

И. В. Шостаковская, Л. А. Дубицкий

РОЛЬ М- И Н-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ РНК В ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ЖЕЛЕЗАХ

Холиномиметические вещества, введенные в организм животных, усиливают включение меченых аминокислот в белки тканей слизистой оболочки желудка [6] и поджелудочной железы [3, 18, 19, 20], а также увеличивают в этих тканях интенсивность обмена нуклеиновых кислот [2, 7, 10, 13, 22, 23]. В предыдущих наших исследованиях было установлено [5, 11], что инъекции животным ацетилхолина совместно с прозеринном усиливают интенсивность синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов РНК в тканях слизистой оболочки желудка и поджелудочной железы, но не печени. Однако некоторые авторы в условиях *in vitro* отмечали отсутствие стимулирующего эффекта холиномиметиков на включение $[2-^{14}\text{C}]$ оротовой кислоты и $[8-^{14}\text{C}]$ аденина в РНК срезов поджелудочной железы собак [15, 17], а также на включение меченых аминокислот в белки срезов поджелудочной железы [12, 19] и биоптов слизистой оболочки желудка [21].

Не исключено, что в условиях организма воздействие ацетилхолина на метаболическое обеспечение секреторного процесса железистых тканей и в том числе на обмен пиримидиновых нуклеотидов РНК осуществляется не только через М-холинорецепторы, но может потенцироваться и пролонгироваться другими регуляторными системами, активируемыми, в частности, через Н-холинорецепторы ганглионарных синапсов [1].

Мы изучали значение М- и Н-холинорецепторов в реализации эффекта ацетилхолина на интенсивность синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов РНК в слизистой оболочке желудка, поджелудочной железе и печени.

Методика

Эксперименты проводили на белых крысах массой 170—220 г, голодавших перед опытом в течение 18 ч. Ацетилхолинхлорид вводили внутривентриально, совместно с прозеринном за 1 ч до декапитации в дозах соответственно 100 и 5 мкг на 100 г массы животного. Атропинсульфат в дозе 0,25 мг и бензогексоний в дозе 0,5 мг на 100 г массы животного вводили подкожно за 20 мин до введения ацетилхолина. Интенсивность синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов РНК оценивали по включению в

Таблица 1. Влияние ацетилхолина на поступление $[2-^{14}\text{C}]$ оротовой кислоты в нуклеотиды РНК после предварительного введения животным атропина или бензогексония

Условия опыта	Кровь, радиоактивность, имп/мин на 1 мл $\times 10^{-3}$	Радиоактивность, имп/мин на 1 мг ДНК $\times 10^{-1}$		
		Слизистая оболочка желудка		Панкреас
		КРФ	РНК	
Контроль	$10,6 \pm 0,5$	$33,3 \pm 2,1$	$6,74 \pm 0,28$	$69,5 \pm 3,2$
Ацетилхолин + прозерин	$10,3 \pm 0,2$ $p_1 > 0,05$	$69,0 \pm 6,0$ $p_1 < 0,001$	$16,26 \pm 1,14$ $p_1 < 0,001$	$120,5 \pm 8,4$ $p_1 < 0,001$
Атропин — ацетилхолин + прозерин	$10,2 \pm 0,5$ $p_1 > 0,05$	$34,3 \pm 2,3$ $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$	$10,11 \pm 0,51$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$	$62,3 \pm 2,7$ $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$
Бензогексоний — ацетилхолин + прозерин	$9,8 \pm 0,6$ $p_1 > 0,05$	$38,1 \pm 3,7$ $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$	$9,81 \pm 0,77$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$	$77,4 \pm 5,8$ $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$

Примечание. p_1 — достоверность различий по сравнению с данными контрольных животных; p_2 — животных, получивших ацетилхолин.

них [^{14}C] оротовой кислоты (Институт изотопов АН ВНР; $1,5 \text{ ГБк/ммоль}$), которую вводили животным внутрибрюшинно из расчета $0,7 \text{ мкмоль}$ на 100 г массы животного. Удельная радиоактивность препарата оротовой кислоты составляла $4,6 \times 10^7 \text{ имп/мин}$ на 1 мкмоль .

