

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. И.П. ПАВЛОВА РАН

На правах рукописи

ЗОЛОТАРЕВ
Василий Авенирович

**НИТРЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ГАСТРОПРОТЕКЦИИ В
УСЛОВИЯХ ИРРИТАЦИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА**

Специальность 1.5.5 – физиология человека и животных

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург

2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	21
1.1 Адаптивная гастропротекция и барьерная функция желудочного эпителия	21
1.1.1 Понятие гастропротекции	21
1.1.2 Барьерная функция слизистой оболочки желудка	24
<i>1.1.2.1 Преэпителиальные факторы гастропротекции</i>	<i>24</i>
<i>1.1.2.2 Барьерная функция поверхностного эпителия.....</i>	<i>27</i>
<i>1.1.2.3 Гастропротективные реакции подслизистого слоя</i>	<i>29</i>
1.1.3 Нейрогуморальная регуляция барьерной функции СОЖ.....	30
1.2 Апикальный и базолатеральный ионный транспорт в СОЖ.....	34
1.2.1 Ионный транспорт в обкладочных клетках	34
<i>1.2.1.1 Транспорт протонов через апикальную мембрану обкладочных клеток.....</i>	<i>35</i>
<i>1.2.1.2 Функции карбоангидраз в обкладочных клетках.....</i>	<i>37</i>
<i>1.2.1.3 Апикальный перенос HCO_3^- в обкладочных клетках</i>	<i>38</i>
<i>1.2.1.4 Базолатеральные транспортеры HCO_3^- в обкладочных клетках</i>	<i>39</i>
<i>1.2.1.5 Медиаторные и ферментативные механизмы, обеспечивающие желудочную секрецию кислоты</i>	<i>41</i>
1.2.2. Транспорт HCO_3^- в эпителиоцитах желудка	43
<i>1.2.2.1 Апикальный транспорт HCO_3^- в поверхностных эпителиальных клетках СОЖ</i>	<i>46</i>
<i>1.2.2.2 Базолатеральные транспортеры HCO_3^- в поверхностных эпителиальных клетках желудка</i>	<i>47</i>
1.2.3 Щелочной прилив	48
1.3 Секреция пепсиногена и гастропротекция	50
1.3.1 Пепсиноген как фактор поражения слизистой оболочки желудка и пищевода.....	50
1.3.2 Пепсиногены, структура и секреция	51
1.3.3 Регуляция секреции пепсиногена.....	52
1.3.4 Внутриклеточные ферментативные механизмы, регулирующие секрецию в главных клетках.....	55
1.4 Простагландины и гастропротекция	56
1.4.1 Простагландины и циклооксигеназы.....	57
1.4.2 Простагландиновые рецепторы.....	59

1.4.3 Распространение ПГ и ЕР рецепторов в желудке	60
1.4.4 Значение простагландинов в управлении желудочной секрецией и в гастропротекции.....	61
1.4.5 Взаимодействие простагландинов и капсаицин-чувствительных афферентных нервных окончаний в желудке	65
1.5 Оксид азота - регулятор желудочной секреции и гастропротекции	67
1.5.1 Оксид азота. Синтез и механизм действия.....	67
1.5.2 NOS и NO в слизистой оболочке желудка	71
1.5.2.1 Оксид азота модулирует секрецию обкладочных клеток	72
1.5.2.2 Оксид азота в главных клетках желудочных желез	74
1.5.2.3 Влияние NO на секрецию слизи и бикарбонатов в пришеечных и поверхностных эпителиальных клетках	75
1.5.3 NOS и кровоток в желудке.....	77
1.5.4 Функции NO в нервном сплетении желудка.....	79
1.5.5 Роль NO в поддержании целостности СОЖ	82
1.5.6 Взаимодействие нитрергической и простагландиновой систем регуляции	83
1.6 Физиологическое значение капсаицин-чувствительных первичных афферентов в желудке.....	87
1.6.1 Сенсоры кислоты в ЖКТ.....	88
1.6.1.1 Кислоточувствительные ионные каналы и мембранные рецепторы, реагирующие на изменение pH	89
1.6.1.2 Ванилоидный рецептор 1-го типа	91
1.6.1.3 Фармакология TRPV1	94
1.6.2 Экспрессия и функциональное значение кислоточувствительных ионных каналов и рецепторов в желудке	98
1.6.2.1 Реакция спинальных и вагусных ноцицепторов на повышение желудочной кислотности.....	99
1.6.2.2 TRPV1 иммунореактивность в стенке желудка	101
1.6.2.3 Локальная эффекторная функция КЧПА в желудке	102
1.6.3 КЧПА как регулятор реакций адаптивной гастропротекции.....	107
1.6.3.1 КЧПА и продукция кислоты	107
1.6.3.2 Роль КЧПА и TRPV1 в регуляции продукции бикарбонатов в желудке	108
1.6.3.3 Роль КЧПА и TRPV1 в реакции вазодилатации в подслизистом слое, вызванной аппликацией КАПС или кислоты	109
2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	111

