

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця

На правах рукопису

КЕРЦЕР СЕМЕН ЛЕОНІДОВИЧ

УДК 612.82:[615.217+541.6]

НЕЙРОФІЗІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ  
ТА КРИСТАЛІЧНА БУДОВА РЕЧОВИН

03.00.02.- біофізика

Автореферат  
дисертації на здобуття вченого ступеню  
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:  
доктор біол. наук, проф. К.В.БАЄВ

Київ - 1992

Робота виконана у відділі фізіології спинного мозку  
Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця АН України.

Науковий керівник - доктор біологічних наук,  
проф.Баєв К.В.

Офіційні опоненти - кандидат біологічних наук  
Обухов О.Г.  
доктор фізико-математичних наук  
Тесленко В.І.

Ведуча організація - Київський державний університет  
ім.Т.Г.Шевченка

Захист відбудеться "27 лютого" 1993р. в 14 годин на  
засіданні спеціалізованої ради Д 016.15.01 при Інституті  
фізіології ім.О.О.Богомольця АН України за адресою:  
252601, Київ, вул.Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці  
інституту.

Автореферат разіслано "23 лютого" 1992р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради  
доктор біологічних наук

З.О.Сорокіна-Маріна

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00825620 (N)



## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність проблеми. Низкомолекулярні амінокислоти такі як гліцин, гамма-аміноасляна кислота (ГАМК),  $\beta$ -аланін, таурин відіграють важливу роль у функціонуванні центральної нервової системи. Як відомо, вони спроможні активувати амінокислотні рецептори, які керують іонними каналами встроєними в клітинні мембрани. Важливим моментом в цьому процесі є "розпізнавання" речовини рецептором. В основі "розпізнавання" закладені особливості хімічної будови речовини.

Загальноприйнятою є точка зору, згідно з якою "розпізнавання" речовини залежить від її хімічної будови та залежить від розміщення атомів у молекулі. Однак, відомо, що в деяких випадках, речовини близькі за хімічною будовою, спроможні активувати різні рецептори, і навпаки ті ж самі рецептори активуються істотно відмінними за своєю хімічною будовою речовинами. До того ж, звертає на себе увагу той факт, що для активації гліцин та ГАМК-рецепторів необхіднен зв'язок декількох молекул агоністу (Nistri et al., 1979). Очевидно, що "розпізнавання" речовини у випадку кооперативної дії залежить не тільки від хімічної будови молекули, але і від взаємного розтошування декількох молекул речовини на поверхні рецептору. Особливості такого розрозтошування молекул у наш час невідомі. Однак, можна припустити, що взаємне зближення молекул агоніста на поверхні пов'язуючого центру рецептора, їх невеликі розміри та полярність приводять до залежності взаємної орієнтації молекул на

поверхні рецептора від взаємної орієнтації молекул у кристалі агоністу.

На основі вищевикладеного, цікаво було вивчити особливості та порівняти кристалічні будови деяких агоністів амінокислотних рецепторів, і співставити підсумки цього порівняння з нейрофізіологічною дією цих агоністів. Розрахунки та порівняння кристалічних структур були проведені для гліцину, таурину,  $\beta$ -аланіну, ГАМК і мусцимолу.

Мета та задачі дослідження.

Мета роботи. Вивчити зв'язок між будовою кристалічної структури та нейрофізіологічною дією гліцину, таурину,  $\beta$ -аланіну, ГАМК та мусцимолу.

Основні задачі. 1. Розробити методи порівняння кристалічних будов.

2. Порівняти між собою кристалічні структури гліцину, таурину,  $\beta$ -аланіну, ГАМК та мусцимолу.

3. Зіставити підсумки порівняння з нейрофізіологічною дією цих речовин.

Наукова новина.

У роботі вперше показано зв'язок між біологічною дією гліцину, таурину,  $\beta$ -аланіну, ГАМК, мусцимолу та будовою кристалічної решітки цих речовин.

Висунуто припущення, що під час кооперативної дії агоніста на рецептор, взаємне розтошування молекул на поверхні рецептору залежить від їх розташування у кристалі.

