

А. А. КАРЕЛИН, действительный член АМН СССР [С. Р. МАРДАШЕВ]

**ЭНЗИМАТИЧЕСКОЕ N-МЕТИЛИРОВАНИЕ
γ-ГУАНИДИНМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ ГОМОГЕНАТАМИ
МОЗГА МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

γ-Гуанидинмасляная кислота (ГАГМК), обнаруженная в моче (¹), в мозге и других тканях (²), образуется у млекопитающих в результате трансамидирования между *L*-аргинином и γ-аминомасляной кислотой (ГАМК) (³). Увеличение концентрации ГАГМК было обнаружено в моторной зоне коры мозга кролика в период судорог, а также в эпилептиформном фокусе коры мозга человека (⁴). При интрацестернальном введении ГАГМК кролику это вещество вызывает тонико-клонические судороги (⁵). Поскольку ГАГМК является, однако, нормальным компонентом ткани мозга, можно было предполагать, что она быстро метаболизируется. Было предположено, что одним из возможных путей инактивации этого агента является ее N-метилирование с образованием N-метил-γ-гуанидинмасляной кислоты. Последняя обнаружена и хроматографически идентифицирована в моче кролика после внутрибрюшинного введения γ-гуанидинмасляной кислоты (⁶).

Настоящее сообщение показывает, что ткани мозга млекопитающих наряду с метилированием гуанидинуксусной кислоты (⁷) способны осуществлять метилирование ГАГМК S-аденозилметионином с образованием N-метил-γ-гуанидинмасляной кислоты.

Материалы и методы. Реактивы. γ-Гуанидинмасляная кислота была синтезирована из γ-аминомасляной кислоты («Реанал») путем взаимодействия с S-этилтиомочевинной-гидробромидом по (⁸). Гуанидинуксусная кислота (ГУКА) — препарат фирмы «Calbiochem». S-Аденозилметионин-хлорид (SAM) (80–85% чистоты, фирма «Schuchardt»). Восстановленный глутатион (GSH) фирмы «Реанал». Реактив Ллойда был получен из природного продукта — бентонита. Нитропруссид натрия фирмы «Спофа». Метилгуанидин азотнокислый квалификации ч. («Союзреактив»). Остальные реактивы марки х.ч. («Союзреактив»).

В качестве источника фермента использовали гомогенаты коры больших полушарий мозга крыс, а также других животных. Опыты ставили на крысах-самках линии Вистар весом 100–170 г. Гомогенаты готовили путем гомогенизации тканей в гомогенизаторе Поттера — Эльвейгема. Гомогенизацию производили в охлажденном 0,05 M трис-HCl-буфере pH 7,45 в течение 3 мин. Инкубационная среда для измерения метилазной активности содержала: 3 ммоль гуанидинмасляной или гуанидинуксусной кислоты, 2,5 ммоль S-аденозил-L-метионина, 10 ммоль восстановленного глутатиона, 200 ммоль трис-HCl-буфера pH 7,58. К 0,6 мл этой среды перед началом реакции было добавлено 0,4 мл 15% гомогената ткани мозга. Смесь инкубировали в водяной бане при 37° в течение 4 час. Реакцию прекращали добавлением 1 мл 10% трихлоруксусной кислоты.

Продукты реакций метилирования ГУКА и ГАГМК после автоклавирования при 1 атм. в течение 30 мин. сорбировали на реактиве Ллойда и элюировали раствором щелочного пикрата. Об активности судили по интенсивности окраски, полученной в результате конденсации образовавшихся после автоклавирования креатинина и соответственно ангидрида N-метил-

Таблица 1

Вид животного	Образовавшийся продукт, мкмол. за 2 часа инкубаций с S-аденозил- метионином при 37° на 1 г сырой ткани мозга	
	из гуанидинуксу- сной кислоты	из гуанидинмасля- ной кислоты
Крыса, лобная доля	0,12±0,04	0,57±0,03
Собака, то же	0,02±0,004	0,35±0,04
Крупный рогатый скот, то же	0,75±0,08	0,53±0,01
Курица (13 недельные цыплята), то же	0,25±0,007	0,57±0,02
Кролики		
лобная доля	0,56	0,69
височная »	0,55	0,18
затылочная »	0,70	0,13
Кошка		
лобная доля	0,26	0,36
височная »	1,56	0,0
затылочная »	0,38	0,26
Человек		
лобная доля	0,20	0,22
височная »	0,14	0,0
теменная »	0,43	0,13
затылочная »	0,07	0,0

Примечание. Количество продукта оценивалось методом щелочного пикрата по креатинину (см. описание в тексте). Ткань лобной доли взята главным образом из области передней центральной извилины (моторная зона коры мозга).

γ-гуанидинмасляной кислоты с пикриновой кислотой в присутствии натриевой щелочи⁽⁹⁾.