2.1 Экспериментальные животные и хирургические вмешательства	111
2.1.1 Хирургическая подготовка к острому опыту.....	111
2.1.2 Хирургическое изготовление хронической фистулы желудка	115
2.2 Полостная перфузия желудка.....	115
2.3. Измерение концентрации кислоты, бикарбонатов и пепсиногена в желудочном перфузате	116
2.3.1 Комбинированный датчик для измерения pH/PCO ₂	118
2.3.2 Измерение pH и ECO ₂ , расчет величины секреции кислоты и бикарбонатов в перфузируемом желудке крысы	119
2.3.3 Верификация измерительной системы <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	121
2.3.4 Определение концентрации пепсиногена в перфузате	124
2.4 Оценка объемного кровотока в стенке желудка	125
2.5 Регистрация данных и программное обеспечение	125
2.6 Препаровка и электрическое раздражение блуждающего нерва...	126
2.7 Оценка индекса поражения и относительной площади гиперемии СОЖ.....	127
2.8. И использованные препараты	128
2.9 Представление данных, статистический анализ	129
3 РЕЗУЛЬТАТЫ	131
3.1 Влияние экзогенной кислоты и полостного осмотического давления в желудке на секрецию бикарбонатов и пепсиногена в зависимости от активности Н⁺,К⁺-АТФазы	131
3.1.1 Влияние слабой ирритации СОЖ на продукцию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена в желудке бодрствующих крыс; эффект омепразола	132
3.1.2 Продукция бикарбонатов и пепсиногена в желудке наркотизированных крыс зависимости от градиента кислотности в полости органа	137
3.2 Действие избирательной и неизбирательной блокады изоформ конститутивной синтазы оксида азота на желудочную секрецию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена на фоне ирритации СОЖ; влияние простагландинов	140
3.2.1 Влияние L-NNA, 7-NI и омепразола на базальную секрецию кислоты и бикарбонатов в желудке.....	141
3.2.2 Влияние L-NNA, 7-NI и омепразола на желудочную секрецию бикарбонатов, вызванную слабой ирритацией слизистой оболочки органа	144