Запропоновано способи кількісної оцінки подібності кристалічних

структур різних речовин.

Теоретичне та практичне значення роботи.

Теоретичне значення отриманих результатів полягає в тому, що вони дозволяють глибше зрозуміти механізми дії різних агоністів на амінокислотні рецептори. На далі розроблені методики можна використовувати для вивчення механізму дії різних речовин на інші типи рецепторів. Практичне значення роботи у тому, що вона відкриває нові можливості для пошуку досі невідомих агоністів та різних лікарських речовин із наперед заданою фізіологічною дією.

Апробація роботи. Основні положення дисертації докладались на семінарі Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця АН України, Київ, 1992р.

Структура та об'єм дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису методів розрахунків, результатів розрахунків, обміркування, висновків та списку процитованої літератури. Робота викладена на 111 сторінках машинописного тексту, ілюстрована 22 малюнками та 4 таблицями, у роботі процитовано 118 літературних джерел.

## МЕТОДИКА.

В основі оцінки подібності кристалічних структур покладено два основних принципи:

1. порівняння просторової структури кристалічних комірок.
2. порівняння лінійних відстаней між окремими атомами кристалічної структури.

Усі розрахунки виконано на персональній ЕОМ по спеціально складеним нами програмам. Мета розрахунків полягала в отриманні кількісної оцінки подібності кристалічних структур гліцину, таурину, ГАМК,  $\beta$ -аланіну, мусцимолу для подальшого зіставлення ступеню подібності цих кристалічних структур із даними нейрофізіологічної активності перерахованих вище речовин.

1. Порівняння просторової будови кристалічних комірок.

Моделювання кристалічної комірки, зводилося до задання координат вісьмох вершин паралелепіпеда у трьохмірному просторі. Очевидно, що такі координати являють собою лінійні параметри кристалічної комірки, а кути між осями координат - відповідають її кутам. Значення параметрів комірок гліцину, таурину,  $\beta$ -аланіну, ГАМК, мусцимолу відповідали приведенням у роботах /Jonsson, Kvick, 1972; Okaya, 1966; Parimola, Pant, 1962; Tomita et al., 1973/.

Пошук взаємного розташування комірок, при якому сума відстаней між їх найближчими вершинами була мінімальною, виконувався моделюванням "руху" однієї кристалічної комірки по відношенню до іншої з використанням обертання та трансляції.

Очевидно, що чим нижче отримане значення опосередкованої відстані між найближчими вузлами комірок, тим точніше ці комірки "вписуються" одна в другу. По результатам підрахунку будувалось комп'ютерне зображення розташування однієї комірки відносно іншої, що дає можливість візуального бачення проведених підрахунків.

## 2. Порівняння лінійних відстаней між окремими атомами в кристалічних структурах.

Використовувались два види підрахунку відстаней: перший - підрахунок відстаней між атомами азоту та кисню всередині комірок (внутришньокмірчані відстані), другий - відстаней між атомами сусідніх комірок (міжкомірчані відстані).

Гліцин та ГАМК використовувались як еталони. Відстані між атомами в їхніх кристалічних структурах порівнювались з відстанями між атомами в кристалічних структурах перелічених вище речовин.

Розрахунок внутришньокмірчаних відстаней між атомами

Внутришньокмірчані відстані  $S_{1-2}$  між всіма можливими комбінаціями атомів азоту та кисню в кристалічній комірці речовин

підрховувались по формулі (1).

$$S_{1-2} = \sqrt{a^2(x_1-x_2)^2 + b^2(y_1-y_2)^2 + c^2(z_1-z_2)^2 + ab(x_1-x_2)(y_1-y_2)\cos\gamma + ac(z_1-z_2)(x_1-x_2)\cos\beta + bc(z_1-z_2)(y_1-y_2)\cos\alpha} \quad (1)$$

де  $a, b, c$  - параметри кристалічної комірки речовини

$\alpha, \beta, \gamma$  - кути кристалічної комірки

$x_1, y_1, z_1$  - координати атома 1

$x_2, y_2, z_2$  - координати атома 2

Відстані підрховувались між атомами азоту та кисню, оскільки на них локалізувалися заряди.