Более специфическая процедура исследования метилазы ГАГМК включала непосредственное превращение N-метил-γ-гуанидинмасляной кислоты в метилгуанидин с последующим колориметрическим определением согласно⁽¹⁰⁾. Кроме того продукт N-метилирования ГАГМК — N-метил-γ-гуанидинмасляная кислота была идентифицирована методом хроматографии на бумаге в системе растворителей *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (73:10:17) по процедуре Мацуока⁽⁶⁾. Трихлоруксусные фильтраты после нейтрализации раствором 1N КОН были нанесены в объеме 0,2 мл на бумагу Ватман № 1. В качестве свидетеля использовали креатин, γ-гуанидинмасляную кислоту и гликоциамин. После разгонки в течение 18 час. полученные на хроматограмме пятна были проявлены смесью равных объемов 10% растворов феррицианида К, нитропруссиды Na и натриевой щелочи (ФЦНП). Известно, что ФЦНП хорошо проявляет асимметрические N-метилированные производные моно- и дизамещенных гуанидинов⁽¹¹⁾.

Результаты. Обнаружение реакционного продукта метилирования ГАГМК, полученного после инкубации γ-гуанидинмасляной кислоты с S-аденозилметионином под воздействием гомогенатов мозга млекопитающих, вначале оценивалось нами колориметрически по интенсивности пикратной реакции Яффе после адсорбции автоклавированного продукта на реактиве Ллойда. Известно, что среди продуктов взаимодействия креатина и пикриновой кислоты в присутствии щелочи был найден метилгуанидин⁽¹²⁾. Иными словами, метилгуанидин включается в пикратную реакцию Яффе. Можно было ожидать поэтому, что N-метилгуанидиновый дериват ГАГМК также должен реагировать с пикриновой кислотой в присутствии щелочи. Продукт реакции метилирования ГАГМК после автоклавирования в кислой среде действительно давал пикратную реакцию Яффе. Хотя интенсивность ее была меньше по сравнению с интенсивностью окраски, вызываемой креатинином, хромогенный материал, сорбированный на реактиве Ллойда, имел красную окраску, подобно креатинину, и не давал реакции Сакагучи высокоспецифического фарб-теста для монозаме-

щенных гуанидинов. Это доказывает, что синтезированное соединение имеет в своем составе метилгуанидиновый радикал.

Данные о содержании в инкубационных пробах N-метилгуанидиновых кислот — креатина и соответственно N-метил- γ -гуанидинбутирата, полученных при использовании в качестве акцептора CH_3 -группы гуанидинуксусной и гуанидинмасляной кислоты под воздействием гомогенатов мозга различных животных, представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, гомогенаты коры мозга многих животных *in vitro* обладают способностью синтезировать креатин из S-аденозилметионина и гуанидинуксусной кислоты. Однако эффективность ГАГМК в качестве акцептора CH_3 -группы S-аденозилметионина выше, чем гуанидинуксусной кислоты, в 5–10 раз (крыса, собака, курица). В лобной доле коры мозга кролика, кошки, человека ГАГМК более активна. В других зонах коры мозга *in vitro* более активна гуанидинуксусная кислота в качестве акцептора.

Ниже представлены результаты исследования активности ГАГМК в качестве акцептора CH_3 -группы S-аденозилметионина в различных тканях крысы *in vitro*: кора больших полушарий 0,48–0,5, продолговатый мозг 0,24, спинной мозг 0, печень 0,13, почки 0,07 ед.

Продукт реакции, образуемый гомогенатами мозга в результате инкубации ГАГМК с S-аденозил-L-метионином был идентифицирован с помощью хроматографии на бумаге (см. материалы и методы). Когда γ -гуанидинмасляная, а не гуанидинуксусная кислота использовалась в качестве субстрата фермента, продукт трансметилазной реакции был аутоидентичен метильному деривату ГАГМК. Пятно, соответствующее метильному производному ГАГМК — N-метил- γ -гуанидинмасляной кислоте (N-метил-ГАГМК), после разгонки в растворителе локализуется дистальнее по фронту бутанола пятна, соответствующего ГАГМК (*R*, 0,46) (рис. 1), что совпадает с данными (⁶). Сравнение хроматограмм, полученных после нанесения фильтратов из инкубационных проб, содержавших ГАГМК, и фильтратов, не содержащих ее, показывает, что только в первом случае появляется пятно, аутоидентичное N-метильному деривату ГАГМК. Этот метаболит отсутствует в контрольной инкубационной пробе, в которой ГАГМК была опущена.

Помимо хроматографической идентификации мы применили метод превращения синтезированной N-метил-ГАГМК в метилгуанидин посредством обработки нитробензальдегидом согласно (¹², ¹³).