После декапитации животных ткани поджелудочной железы, слизистой оболочки желудка и печени замораживали и немедленно использовали для выделения кислоторастворимой фракции тканей (КРФ) и суммарной фракции нуклеотидов РНК, как это описано ранее [5]. Выделение КРФ крови, полученной во время декапитации животных, осуществляли таким же методом, как и в вышеуказанных тканях.

Из осадка тканей, полученного после удаления нуклеотидов РНК, выделяли ДНК [9] и определяли ее количество спектрофотометрически [6]. Фракцию с нуклеотидами РНК гидролизуют в 1 М HCl при 100°C в течение 1 ч с целью получения пиримидиновых нуклеотидов в форме монофосфатов, а пуриновых нуклеотидов — в форме азотистых оснований. Уридилловые и цитидиловые нуклеотиды разделяли на колонке со смолой Дауэкс 50×4 в H^+ -форме ($200\text{--}400 \text{ меш}$) и определяли их количество спектрофотометрически с использованием соответствующих коэффициентов молярной экстинкции [24].

Радиоактивность КРФ и суммарной фракции нуклеотидов РНК определяли на газопоточном счетчике «Протока». Фракции уридилловой и цитидиловой кислоты высушивали в ротаторном испарителе при 40°C , затем растворяли в $1 \text{ мл } 0,05 \text{ М HCl}$ и определяли их радиоактивность в диоксановом сцинтилляторе на сцинтилляционном счетчике СБС-2. Результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что ацетилхолин, введенный отдельно или после предварительной инъекции холиноблокаторов, не изменял концентрацию радиоактивной метки оротовой кислоты в крови (табл. 1). По-видимому, использованные нейротропные вещества существенно не влияют на кинетические параметры процесса поступления в кровь и выведения из нее меченой оротовой кислоты. Однако, как видно из табл. 1, введение животным ацетилхолина резко увеличивало интенсивность поступления меченой оротовой кислоты в КРФ и ее включение в РНК тканей поджелудочной железы и слизистой оболочки желудка, но не печени. Отсутствие сдвигов в концентрации метки оротовой кислоты в крови, а также значительное повышение ее количества в нуклеотидах РНК исследованных тканей указывает на увеличение в последних интенсивности вовлечения предшественника в биосинтез пиримидиновых нуклеотидов.

Предварительно введенный атропин, специфически блокирующий периферические М-холинорецепторы, значительно угнетал стимулиру-

кислоты кислоторастворимую фракцию (КРФ) и ее включение в РНК тканей после животным тропина или бензогексония ($M \pm m$, $n=5$)

Время, имп/мин	Поджелудочная железа		Печень	
	КРФ	РНК	КРФ	РНК
0,28	$69,5 \pm 3,2$	$6,85 \pm 0,57$	$7707,9 \pm 303,6$	$1208,9 \pm 53,4$
1,14	$120,5 \pm 8,4$	$14,07 \pm 1,14$	$7241,7 \pm 445,4$	$1210,3 \pm 81,8$
001	$p_1 < 0,001$	$p_1 < 0,001$	$p_1 > 0,05$	$p_1 > 0,05$
0,51	$62,3 \pm 2,7$	$5,21 \pm 0,47$	$7049,6 \pm 459,0$	$1160,6 \pm 74,6$
001	$p_1 > 0,05$	$p_1 > 0,05$	$p_1 > 0,05$	$p_1 > 0,05$
01	$p_2 < 0,001$	$p_2 < 0,001$		
0,77	$77,4 \pm 5,8$	$7,88 \pm 0,23$	$6975,3 \pm 258,0$	$1150,9 \pm 88,9$
01	$p_1 > 0,05$	$p_1 > 0,05$	$p_1 > 0,05$	$p_1 > 0,05$
01	$p_2 < 0,01$	$p_2 < 0,001$		

животных; 2 — животных, которым вводили ацетилхолин + прозерин.

ший эффект ацетилхолина на поступление метки оротовой кислоты в КРФ и ее включение в РНК слизистой оболочки желудка и поджелудочной железы. Сходный эффект был получен и в опытах с предварительным введением животным бензогексония, специфически блокирующего Н-холинорецепторы ганглионарных синапсов. Таким образом, необходимым условием воздействия ацетилхолина на обмен пиримидиновых нуклеотидов РНК в этих тканях является интактность обоих видов холинорецепторов.

