

Badanie ruchów wewnątrzcząsteczkowych w polikrystalicznych neurotransmiterach

T. Grabias, N. Piślewski

Instytut Fizyki Molekularnej PAN, ul. Smoluchowskiego 17, 60-179 Poznań

W ostatnich latach obserwuje się coraz szersze wykorzystywanie metod jądrowego rezonansu magnetycznego do badania układów biologicznych. Celem tej pracy było zbadanie dynamiki wewnątrzcząsteczkowej protonów trzech, wybranych, polikrystalicznych neurotransmiterów czyli substancji chemicznych odgrywających bardzo ważną rolę w transporcie informacji w układzie nerwowym człowieka. Są to związki chemiczne pośredniczące w przekazaniu informacji między dwoma komórkami nerwowymi. Do badań wybrano: chlorowodorek dopaminy $[(\text{OH})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2]\text{Cl}$, noradrenaliny $[(\text{OH})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CHOHCH}_2\text{NH}_2\text{CH}_3]\text{Cl}$ oraz adrenaliny $[(\text{OH})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CHOHCH}_2\text{NH}_2\text{CH}_3]\text{Cl}$

Dynamikę wewnątrzcząsteczkową protonów w odpowiednich chlorowodorkach neurotransmiterów wyznaczono badając czas relaksacji spin-sieć protonów w funkcji temperatury. Wszystkie pomiary prezentowane w tej pracy wykonano za pomocą spektrometru impulsowego SXP 4/100 Bruker, pracującego na częstotliwości 90 i 55,2 MHz. Czas relaksacji spin-sieć protonów mierzono w polikrystalicznych próbkach chlorowodorku dopaminy, noradrenaliny i adrenaliny zakupionych w Sigma Chemical Co. Badane substancje były umieszczone w zatopionych pod próżnią (10^{-1} Pa) probówkach szklanych. Czas relaksacji T_1 był mierzony dwiema metodami: metodą odwrócenia magnetyzacji oraz metodą nasyceniową dla $T_1 > 1$ s.

Na Rys.1 przedstawiono zależność czasu relaksacji spin-sieć w funkcji temperatury dla chlorowodoru dopaminy (kółka), dla chlorowodoru adrenaliny (kwadraty) oraz chlorowodoru noradrenaliny (gwiazdki 55,2MHz i romby 90MHz).

Chlorowodorek dopaminy i chlorowodorek adrenaliny

Obserwowane minima w przebiegu czasu relaksacji T_1 w obu badanych substancjach są wynikiem rotacji grupy trójprotonowej (amonowej dla chlorowodoru dopaminy oraz metylowej dla chlorowodoru adrenaliny) wokół trójrotacyjnej osi symetrii [1]. Czas relaksacji T_1 w pobliżu minimum wyraża się wzorem [2,3]:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{n}{N} \frac{9}{20} \frac{\hbar^2 \gamma^4}{r^6} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right), \quad (1)$$

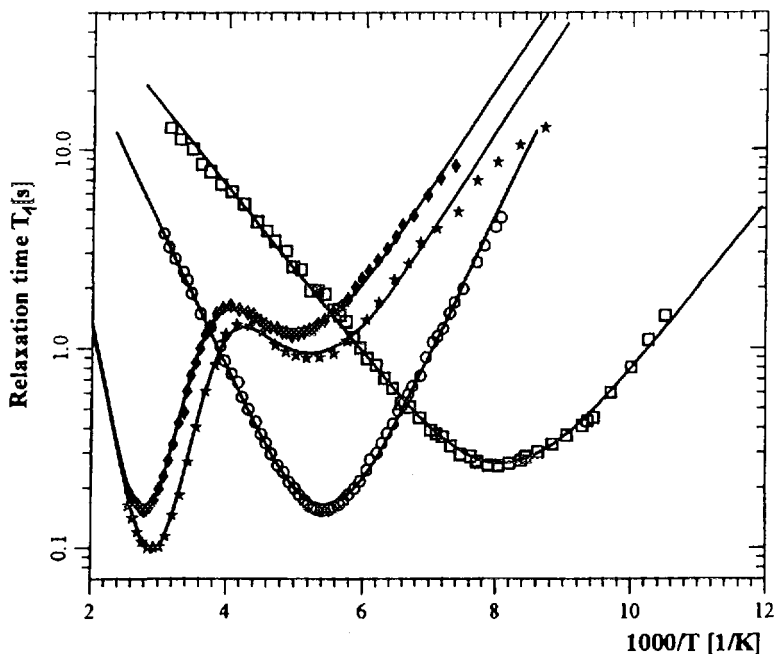
gdzie N jest liczbą protonów w komórce elementarnej natomiast n jest liczbą atomów wodoru grup trójprotonowych. Dla chlorowodoru dopaminy n/N wynosi 0,25 [4], dla chlorowodoru adrenaliny 0,21 [5]. Linie ciągłe na Rys.1 przedstawiają wynik dopasowania numerycznego teoretycznie obliczonych wartości czasu relaksacji na podstawie wzoru (1) do punktów eksperymentalnych przy założeniu, że rotacja grup NH_2 i CH_3 jest procesem aktywowanym termicznie, tzn. że zależność temperaturowa czasu korelacji τ_c jest opisana prawem Arrheniusa:

$$\tau_c = \tau_0 \exp\left(\frac{E_{\text{akt}}}{RT}\right), \quad (2)$$

gdzie R jest stałą gazową, T - temperaturą, E_{akt} - energią aktywacji a τ_0 jest czasem korelacji w nieskończenie wysokich temperaturach.

Wartości parametrów charakteryzujących ruch grup amonowych i metylowych przedstawia Tabela 1.





Rys. 1. Zależność czasu relaksacji spin-sieć od temperatury dla chlorowodoru dopaminy (kółka), dla chlorowodoru adrenaliny (kwadraty) oraz chlorowodoru noradrenaliny (gwiazdki 55,2MHz i romby 90MHz). Linia ciągła przedstawia wynik dopasowania punktów doświadczalnych zgodnie z proponowaną teorią.

	NH ₂	CH ₃
E _{akt} [kJ/mol]	13,65	8,08
τ ₀ [s]	1,49 * 10 ⁻¹³	4,33 * 10 ⁻¹³
r _{H-H} [nm]	0,171	0,181

Tabela 1. Parametry ruchu grupy amonowej chlorowodoru dopaminy i metylowej chlorowodoru adrenaliny.

Chlorowodorek noradrenaliny

Przebieg zależności czasu relaksacji spin-sieć od temperatury dla chlorowodoru noradrenaliny wykazuje dwa symetryczne minima. Minimum wysokotemperaturowe można związać z rotacją grup amonowych wokół trójrotnej osi symetrii. Ponieważ molekule chlorowodoru dopaminy i chlorowodoru noradrenaliny różnią się od siebie tylko tym, że chlorowodorek noradrenaliny posiada jedną grupę hydroksylową więcej można upatrywać w ruchu dodatkowego protonu tej grupy mechanizmu powodującego powstanie niskotemperaturowego minimum w przebiegu czasu relaksacji spin-sieć. Z danych krystalograficznych wynika, że w kryształach chlorowodoru noradrenaliny tworzy się silne wiązanie wodorowe O-H...O. Ruch protonu w takim mostku wodorowym pomiędzy dwoma nierównoważnymi minimami potencjału może być odpowiedzialny za obserwowane minimum. Przy takim założeniu całkowity czas relaksacji w tym zakresie temperatur jest opisywany następującym wzorem [3,6,7]:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{12}{48} \left(\frac{1}{T_1} \right)^{NH_1} + \frac{4}{48} \left(\frac{1}{T_1} \right)^{O-H-O} \quad (3)$$

gdzie szybkość relaksacji spowodowanej przeskokami protonu $1/T_1''$ wyraża się następującym wzorem [8,9]:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{4}{48} C \frac{a}{(1+a)^2} \left[\frac{\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1+4\omega^2\tau_c^2} \right] \quad (4)$$

Stałe a i C są opisane wzorami:

$$C = \frac{3}{10} \gamma^4 \hbar^2 \sum_i \left[r_{iA}^{-6} + r_{iB}^{-6} + r_{iA}^{-3} r_{iB}^{-3} (1 - 3 \cos^2 \Theta_i) \right], \quad (5)$$

$$a = \exp \left(\frac{\Delta E}{kT} \right)$$

Zakładając, że przeskok protonu w mostku wodorowym jest procesem aktywowanym termicznie zależność temperaturową czasu korelacji τ_c opisuje wzór:

$$\tau_c = \tau_0 \frac{\exp \left(\frac{H}{RT} \right)}{1 + \exp \left(-\frac{\Delta E}{RT} \right)} \quad (6)$$

gdzie τ_0 jest czynnikiem przedeksponencjalnym, ΔE oznacza różnicę między dwoma minimami energii potencjalnej a H jest barierą potencjału. Wynik dopasowania teoretycznych wartości czasu relaksacji otrzymanych na podstawie wzoru (3) do punktów eksperymentalnych przedstawiono linią ciągłą na Rys. 1. Tabela 2 przedstawia parametry obu rodzajów ruchów.