3.2.3 Влияние L-NNA, 7-NI, омепразола и ваготомии на секрецию пепсиногена на фоне слабой ирритации слизистой оболочки органа.....	146
3.2.4 Действие блокаторов cNOS на секрецию бикарбонатов на фоне неселективного подавления активности циклооксигеназ	147
3.2.5 Действие блокаторов cNOS на секрецию пепсиногена на фоне неселективного подавления активности циклооксигеназ	149
3.2.6 Влияние метиленовой сини и нитропруссиды натрия на желудочную секрецию HCO_3^- , вызванную слабой ирритацией слизистой оболочки..	154
3.2.7 Влияние нитропруссиды натрия на желудочную секрецию пепсиногена на фоне слабой ирритации слизистой оболочки	155
3.3 Зависимость секреции бикарбонатов и пепсиногена от концентрации бикарбонатов в желудочном кровотоке	161
3.3.1 Базальная секреция кислоты, бикарбонатов и пепсиногена на фоне внутривенной инфузии NaHCO_3	162
3.3.2 Влияние внутривенной инфузии NaHCO_3 на секрецию бикарбонатов и пепсиногена при ирритации СОЖ	163
3.3.3 Действие L-NNA, 7-NI на желудочную секрецию бикарбонатов и пепсиногена на фоне внутривенной инфузии NaHCO_3	167
3.3.4 Влияние экзогенного NO на желудочную секрецию HCO_3^- на фоне в.в. инфузии NaHCO_3	169
3.3.5 Взаимное влияние блокады cNOS и ЦОГ при регуляции желудочной секреции бикарбонатов на фоне в.в. инфузии NaHCO_3	169
3.3.6 Влияние DIDS, хлорида аммония и ацетазоламида на секрецию бикарбонатов, вызванную ирритацией СОЖ на фоне в.в. инфузии NaHCO_3	173
3.4 Изменение кровотока в желудке под действием блокаторов cNOS и на фоне ирритации СОЖ.....	176
3.4.1 Изменение объемного кровотока в стенке желудка при системном и локальном введении блокаторов cNOS	177
3.4.2 Изменение объемного кровотока в стенке желудка при слабой ирритации СОЖ	179
3.4.3 Влияние L-NNA, 7-NI, ИНД и омепразола на эрозивные поражения и площадь гиперемизированных участков СОЖ	182
3.5 Роль капсаицин-чувствительных афферентных окончаний в секреторном ответе на ирритацию СОЖ; значение TRPV1 рецепторов	184

3.5.1 Влияние блокады TRPV1 и ASIC, а также десенситизации капсаицин-чувствительных первичных афферентов на желудочную секрецию HCO_3^- в базальных условиях и на фоне ирритации СОЖ....	185
3.5.2 Влияние блокады TRPV1 и ASIC, а также десенситизации КЧПА на желудочную секрецию пепсиногена на фоне ирритации СОЖ; взаимодействие КПЗП и блокаторов cNOS	186
3.5.3 Влияние блокады TRPV1 на объемный кровоток в желудке на фоне ирритации СОЖ	190
3.6 Парасимпатические воздействия на желудочную секрецию на фоне слабой ирритации слизистой оболочки; роль нитрергической и простагландиновой системы	192
3.6.1 Роль холинергического, гистаминового и гастринового опосредования в регуляции желудочной секреции кислоты, бикарбонатов и пепсиногена	192
3.6.2 Избирательная регуляция желудочной секреции кислоты, бикарбонатов и пепсиногена С-волоками желудочных ветвей субдиафрагмального блуждающего нерва	196
3.6.3 Влияние десенситизации первичных афферентов с помощью КАПС на секреторную реакцию желудка, вызванную электрическим раздражением блуждающего нерва	198
3.6.4 Слабая ирритация слизистой оболочки желудка потенцирует секрецию, вызванную раздражением вагуса, роль нитрергического и простагландинового опосредования	204
4. ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ	208
4.1. Ирритация – постоянный фактор пищеварения.....	208
4.1.1 Секреция HCO_3^- в желудке возникает в ответ на колебания полостной кислотности и осмотического давления в физиологических пределах	209
4.1.2 Реакция на ирритацию зависит от градиента рН на поверхности ..	210
желудочного эпителия.....	210
4.2 Роль изоформ конститутивной синтазы оксида азота в управлении желудочной секрецией на фоне слабой ирритации СОЖ.....	213
4.2.1 Изоформы cNOS оказывают разнонаправленное действие на желудочную секрецию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена в покое и на фоне ирритации СОЖ.....	213

4.2.2 Действие изоформ cNOS на секрецию HCO_3^- зависит от эндогенной продукции кислоты и концентрации бикарбонатов в желудочном кровотоке	219
4.3 Капсаицин-чувствительные первичные афференты – основное звено в управлении секрецией бикарбонатов и пепсиногена в желудке при слабой ирритации СОЖ; роль TRPV1 рецепторов.....	223
4.4 Слабая ирритация слизистой оболочки желудка потенцирует секрецию, вызванную раздражением вагуса; роль нитреергической и простагландиновой системы	228
4.5 Роль изоформ cNOS в регуляции кровотока в желудке в базальных условиях и на фоне ирритации слизистой оболочки	233
4.6 Взаимодействие нитреергической и простагландиновой систем при регуляции желудочной секреции бикарбонатов и пепсиногена, вызванной ирритацией СОЖ	237
Заключение.....	241
Выводы.....	247
ЛИТЕРАТУРА	250
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	305
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ДИСПЕРСИОННОГО АНАЛИЗА; ГЛАВНЫЕ ЭФФЕКТЫ	307