#### Розрахунок міжкомірчаних відстаней

Міжкомірчани відстані  $U_{1-2}$  від центральної комірки 1 до комірки 2 підрховувались по формулі (2):

$$U_{1-2} = \sqrt{a^2l^2 + b^2m^2 + c^2n^2 + ablm\cos\gamma + alcn\cos\beta + bmcn\cos\alpha} \quad (2)$$

де  $l, m, n$  - координати комірки 2 відносно комірки 1 цілі значення, які змінюються в межах від -4 до 4 одиниць.

Оскільки комірка являє собою повторюючийся елемент кристалічної структури, то відстані між будь-якою парою аналогічно розташованих атомів в окремих комірках однакові, та як слідує з формули (2), не залежать від координат конкретних атомів, а дорівнюють відстаням між комірками, які в свою чергу, залежать

від параметрів комірок та їх взаємного розташування.

Наступні підрахунки при порівнянні внутрішньокмірчаних та міжкомірчаних відстаней виконувались однаково. Проводилось порівнення кожної відстані, яка мала не більше 3 нм., між атомами та комірками розглядаємих речовин з кожною відстанню розрахованою між аналогічними атомами чи комірками еталонів. Відстані вважались співпадшими, якщо модуль різниці між ними не перевищував точності порівняння, яка рівнялась 0.02 нм.

### Результати розрахунків

- 1 Результати порівняння відстаней між атомами у кристалічних структурах гліцину, таурину, ГАМК,  $\beta$ -аланіну та мусцимолу.

Результати порівняння були представлені у вигляді трьохмірних гістограм. Кожна трійка чисел (x,y,z) відкладена по відповідним осям характеризує результат порівняння пари відстаней. По осі x відкладалась середня величина порівнюваних відстаней. По осі y - модуль їх різниці, характеризуючий точність порівняння, (не більше 0.02 нм), по осі z - кількість таких порівнянь.

При модулі різниці більше ніж 0.02 нм відстані вважались не збіжними між собою та результат їх порівнення не відображався на гістограмі.

На малюнку 1а приведено гістограму відображаючу розподілення збігу внутрішньокмірчаних відстаней у кристалічній структурі

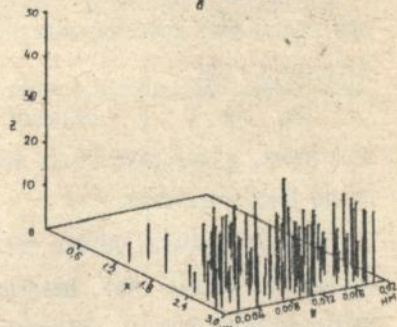
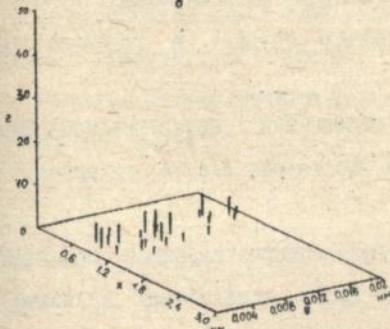
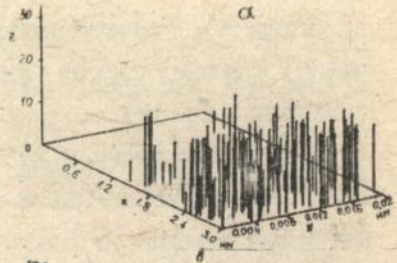
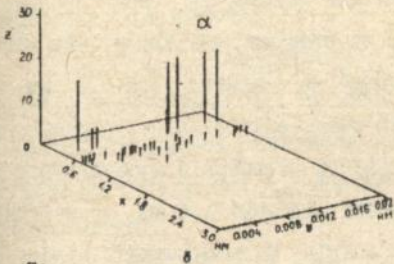
таурину та гліцину між атомами азоту і кисню. Аналогічну гістограму для таурину та ГАМК приведено на малюнку 1б. Для зручності співставлення цих гістограм їх відповідні осі виконувались у однаковому масштабі.

