JA, Cromer BA, Skarratt KK, et al. 2011. A loss-of-function polymorphism in the human P2X4 receptor is associated with increased pulse pressure. *Hypertension* 58:1086–92

46. Piskuric NA, Nurse CA. 2013. Expanding role of ATP as a versatile messenger at carotid and aortic body chemoreceptors. *J. Physiol.* 591:415–22
47. Pijacka W, Moraes DJ, Ratcliffe LE, Nightingale AK, Hart EC, et al. 2016. Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nat. Med.* 22:1151–59
48. Stachon P, Heidenreich A, Merz J, Hilgendorf I, Wolf D, et al. 2017. P2X7 deficiency blocks lesional inflammasome activity and ameliorates atherosclerosis in mice. *Circulation* 135:2524–33
49. Sim JA, Park CK, Oh SB, Evans RJ, North RA. 2007. P2X1 and P2X4 receptor currents in mouse macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 152:1283–90
50. Csoka B, Nemeth ZH, Toro G, Idzko M, Zech A, et al. 2015. Extracellular ATP protects against sepsis through macrophage P2X7 purinergic receptors by enhancing intracellular bacterial killing. *FASEB J.* 29:3626–37
51. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. 2017. The P2X7 receptor in infection and inflammation. *Immunity* 47:15–31
52. Amores-Iniesta J, Barbera-Cremades M, Martínez CM, Pons JA, Revilla-Nuin B, et al. 2017. Extracellular ATP activates the NLRP3 inflammasome and is an early danger signal of skin allograft rejection. *Cell Rep.* 21:3414–26
53. Vergani A, Tezza S, Fotino C, Visner G, Pileggi A, et al. 2014. The purinergic system in allotransplantation. *Am. J. Transplant.* 14:507–14
54. Oury C, Lecut C, Hego A, Wera O, Delierneux C. 2015. Purinergic control of inflammation and thrombosis: role of P2X1 receptors. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13:106–10
55. Darbousset R, Delierneux C, Mezouar S, Hego A, Lecut C, et al. 2014. P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. *Blood* 124:2575–85

56. Nohara LL, Stanwood SR, Omilusik KD, Jefferies WA. 2015. Tweeters, woofers and horns: the complex orchestration of calcium currents in T lymphocytes. *Front. Immunol.* 6:234
57. Abramowski P, Ogradowczyk C, Martin R, Pongs O. 2014. A truncation variant of the cation channel P2RX5 is upregulated during T cell activation. *PLOS ONE* 9:e104692
58. Wang CM, Ploia C, Anselmi F, Sarukhan A, Viola A. 2014. Adenosine triphosphate acts as a paracrine signaling molecule to reduce the motility of T cells. *EMBO J.* 33:1354–64
59. Di Virgilio F, Adinolfi E. 2017. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* 36:293–303;
60. Burnstock G, Di Virgilio F. 2013. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal.* 9:491–540
61. Rassendren F, Audinat E. 2016. Purinergic signaling in epilepsy. *J. Neurosci. Res.* 94:781–93
62. King BF. 2015. Purinergic signalling in the enteric nervous system (an overview of current perspectives). *Auton. Neurosci.* 191:141–47
63. Saez-Orellana F, Godoy PA, Silva-Grecchi T, Barra KM, Fuentealba J. 2015. Modulation of the neuronal network activity by P2X receptors and their involvement in neurological disorders. *Pharmacol. Res.* 101:109–15
64. Sperlagh B, Illes P. 2014. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 35:537–47
65. Bhattacharya A. 2018. Recent advances in CNS P2X7 physiology and pharmacology: focus on neuropsychiatric disorders. *Front. Pharmacol.* 9:30
66. An Q, Yue G, Yang X, Lou J, Shan W, Ding J, Jin Z, Hu Y, Du Q, Liao Q, Xie R, Xu J. Pathophysiological Role of Purinergic P2X Receptors in Digestive System Diseases. *Front Physiol.* 2021 Dec 24;12:781069.
67. Burnstock G. Purinergic signalling in the gastrointestinal tract and related organs in health and disease // *Purinergic Signalling* (2014) 10:3–50.

68. Goyal RK, Sullivan MP, Chaudhury A. Progress in understanding of inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the gut. *Neurogastroenterol Motil.* 2013 Mar;25(3):203-7. doi: 10.1111/nmo.12090.
69. Jiménez M, Clavé P, Accarino A, Gallego D. Purinergic neuromuscular transmission in the gastrointestinal tract; functional basis for future clinical and pharmacological studies. *Br J Pharmacol.* 2014 Oct;171(19):4360-75. doi: 10.1111/bph.12802
70. Mañé N, Gil V, Martínez-Cutillas M, Clavé P, Gallego D, Jiménez M. Differential functional role of purinergic and nitrergic inhibitory cotransmitters in human colonic relaxation. *Acta Physiol (Oxf).* 2014 Dec;212(4):293-305. doi: 10.1111/apha.12408.
71. Gallego D, Mañé N, Gil V, Martínez-Cutillas M, Jiménez M. Mechanisms responsible for neuromuscular relaxation in the gastrointestinal tract. *Rev Esp Enferm Dig.* 2016 Nov;108(11):721-731. doi: 10.17235/reed.2016.4058/2015
72. Murthy KS, Makhoul GM. Coexpression of ligand-gated P2X and G protein-coupled P2Y receptors in smooth muscle. Preferential activation of P2Y receptors coupled to phospholipase C (PLC)-beta1 via Galphaq/11 and to PLC-beta3 via Gbetagamma3. *J Biol Chem.* 1998 Feb 20;273(8):4695-704. doi: 10.1074/jbc.273.8.4695.
73. Dhulipala PD, Wang YX, Kotlikoff MI. The human P2X4 receptor gene is alternatively spliced. *Gene.* 1998 Jan 30;207(2):259-66. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00647-1.
74. Vial C, Evans RJ. P2X receptor expression in mouse urinary bladder and the requirement of P2X(1) receptors for functional P2X receptor responses in the mouse urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2000;131:1489-1495.
75. Vial C, Evans RJ. Disruption of lipid rafts inhibits P2X1 receptor-mediated currents and arterial vasoconstriction. *J Biol Chem.* 2005;280:30705-30711.

76. O'Reilly BA, Kosaka AH, Chang TK, Ford AP, Popert R, Rymer JM, et al. A quantitative analysis of purinoceptor expression in human fetal and adult bladders. *J Urol*. 2001;165:1730–1734.
77. O'Reilly BA, Kosaka AH, Knight GF, Chang TK, Ford AP, Rymer JM, et al. P2X receptors and their role in female idiopathic detrusor instability. *J Urol*. 2002;167:157–164.
78. Vlaskovska M, Kasakov L, Rong W, Bodin P, Bardini M, Cockayne DA, et al. P2X3 knock-out mice reveal a major sensory role for urothelially released ATP. *J Neurosci*. 2001;21:5670–5677.
79. Norenberg W, Illes P. Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000;362:324–339.
80. Burdyga Th.V., Kosterin S.A. Kinetic analysis of smooth muscle relaxation. *Gen Physiol Biophys*, 1991; 10(6): 589–598.