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Согласно сохраняющему свою актуальность положению фундаментальной гастроэнтерологии патогенез эрозивных и язвенных поражений верхних отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в общем виде сводится к нарушению равновесия между факторами кислотно-пептической агрессии желудочного содержимого и элементами защиты слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки (Shay, Sun, 1968). Физиологической нормой, в условиях которой слизистая оболочка желудка (СОЖ) поддерживает или быстро восстанавливает структуру и функции, является кислая реакция содержимого (до 0.15 М HCl), протеолитическая активность пепсина и повышенное осмотическое давление. СОЖ также периодически испытывает действие желчных кислот, высокой температуры, нестероидных противовоспалительных препаратов, продуктов жизнедеятельности бактерии *Helicobacter pylori* и других токсинов (Laine et al., 2008; Tarnawski et al., 2012; Palileo, Kaunitz, 2011). Современные представления о защитных процессах в СОЖ базируются на концепции защитного барьера Ф. Холландера (Hollander, 1954), т.е. системы местных протективных факторов слизистой оболочки, включающей три уровня: преэпителиальный (слизисто-бикарбонатный слой), эпителиальный (покровный эпителий, гистологический барьер) и микроциркуляторное русло, которое относят к субэпителиальному уровню (Ивашкин и др., 2016). Развитие концепции защитного барьера сопровождалось выявлением множества факторов, предохраняющих эпителий от агрессивных воздействий полостного содержимого, а именно, секреции на поверхность СОЖ слизистых мукополисахаридов и ионов бикарбоната (гидрокарбоната), SH-содержащих эндогенных субстанций (L-цистеина, D,L-метионина, глутатиона), пептидов трилистника, белков теплового шока, поддержания кровотока и

[Type here]

восстановления эндотелия в кровеносных сосудах подслизистого слоя, ускоренной пролиферации клеток пришеечной зоны желудочных желез и т.д. (Ивашкин и др., 2020; Szabo, 2014; Tarnawski et al., 2013).

Этапным событием в изучении барьерной функции в желудке стало открытие паракринных механизмов ее контроля, приведшее к появлению теории цитопротекции А. Робера и соавт. Цитопротекция определялась ими как способность фармакологических агентов, первоначально простагландинов (ПГ), предотвращать поражение слизистой оболочки желудка и кишечника экзогенными химическими или физическими агентами (Robert et al., 1978). После демонстрации цитопротективного эффекта наномолярных доз ПГ было выявлено защитное действие ряда других субстанций: факторов роста тканей, гастрина, холецистокинина, тиротропин-релизинг гормона, бомбезина, кортикотропин-релизинг гормона, пептида YY, нейрокинина А, соматостатина, лептина, оксида азота, агонистов аденозина и т.д. (Laine et al., 2008; Brzozowski, 2012; Palileo, Kaunitz, 2011).

Термин цитопротекция в его исходном понимании объединяет далеко не все защитные реакции СОЖ. Еще в ранних работах было установлено, что главный фактор защиты, простагландины, способствуют заживлению только глубоких геморрагических поражений. Они предотвращают острое повреждение сосудистого эндотелия и последующее кровотечение, но не препятствуют неизбежной гибели части клеток желудочного эпителия (Szabo et al., 1985; Szabo, 2014). Усиление кровотока в подслизистом слое в присутствии цитопротекторов и увеличение проницаемости капилляров способствует быстрому восстановлению повреждённых участков поверхностного эпителия и сохранению структуры подслизистого слоя, в связи с чем ряд авторов вслед за С. Контуреком заявили, что более уместно рассматривать защитную реакцию органа в целом, т.е. гастропротекцию (Konturek, 1986). Современное определение гастропротекции было дано на 7-ом Международном симпозиуме по клеточным/тканевым повреждениям и

[Type here]

цито/огранопротекции на примере желудочно-кишечного тракта. В соответствии с ним гастропротекция – это сохранение субэпителиальных эндотелиальных клеток и микроциркуляции, обеспечивающее выживание фовеолярных клеток слизистой оболочки желудка, их способность к миграции и пролиферации, что в совокупности поддерживает адекватную репарацию эпителиальных клеток поверхностного слоя слизистой оболочки (Takeuchi, Szabo, 2013).