При порівнянні цих гістограм звертає на себе увагу, те що висота та кількість стовбчиків на гістограмі 1а значно більша ніж на гістограмі 1б. В області 0.4 нм по осі X на гістограмі 1а стовбчики мають особливо велику висоту, в той час як на гістограмі 1б вони повністю відсутні. Це можна трактувати як відсутність збігів відстаней порядку 0.4 нм. між атомами азоту та кисню в кристалічних структурах таурину та ГАМК, в той же час спостерігається значна їх кількість при порівнянні в кристалічних структурах таурину та гліцину.

Далі, порівнюючи гістограми 1а і 1б слід відмітити, що в області 0.7 нм по осі X стовбчики розташовані ближче до цієї осі на гістограмі 1а, ніж на гістограмі 1б, що можна трактувати як більш точніше збігання відстаней при порівнянні їх у структурах таурину та гліцину, ніж при аналогічному порівненні в структурах таурину та ГАМК.

Все це співвідноситься із відомими фактами дії таурину на гліцинові, але не на ГАМК-рецептори.

На малюнку 2а приведено гістограму відображаючу розподілення збігів міжкомірчаних відстаней у кристалічній структурі таурину



Мал.1а. Трьохмірна гістограма, яка відображає розподілення збігів внутрикмірчаних відстаней у кристалічних структурах таурину та глицину між атомами азоту і кисню.

Мал.1б. Трьохмірна гістограма, яка відображає розподілення збігів внутрикмірчаних відстаней у кристалічних структурах таурину та ГАМК між атомами азоту і кисню.

Мал.2а. Трьохмірна гістограма, яка відображає розподілення збігів міжкмірчаних відстаней у кристалічних структурах таурину та глицину.

Мал.2б. Трьохмірна гістограма, яка відображає розподілення збігів міжкмірчаних відстаней у кристалічних структурах таурину та ГАМК.

та гліцину. Аналогічну гістограму для таурину та ГАМК приведено на малюнку 2б. У данному випадку звертає на себе увагу наявність значної кількості збігів відстаней в області 1.6-1.7 нм на гістограмі 2а та менша кількість таких збігів на гістограмі 2б. До того ж, на гістограмі 2а більшість стовбчиків наближується до осі X, особливо це помітно в області відстані 1.6 нм, що свідчить про більшу точність та кількість збігів міжкомірчаних відстаней при порівнянні кристалічних структур таурину з гліцином, ніж таурину з ГАМК.

Це, як і у випадку порівняння внутрішньокмірчаних відстаней, підтвержує точку зору, що таурин діє на гліцинові, а не на ГАМК-рецептори.

Для кількісної оцінки гістограм використовувався приведений коефіцієнт збігів (КЗ). Введення цього коефіцієнту зв'язано з необхідністю подачі результатів підрахунку у вигляді числа, величину якого можна зіставляти із величиною аналогічно отриманого числового значення, для різних речовин. Розраховувався приведений коефіцієнт збігів  $K_{\text{пр}}$  по формулі:

$$K_{\text{пр}} = \frac{K_{19}^2 \cdot 100}{K_{99} \cdot K_{11} \cdot K_{00}} \quad (3)$$

де  $K_{19}$  - кількість збігів отримане при порівнянні кристалічних структур розглядуємої речовини та еталону.

$K_{99}$  та  $K_{11}$  - кількість збігів отримана при порівнянні кристалічних структур по відношенню до себе, відповідно еталону

та розглядуємої речовини .

$K_{об}$  - поправочний коефіцієнт, з допомогою якого враховувалися відмінності об'ємів з яких вибирались порівнювані відстані, дорівнював відношенню цих об'ємів один до одного. Для комірок рівного об'єму  $K_{об}$  дорівнює одиниці, в інших випадках  $K_{об}$  менше одиниці.

Значенню КЗ рівному 100% відповідає результат порівняння однакових кристалічних структур.

Значення КЗ пар речовин та їх нейрофізіологічну активність показано в таблиці 1.