Схематически превращение N-метил-ГАГМК в метилгуанидин может быть представлено следующим образом:

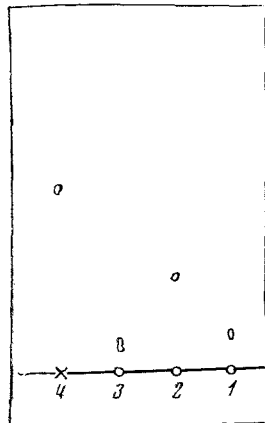
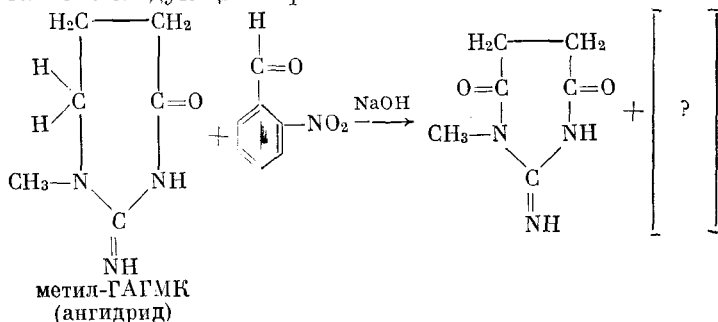
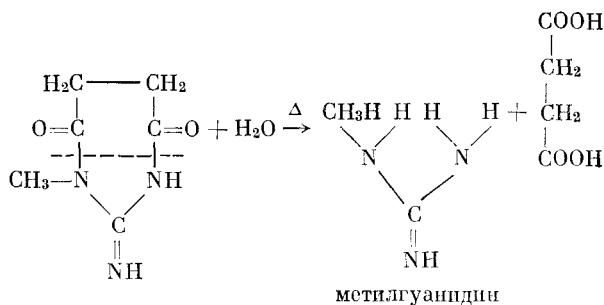


Рис. 1. N-метилирование γ -гуанидинмасляной кислоты гомогенатом мозга крысы. Растворитель *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (73 : 10 : 17). 1 — креатин 2 — γ -гуанидинмасляная кислота; 3 — гликоциамин; 4 — N-метилгуанидиновый дериват γ -гуанидинмасляной кислоты (N-метил-ГАГМК)



Результаты данной работы показывают, что гомогенаты ткани коры мозга млекопитающих наряду с синтезом креатина *in vitro* способны катализировать синтез N-метил-γ-гуанидинмасляной кислоты из SAM и ГАГМК. Энзиматическая природа этого синтеза демонстрируется посредством факта инактивации N-метилирования ГАГМК при нагревании гомогената ткани мозга.

Относительно самостоятельной роли метилазы ГАГМК пока могут быть лишь спекулятивные суждения. Однако присутствие ГАГМК в качестве нормального компонента в ткани мозга и других тканях млекопитающих (почки, печень) доказано (², ³). Доказано также, что это вещество является мощным синаптическим агентом и при интрацеребральном введении животным вызывает судороги. Если это так, то, очевидно, должны существовать способы инактивации ГАГМК. Хроматографический анализ показывает, что метилирование ГАГМК S-аденозилметионином осуществляется у иминогруппы. Сходство в химическом строении N-метил-ГАГМК и ацетилхолина, медиатора возбуждения в ц.п.с., указывает на возможную конкуренцию за рецепторные участки синаптической мембраны, воспринимающие эффект медиатора возбуждения, и дает основание предполагать, что метилирование ГАГМК, возможно, является способом инактивации этого нейротонизирующего агента.

В свете полученных в работе факторов становится возможным постулировать вероятности протекания в мозгу млекопитающих реакции трансметилирования ГАГМК S-аденозилметионином как реакции, идущей вслед за трансамидинированием ГАГМК (³).

Трансметилирование ГАГМК, возможно, имеет нейрофизиологическое значение.

Лаборатория энзимологии
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
21 V 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ N. V. Thoai, A. Olomucke et al., C. R. Soc. biol., v. 150, 2160 (1960). ⁸ F. Irreverre, R. L. Evans et al., Nature, v. 180, 74 (1957). ³ J. J. Pisano, D. Abracham, S. Udenfriend, Arch. Biochem. and Biophys., v. 100, 323 (1963). ⁴ И. А. Сыгинский, В кн.: Гамма-аминомасляная кислота в деятельности нервной системы, «Наука», 1972, стр. 29. ⁵ D. Jinnai, A. Sawai, A. Mori, Nature, v. 212, 267 (1966). ⁶ K. Matsuoka, J. Osaka Med. Coll., v. 19, № 3, 315 (1959). ⁷ A. J. Defalco, R. K. Davies, J. Neurochem., v. 7, 308 (1961). ⁸ E. Brand, F. C. Brand, In: Org. Synthesis, Collect. vol., 3, 1955, p. 440. ⁹ H. Borsook, J. Biol. Chem., v. 110, 481 (1935). ¹⁰ I. M. Stein, M. J. Micklus, Clin. Chem., v. 19, № 6, 583 (1973). ¹¹ J. Roche, N. V. Thoai, J. L. Heit, Biochim. et biophys. acta, v. 14, 71 (1954). ¹² J. F. Van Pilsum, R. P. Martin et al., J. Biol. Chem., v. 222, 225 (1956). ¹³ J. F. Van Pilsum, M. V. Carlson, Anal. Biochem., v. 35, 424 (1970).