Базовый механизм гастропротекции рассматривался ведущими специалистами достаточно узко, как локальное не связанное с подавлением секреции кислоты влияние ПГ и других агентов: оксида азота, кальцитонин ген-родственного пептида (КГРП), глюкокортикоидов, глутатиона,- направленное против эндоваскулярных поражений и агрегации тромбоцитов и лейкоцитов, т.е. на усиление кровотока в пораженном участке (Szabo et al., 1985). Эти реакции приводят к увеличению секреции слизи и бикарбонатов, ускорению пролиферации эпителиальных клеток, которые рассматривается в классической концепции как вторичные процессы (Szabo, 2014). Точка зрения других авторов (Takeuchi, 2010), включавших изменение состояния щелочного барьера на поверхности СОЖ в процесс адаптивной гастропротекции, представляется более перспективной, поскольку комплексная характеристика протективных реакций является актуальной фундаментальной и прикладной задачей в связи с постулируемой медиками необходимостью междисциплинарного подхода к терапии кислотозависимых заболеваний и повышения ее эффективности (Гриневич и др., 2020).

Успешно развивавшиеся в 20 веке методы терапии эрозивных и язвенных поражений верхних отделов ЖКТ были направлены против основных агрессивных факторов, секреции кислоты и колонизации СОЖ бактерией *Helicobacter pylori*. Массовое применение ингибиторов протонной помпы (ИПП) и антибиотиков привело к снижению тяжести течения язвенной болезни желудка и ДПК, но частота встречаемости поражений СОЖ

[Type here]

оставалась на относительно постоянном уровне (Заболеваемость всего населения России в 2018 г. Статистические материалы Минздрава России. М. 2018. 101 с.). Отмечено также увеличение частоты осложнений язвенной болезни, связанных с растущим приемом нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП; Lau et al., 2011). В связи с этим заметно возрос интерес исследователей и практиков к сохранению и восстановлению резистентности слизистой оболочки ЖКТ. Усиление защитных свойств слизистого барьера в настоящее время рассматривается как существенный компонент лечения гастроэзофагеальной рефлюксной болезни, язвенной болезни и гастропатии, вызванной приемом НПВП (Ивашкин и др., 2016). Для повышения эффективности основных схем лечения и поддержания ремиссии при эрозивно-язвенном поражении в качестве вспомогательного средства предлагаются различные препараты, оказывающие защитное действие на гастродуоденальную слизистую оболочку, в частности донаторы сульфгидрильных групп, простагландины, нейропептиды, НПВП ассоциированные с донорами NO (Мараховский, Мараховский, 2018; Ивашкин и др., 2020; Muscara, Wallace, 1999; Brzozowski et al., 2008). Некоторые из них используются в клинике.

Важнейшим механизмом защиты СОЖ является продукция муцина и бикарбонатов. Постоянно обновляющийся щелочной барьер на поверхности желудочного эпителия в норме формирует достаточную преграду для диффузии кислоты в СОЖ. В настоящее время усилиями нескольких лабораторий сформировано общее представление о паракринных и медиаторных путях регуляции секреции бикарбонатов в желудке. Наиболее подробно исследованы простагландиновые механизмы и роль капсаицин-чувствительных первичных афферентных нервных окончаний (Synnerstad et al., 2001; Takeuchi et al., 2010a, 2014; Aihara et al., 2005a). В то же время ряд принципиальных вопросов, касающихся формирования защитного бикарбонатного барьера на поверхности СОЖ, остается неизученным. Прежде

всего отсутствуют прямые экспериментальные доказательства связи эндогенной продукции кислоты в желудке и формирования бикарбонатного барьера, что объясняется методическими особенностями проводившихся до последнего времени исследований. Практически во всех предшествующих работах секреция HCO_3^- оценивалась с помощью метода обратного титрования желудочного сока (Odes et al., 1992). Для выяснения связи секреции HCO_3^- и H^+ этот метод, очевидно, непригоден, поскольку требует создание искусственного анацидного состояния. Актуальность проблемы взаимодействия эндогенной секреции кислоты и защитных механизмов СОЖ с практической точки зрения обосновывается широким применением ИПП, которые являются наиболее часто назначаемым классом препаратов для лечения кислотозависимых заболеваний ЖКТ и характеризуются высокой избирательностью действия и минимальными побочными эффектами (Thomson et al., 2010).