Найменування зрівнюваних речовин	Приведений коефіцієнт збігів внутрішньокмірчаних відстаней %	Приведений коефіцієнт збігів міжкмірчаних відстаней %	Агоністична дія пари речовин на типи рецепторів
Гліцин таурин	81.4	54.9	гліцинові рецептори
ГАМК таурин	16.7	43.4	слабо диференційовані рецептори
Гліцин ГАМК	13.3	72.7	слабо диференційовані рецептори
$\beta$ -аланін таурин	88.1	41.3	гліцинові рецептори
Гліцин $\beta$ -аланін	66.0	30.9	гліцинові рецептори
ГАМК $\beta$ -аланін	57.5	18.8	слабо диференційовані рецептори
Гліцин мусцимол	-	46.0	слабо диференційовані рецептори
ГАМК мусцимол	-	64.7	ГАМК-рецептори

Таблиця 1. Значення КЗ пар речовин та їх нейрофізіологічна активність.

2. Результати порівняння просторової будови кристалічних комірок гліцину, таурину, ГАМК, мусцимолу.

Результати для усіх варіантів попарного порівняння просторової будови кристалічних комірок гліцину, таурину, ГАМК, мусцимолу зведено в таблицю 2.

Порівнювані речовини	Мінімальна опосередкована відстань між найближчими вершинами комірок, нм.
Гліцин Таурин	0.126
ГАМК Мусцимол	0.113
Гліцин Мусцимол	0.142
ГАМК Таурин	0.148
Гліцин ГАМК	0.205
Таурин Мусцимол	0.108

Таблиця 2 Результати порівняння просторової будови кристалічних комірок гліцину, таурину, ГАМК, мусцимолу.

Звертає на себе увагу те, що пари речовин гліцин - таурин, ГАМК - мусцимол та таурин - мусцимол мають найнижчі значення мінімальної опосередкованої відстані, в той час як це значення

для пар речовин гліцин - мусцимол, ГАМК - таурин та гліцин - ГАМК воно значно вище.

#### ОБМІРКУВАННЯ

В цій роботі отримано ряд фактів, які дозволяють обмірковувати зв'язок між кристалічною структурою та нейрофізіологічною активністю деяких агоністів амінокислотних рецепторів.

Найвищий приведений коефіцієнт збігів міжкомірчаних відстаней (МКЗ) було отримано при порівнянні кристалічних структур двох найбільш сповсюдженних у природі гальмівних медіаторів - гліцину та ГАМК, дорівнює 72.7%. При цьому відомо, що гліцин та ГАМК активують одні й ті ж рецепторно - каналні комплекси в нейронах спинного мозку міноги, при ще не сформированих незалежних рецепторах для цих медіаторів.

У вищих тварин мають місце незалежні рецептори, які активуються чи гліцином чи ГАМК. Дійсно, приведений коефіцієнт збігів внутрішньокірчаних відстаней (ВКЗ) для гліцину та ГАМК виявився найнижчим - 13.3%. Подібна закономірність властива для ГАМК і таурину, МКЗ для цих речовин досить великий - 43.4%, в той час як ВКЗ має низьке значення - 16.7%.

Для ГАМК і  $\beta$ -аланіну, теж активуючих слабо диференційовані рецептори, навпаки, МКЗ низький - 18.8%, а ВКС значно вищий - 57.5%.

Що стосується речовин, які одночасно діють на диференційовані рецептори, то їхні як ВКС так і МКЗ мають великі

значення. При порівнянні гліцина із таурином - 81.4% і 54.9% відповідно.

Припускається, що одним із критеріїв "розпізнавання" у цьому випадку є одночасно як внутрішньокмірчані, так і міжкомірчані відстані в структурах речовин. З цієї точки зору МКС для пар гліцин- $\beta$ -аланін (30.9%) та таурин- $\beta$ -аланін (41.3%) вищий, ніж ГАМК- $\beta$ -аланін (18.8%) (таблиця 1) добре відповідають звісному факту дії  $\beta$ -аланіну, гліцину та таурину на одні й тіж гліцинові рецептори. Крім того, ЕКС у гліцину- $\beta$ -аланіну (66.0%) теж вищий, ніж у ГАМК -  $\beta$ -аланіну (57.5%).