Таблица 2. Влияние ацетилхолина на включение $[2-^{14}C]$ оротовой кислоты в уридиловые и цитидиловые нуклеотиды РНК тканей после предварительного введения животным атропина и бензогексония (радиоактивность в имп/мин на 1 мг ДНК $\times 10^{-2}$; $M \pm m$, $n=4$)

Нуклеотиды РНК	Условия опыта			
	Контроль	Ацетилхолин+прозерин	Атропин—ацетилхолин+прозерин	Бензогексоний—ацетилхолин+прозерин
Слизистая оболочка желудка				
СМР	4,06 $\pm$ 0,37	7,31 $\pm$ 0,63 $p_1 < 0,01$	4,79 $\pm$ 0,14 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$	4,23 $\pm$ 0,49 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$
УМР	13,32 $\pm$ 0,48	36,43 $\pm$ 1,58 $p_1 < 0,001$	19,54 $\pm$ 2,47 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$	20,07 $\pm$ 2,24 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$
СМР/УМР	0,304 $\pm$ 0,021	0,200 $\pm$ 0,010 $p_1 < 0,01$	0,258 $\pm$ 0,021 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$	0,205 $\pm$ 0,005 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$
Поджелудочная железа				
СМР	4,59 $\pm$ 0,29	5,94 $\pm$ 0,31 $p_1 < 0,05$	2,73 $\pm$ 0,11 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	2,12 $\pm$ 0,21 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
УМР	13,68 $\pm$ 1,19	50,49 $\pm$ 4,22 $p_1 < 0,001$	10,71 $\pm$ 0,96 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$	21,25 $\pm$ 0,51 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$
СМР/УМР	0,342 $\pm$ 0,019	0,119 $\pm$ 0,006 $p_1 < 0,001$	0,261 $\pm$ 0,026 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$	0,101 $\pm$ 0,007 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$
Печень				
СМР	542,1 $\pm$ 31,6	517,2 $\pm$ 23,9 $p_1 > 0,05$	567,4 $\pm$ 50,1 $p_1 > 0,05$	584,4 $\pm$ 54,0 $p_1 > 0,05$
УМР	3046,3 $\pm$ 162,5	3139,3 $\pm$ 96,2 $p_1 > 0,05$	2843,7 $\pm$ 270,0 $p_1 > 0,05$	2918,3 $\pm$ 187,1 $p_1 > 0,05$
СМР/УМР	0,178 $\pm$ 0,008	0,166 $\pm$ 0,003 $p_1 > 0,05$	0,199 $\pm$ 0,010 $p_1 > 0,05$	0,200 $\pm$ 0,013 $p_1 > 0,05$

Примечание. p_1 и p_2 — см. примечание к табл. 1.

В следующей серии исследований определяли соотношение скоростей поступления уридиловых предшественников в уридиловые (УМР) и цитидиловые (СМР) нуклеотиды РНК тканей, которое оценивали по соотношению радиоактивностей СМР/УМР. Результаты этих исследований показали (табл. 2), что влияние ацетилхолина на обмен пиримидиновых нуклеотидов РНК в слизистой оболочке желудка и поджелудочной железе в условиях раздельного блокирования М- или Н-холинорецепторов отличается. Так, ацетилхолин более эффективно стимулировал включение меченой оротовой кислоты в УМР, чем в СМР РНК. В связи с этим соотношение радиоактивностей СМР/УМР в поджелудочной железе снижалось на 65 %, а в слизистой оболочке желудка — на 34 %. Учитывая тот факт, что при получасовых экспозициях клеток млекопитающих с радиоактивными предшественниками основное количество метки обнаруживается в ДНК-подобной РНК [14, 16], наблюдаемое нами изменение в соотношении радиоактивностей СМР/УМР можно объяснить интенсификацией обмена этой РНК, характеризую-

щейся более вариабельно в лина в УМР в соотношении аналогично, го предшествен и поджелудочных тканей этих тканей ростер востро

Блоки на общую нуклеотиды предшественных условиях ба ствует, что пиримидинов М-холинорецепторы литературы белка в РНК сти РНК-поли РНК [4].