Увеличение в здоровой СОЖ активности циклооксигеназы 1 (ЦОГ-1) и конститутивных синтаз оксида азота (сNOS) описывается в литературе как главный механизм гастропротекции (Ko, Cho, 1999). Гастропротективное действие оказывают малые (не влияющие на секрецию кислоты) дозы не только экзогенных ПГ, но и экзогенного NO (Wallace, Miller, 2000). В то же время роль эндогенного NO в управлении желудочной секрецией бикарбонатов, в том числе связанной с раздражением СОЖ, остается малоизученной и отчасти спорной. Нитергическая регуляция секреции бикарбонатов в желудке представляет собой сложный многоуровневый процесс. Изоформы кальций кальмодулин зависимой сNOS, а именно, эндотелиальная (eNOS) и нейрональная (nNOS) синтазы, экспрессируются практически во всех типах клеток желудочного эпителия и подслизистого слоя, но распределены в тканях желудка неравномерно, с чем связывают их разнонаправленное влияние на ulcerogenesis и гиперемия СОЖ (Kato et al., 2009; Raimura et al., 2013). При этом специфичность влияния eNOS и nNOS на

состояние защитного бикарбонатного барьера в желудке до сих пор экспериментально не исследовалась.

Малоизученным остается вопрос о взаимодействии нитрергической и простагландиновой систем при осуществлении реакций гастропротекции. Известно, что в СОЖ и в подслизистом слое не происходит полного перекрывания сайтов, экспрессирующих cNOS и ЦОГ-1, что повышает физиологическую значимость взаимодействия NOS/ЦОГ. В железистых, обкладочных и слизистых клетках пилорических желез ЦОГ-1 представлена слабо, и что обращает на себя внимание, фермент не встречается в поверхностных эпителиальных клетках желудка (Tatsuguchi et al., 2000), в которых обильно присутствует NOS (Brown et al., 1992; Byrne et al., 1997). Взаимодействие между NOS и ЦОГ происходит на разных этапах регуляции работы ферментов, включая влияние на доступность субстрата, изменение каталитической активности самих ферментов, их транскрипции и трансляции. Взаимное влияние NO и ЦОГ-1 может осуществляться через связанные с ними ферментативные сигнальные каскады, главным образом через взаимодействие цАМФ и цГМФ (Tsai et al., 1994). В подслизистом слое желудка во взаимодействие NOS и ЦОГ вовлечены также капсаицин-чувствительные первичные афференты (Horie et al., 2014). Все это в целом позволяет предположить, что в процессе адаптивной гастропротекции секреция HCO_3^- в желудочных поверхностных эпителиоцитах зависит от взаимодействия NO/ЦОГ-1. Эти данные, наряду с их фундаментальной важностью, актуальны для развития потенциала НПВП. Известный прогресс в терапевтическом использовании способности NO функционально замещать ПГ нашел отражение в разработке группы селективных ингибиторов ЦОГ-2, конъюгированных с донором NO (Bennett et al., 2005). Оксид азота снижал связанный с отсутствием ПГ риск инфаркта миокарда, инсульта, сердечной недостаточности и гипертензии, задержки заживления желудочных язв, торможения клеточной пролиферации и ангиогенеза (Chan et al., 2005; Mizuno

et al., 1997). В то же время механизм действия доноров NO на фоне блокады ЦОГ не вполне понятен, если отсутствуют сведения о роли нарушенных связей NO/ЦОГ.