До того ж, незважаючи на те, що гліцин та  $\beta$ -аланін належать до різних структурних класів речовин, взаємне розташування молекул в окремих фрагментах їх структур дуже подібне. Це відповідає дії  $\beta$ -аланіну на рецептори, чутливі до гліцину.

Отримані в наших розрахунках дані по порівнянню просторової будови комірок гліцину, таурину, ГАМК, мусцимолу, шляхом "вписування" їх комірок одна в одну, цікаво співставити з нейрофізіологічною активністю цих речовин.

Виявилось, що речовини, діючи на одні й тіж амінокислотні рецептори, зокрема ГАМК та мусцимол - на ГАМК-рецептори, гліцин та таурин - на гліцинергічні, мають добре "вписувані" одна в одну кристалічні комірки. В той же час, дві амінокислоти - гліцин та ГАМК, діючи на незалежні рецептори, мають суттєво відмінні одна від одної кристалічні комірки.

З підрахунків також слідує, що комірки таурину та мусцимолу просторово дуже близькі одна до одної, що не виключає можливості

існування спільних рецепторів по відношенню до яких, обидві речовини можуть проявляти активність. З цієї точки зору цікавими є дані про те, що речовина із властивостями селективного антагоністу таурину - 6-6-амінометил-4Н- 1,2,4-бензотіазин -1,1-діоксид зменшує деполаризуючу дію як таурину, так і мусцимолу на задні корінці спинного мозку, і при цьому не впливає на дію ГАМК /Гуревич В.С., 1986/.

Можливо, що однією з умов "розпізнавання" речовини рецептором, поряд з наявністю у молекулі речовини активних фрагментів, є залежна від просторової будови комірок періодичність кристалічної решітки цієї речовини.

#### ВИСНОВКИ. -

1. При порівнянні кристалічних комірок гліцину та таурину - діючих на диференційований гліциновий рецептор отримано велику кількість збігів внутрішньокмірчаних та міжкмірчаних відстаней між атомами азоту та кисню.

2. Показано, що лінійні параметри кристалічних комірок гліцину та таурину, діючих на гліцинові рецептори, а також ГАМК та мусцимолу, діючих на ГАМК-рецептори, більш близькі між собою, ніж у гліцину та ГАМК, діючих на різні типи рецепторів.

3. Відмічено, що для гліцину та ГАМК, таурину та ГАМК,  $\beta$ -аланіну та ГАМК - пар речовин спільно діючих на слабо диференційовані

рецептори, міжкомірчані, або внутрішньокмірчані відстані збігаються рідше, ніж у речовин, діючих на диференційовані рецептори - гліцину та таурину, гліцина та  $\beta$ -аланіну.

4. Співставленням кристалічної структури двох відомих агоністів гліцинових рецепторів - гліцину та  $\beta$ -аланіну показано, що незважаючи на належність цих речовин до різних структурних класів виявляється значна подібність взаємного розташування їх молекул в кристалічних фрагментах.

Список основних робіт по темі дисертації.

1. Керцер С.Л., Баєв К.В. Зв'язок між будовою кристалічної решітки та біологічною дією деяких агоністів амінокислотних рецепторів // Нейрофізіологія.- 1992.- 24, N1.- С.51-57.
2. Керцер С.Л. Просторова подібність кристалічних комірок деяких агоністів амінокислотних рецепторів та біологічна дія цих речовин // Нейрофізіологія.- 1992.- 24, N4, с.498-500

Подп. к печ. 8. 12. 92      Формат 80-24/16 Бумага Тшч №2  
 Печ. офс. Усл. печ. л. 0,93      Уч.-изд. л. 0,66      Тираж 100.  
 Зак. 2-3710

Киевская книжная типография научной книги. Киев, Решина, 4.

АНБ ім. В. Стуса  
 АНУР

AB 26.394

**AB 26.394**