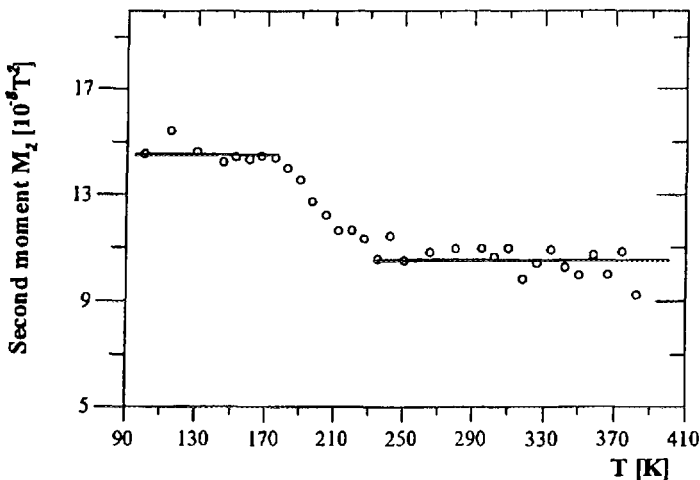
Różnica ΔE między dwoma minimami energii potencjalnej jest bardzo mała oznacza to, że przeskok protonu w mostku wodorowym odbywa się między dwoma równoważnymi położeniami a prawdopodobieństwa znalezienia się protonu w położeniu A lub B są takie same. Wartości współczynnika C obliczone na podstawie danych krystallograficznych i otrzymane z dopasowania są różne. Może to wynikać z faktu, że położenia atomów wodoru w komórce elementarnej są określone jedynie na podstawie obliczeń teoretycznych (ze znanych położen ciężkich atomów wyznaczonych metodami rentgenowskimi) a nie z badań neutronograficznych.

Type of motion	55,2 MHz	90MHz
rotacja grupy NH ₃	E _a =31,5 kJ/mol τ ₀ =2,9×10 ⁻¹⁴ s R _{H-H} =0,171 nm	E _a =31,5 kJ/mol τ ₀ =2,8×10 ⁻¹⁴ s R _{H-H} =0,171 nm
przeskoki protonu w mostku wodorowym	ΔE=2,2×10 ⁻¹² kJ/mol H=9,9 kJ/mol τ ₀ =5,87×10 ⁻¹² s C=123×10 ⁸ s ⁻²	ΔE=6,3×10 ⁻¹² kJ/mol H=10,2 kJ/mol τ ₀ =5,91×10 ⁻¹² s C=153×10 ⁸ s ⁻²

Tabela 2. Parametry ruchu grupy amonowej oraz ruchu atomu wodoru w mostku wodorowym w kryształ chlorowodoru noradrenaliny

Rys.2 przedstawia temperaturową zależność drugiego momentu linii NMR dla hydrochloru noradrenaliny mierzonego metodą "solid-echo" [10]. Redukcja drugiego momentu od wartości 14,5×10⁻⁸ T² dla temperatur poniżej 175K do M₂=10,5×10⁻⁸ T² dla temperatur powyżej 235K

odzwierciedla rotację grup amonowych. Zmiana drugiego momentu spowodowana przeskokiem protonu w mostku wodorowym wynosi około $0,5 \times 10^{-8} T^2$ i dlatego jest niemożliwa do zaobserwowania w przeprowadzonym eksperymencie.



Rys.2 Zależność drugiego momentu linii NMR od temperatury dla chlorowodoru noradrenaliny

Dokładne wyjaśnienie mechanizmu powodującego powstanie minimum niskotemperaturowego w przebiegu czasu relaksacji spin-sieć wymagałoby przeprowadzenia badań neutronograficznych kryształu chlorowodoru noradrenaliny lub wykonania badań NMR deuterów podstawionych w grupie hydroksylowej.

Autorzy dziękują dr W.Medyckiemu za pomoc techniczną w trakcie wykonywania eksperymentów.

Praca wykonana w ramach grantu PB 8.1 (Nr 2 P302 197 04)

Literatura

- [1] T.Grabias, N.Piślewski *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 3 299(1994)
- [2] O.E.O'Reilly, T.Tsang *Phys. Rev.* **157**, 417 (1967)
- [3] D.E.Woessner *J. Chem. Phys.* **36**, 1 (1962)
- [4] R.Bergin, D.Carlström *Acta Cryst.* **B24**, 1506 (1968)
- [5] A.M.Andersen *Acta Chem. Scand.* **B29** 239 (1975)
- [6] R.Bergin, D.Carlström *Acta Cryst.*, **23** (1967) 313
- [7] T.Grabias, N.Piślewski (wysłana do druku)
- [8] E.R.Andrew, L.Latanowicz *J. Mag. Res.* **68**, 232 (1986)
- [9] D.C.Look, I.J.Lowe *J. Chem. Phys.* **44**, 3437 (1966)
- [10] P.Mansfield "Progr. Nuclear Magnetic Spectroscopy", **8** (1971) 41