Пепсин, секреция которого в условиях ирритации также была проанализирована в работе, представляет собой существенный фактор агрессии. При его большой концентрации на фоне секреции кислоты возникают особенно тяжелые поражения, для которых характерно разрушение на обширных участках пристеночного слоя слизи, нарушение реэпитализации и формирования мукоидного купола над местом поражения (Allen et al., 1986; Silen, Ito 1985; Sellers et al., 1987).

Цели и задачи исследования. Целью проведенного исследования было комплексное изучение роли нитрергической системы в регуляции гастропротективных реакций, возникающих в ответ на слабую ирритацию СОЖ.

В рамках работы были решены следующие экспериментальные задачи:

1. Исследовано состояние защитного бикарбонатного барьера на поверхности слизистой оболочки и изменение органного кровотока, происходящие в желудке в ответ на полостное воздействие кислым раствором с повышенным осмотическим давлением.
2. Определено влияние собственной секреции кислоты в желудке на состояние бикарбонатного барьера, в том числе на транспорт бикарбонатов из подслизистого слоя на поверхность эпителия.
3. Выяснено значение нитрергической регуляции в формировании защитного бикарбонатного барьера и других реакций экзокринной секреции, а также в поддержании органного кровотока на фоне слабой ирритации СОЖ. Определено специфическое влияние блокады нейрональной и эндотелиальной изоформ NOS, а также экзогенного NO на реализацию указанных реакций при разном уровне секреции кислоты в желудке.

4. Установлена роль капсаицин-чувствительных первичных афферентных нервных окончаний в желудке в управлении активностью nNOS и eNOS.
5. Оценена степень взаимодействия нитрергической и простагландиновых систем в желудке при раздражении слизистого эпителия.

Методология и методы

Для решения поставленных задач была проведена комплексная количественная оценка экзокринной желудочной секреции (кислоты, бикарбонатов и пепсиногена) и органного кровотока у крыс в условиях полостной перфузии органа растворами различной кислотности и осмотического давления. Впервые в исследованиях гастропротекции применен метод измерения концентрации бикарбонатов в кислых растворах, а именно в условиях естественной ацидификации желудка (Золотарев и др., 1996). С помощью лазерной доплеровской флоуметрии регистрировался кровоток в железистой части тела желудка. Кроме того, произведены макроскопические измерения зон гиперемии СОЖ и оценка степени эрозивного поражения. На основе измерений базальной и стимулированной секреции кислоты в желудке была решена задача адекватного экспериментального моделирования «щелочного прилива», которая остается актуальной до сих пор, т.к. доступная литература не содержит необходимых сведений.

Для оценки механизмов регуляции желудочной секреции в условиях химического раздражения СОЖ использована химическая блокада активности ферментов и рецепторов, а также электрическое раздражение желудочных ветвей субдиафрагмального отрезка блуждающего нерва. В работе впервые проведена сравнительная оценка роли отдельных изоформ конститутивной NOS в управлении желудочной секрецией и кровоснабжением в условиях слабой раздражения СОЖ, для чего использован селективный блокатор nNOS 7-

нитроиндазол и неселективный блокатор обеих изоформ cNOS N ω -нитро-L-аргинин.

Положения, выносимые на защиту

1. Физиологический уровень кислотности и осмотическое давление близкие к показателям желудочного химуса при пищеварении являются достаточными стимулом для запуска реакций гастропротекции, включая усиление бикарбонатного барьера на поверхности слизистой оболочки желудка и увеличение органного кровотока.
2. Нитрергическая система желудка в условиях слабой ирритации слизистой оболочки функционирует как основной паракринный модулятор простагландиновых и холинергических вагусных влияний на состояние защитного бикарбонатного барьера, а также на кровообращение в подслизистом слое. В реакции участвуют как нейрональная, так и эндотелиальная изоформы NOS, локализованные интрамурально и не относящиеся к неадренергическим и нехолинергическим эфферентным нервным волокнам.
3. Изоформы конститутивной синтазы оксида азота опосредуют разнонаправленные влияния на транспорт HCO_3^- из подслизистого слоя на поверхность желудочного эпителия. Активация нейрональной синтазы (nNOS) обуславливает значительное усиление работы котранспортеров $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBCe-1,-2) и секрецию HCO_3^- , вызванную ирритацией СОЖ, а также потенцирует холинергические вагусные воздействия на секреции HCO_3^- . Избирательная стимуляция эндотелиальной синтазы (eNOS) приводит к ослаблению продукции HCO_3^- .
4. Усиление базального кровотока в подслизистом слое желудка под действием eNOS ограничивает трансэпителиальный перенос HCO_3^- в условиях сохраненной фоновой секреции H^+ , либо повышенной концентрации HCO_3^- в кровеносном русле. Подавление секреции кислоты с помощью ингибиторов протонной помпы приводит к сокращению эффекта eNOS. Избирательная