Сущест на общую нуклеотиды детельствреактивных цепторы на нарных ней их роль в дов РНК ции стимулируе обеспечение числе на об

В пече синтеза де их поступл пиримидинов предварит зом, обмен подвержен нервной сист

Получе тканей сли лизм пирим рующему ва на интенсив тканей при возбуждени изменения интенсивн нуклеотиды

1. Аничко С. 1974. — 285
2. Губерина И. В. 1974. — 285

щейся более высоким содержанием в ней *UMP*, чем *СМР* [14]. Предварительно введенный атропин существенно угнетал эффект ацетилхолина в исследуемых тканях на включение меченого предшественника в *UMP* и *СМР* РНК, а также значительно восстанавливал величину соотношения радиоактивностей *СМР/UMP*. Бензогексоний, введенный аналогично, также угнетал эффект ацетилхолина на включение меченого предшественника в *UMP* и *СМР* РНК в слизистой оболочке желудка и поджелудочной железе. Вместе с тем, судя по соотношению радиоактивностей *СМР/UMP*, он в отличие от атропина, не предотвращал в этих тканях вызываемого ацетилхолином изменения соотношения скоростей поступления уридилowych предшественников в *UMP* и *СМР* РНК.

Блокирование атропином стимулирующего эффекта ацетилхолина на общую интенсивность включения предшественника в пиримидиновые нуклеотиды РНК и его влияния на соотношение скоростей поступления предшественника в *UMP* и *СМР* РНК, которое, однако, сохраняется в условиях блокады бензогексонием ганглионарных синапсов, свидетельствует, что влияние ацетилхолина на исследуемые показатели обмена пиримидиновых нуклеотидов РНК осуществляется в основном через М-холинорецепторы исследуемых тканей. Этот вывод согласуется с литературными данными о стимуляции М-холиномиметиками синтеза белка и РНК в поджелудочной железе крыс [22, 23], а также активности РНК-полимеразы II [13], ответственной за синтез ДНК-подобной РНК [4].

Существенное угнетение стимулирующего влияния ацетилхолина на общую интенсивность включения предшественника в пиримидиновые нуклеотиды РНК после предварительного введения бензогексония свидетельствует также об участии в вызываемых им эффектах Н-холинореактивных систем. Поскольку бензогексоний блокирует Н-холинорецепторы не только холинергических, но и адренергических постганглионарных нейронов, а также хромоаффинных клеток надпочечников [1], их роль в наблюдаемых изменениях обмена пиримидиновых нуклеотидов РНК под влиянием ацетилхолина, по-видимому, состоит в активации симпато-адреналовой системы, потенцирующей, как известно, стимулирующее влияние холинореактивных систем на метаболическое обеспечение секреторного процесса в поджелудочной железе и в том числе на обмен макроэргических соединений и нуклеиновых кислот [10].

В печени ацетилхолин существенно не влиял на интенсивность синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов РНК и направленность их поступления в *UMP* и *СМР* РНК. Включение оротовой кислоты в пиримидиновые нуклеотиды РНК печени не изменялось и в опытах с предварительным введением животным холиноблокаторов. Таким образом, обмен пиримидиновых нуклеотидов в ткани этой железы менее подвержен контролируемому влиянию со стороны парасимпатической нервной системы.

Полученные данные свидетельствуют, что в отличие от печени в тканях слизистой оболочки желудка и поджелудочной железы метаболизм пиримидиновых нуклеотидов РНК более чувствителен к стимулирующему влиянию ацетилхолина. В реализации эффекта ацетилхолина на интенсивность обмена пиримидиновых нуклеотидов РНК в этих тканях принимают участие М- и Н-холинорецепторы. Вместе с тем возбуждение М-холинорецепторов вызывает качественно более глубокие изменения этого обмена, выражающиеся не только в увеличении его интенсивности, но и в изменении направленности потока уридилowych нуклеотидов в *СМР* и *UMP* РНК в исследуемых тканях.

Список литературы

1. Аничков С. В. Избирательное действие медиаторных средств.— Л.: Медицина, 1974.— 295 с.
2. Губерниев М. А., Ильина Л. И. Скорость обновления фосфонуклеотенда в пищеварительных железах.— Докл. АН СССР, 1951, 71, № 2, с. 351—353.