стимуляция nNOS на фоне ирритации слизистой оболочки желудка потенцирует транспорт HCO_3^- на люминальную поверхность эпителия независимо от эндогенной кислотности и концентрации HCO_3^- в подслизистом слое желудка.

5. Регуляция секреции HCO_3^- при слабой ирритации слизистой оболочки желудка зависит от влияния конститутивной NOS на циклооксигеназу (ЦОГ) и синтез простагландинов. Активирующий эффект nNOS полностью реализуется через взаимодействие растворимой гуанилатциклазы с ЦОГ. Блокада ЦОГ усиливает действие eNOS. Потенцирующее влияние nNOS/NO на вагусное холинергическое усиление продукции HCO_3^- и H^+ в условиях ирритации слизистой оболочки не связано с синтезом простагландинов.

6. Нитрергическое усиление секреции HCO_3^- в ответ на ирритацию СОЖ зависит от локальной реакции капсаицин-чувствительных первичных афферентных нервных окончаний. В то же время действие протонов на рецептор переменного потенциала ванилоидный 1-го типа, локализованный в капсаицин-чувствительных афферентах, оказалось недостаточным стимулом для запуска секреции HCO_3^- .

Научная новизна исследования

Впервые в комплексном исследовании экспериментально подтверждено, что локальные нитрергические и простагландиновые реакции, направленные на поддержание защитного бикарбонатного барьера на поверхности СОЖ и кровотока в подслизистом слое, являются постоянными факторами пищеварения в здоровой СОЖ.

Проведен приоритетный анализ специфического участия изоформ конститутивной синтазы оксида азота (eNOS и nNOS) в регуляции желудочной секреции HCO_3^- , H^+ и пепсиногена. Обоснованы клеточный и органный механизмы такого влияния в базальных условиях и при слабой ирритации слизистой оболочки органа. Впервые продемонстрирована зависимость эффекта eNOS на секрецию бикарбонатов от собственной

продукции кислоты в желудке, а также от концентрации NaHCO_3 в желудочном кровотоке.

Впервые изучена зависимость эффектов nNOS либо eNOS от простагландиновой системы при регуляции секреции HCO_3^- и кровотока в желудке на фоне слабой ирритации СОЖ. Установлено влияние капсаицин-чувствительных первичных афферентов и, в частности роль TRPV1 мембранных рецепторов в регуляции активности nNOS и eNOS.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа развивает и уточняет положения теории гастропротекции, предоставляя новые данные о роли nNOS и eNOS в формировании защитного бикарбонатного барьера на поверхности желудочного эпителия и регуляции кровотока в стенке органа на фоне слабой ирритации. Оценка скорости секреции бикарбонатов в зависимости от степени вазодилатации, а также от концентрации бикарбонатов в подслизистом слое дополняет концепцию «барьера тканевого разведения», указывая на различие механизмов защиты СОЖ в зависимости от величины органного кровотока.

Полученные приоритетные данные углубляют представление о балансе кислотно-пептической агрессии и факторов защиты при поддержании структурно-функциональной целостности СОЖ, выявляя механизм, связывающий секрецию кислоты и транспорт бикарбонатов на поверхность эпителия. Для решения этой задачи была усовершенствована техника эксперимента, что позволило оценивать секрецию бикарбонатов на фоне естественной продукции кислоты в желудке.

В настоящее время усиление слизисто-бикарбонатного барьера рассматривается как существенный компонент лечения кислотозависимых заболеваний верхних отделов ЖКТ, что обосновывает практическую значимость работы в целом. Новые данные о зависимости секреции бикарбонатов от действия ингибиторов протонного насоса могут использоваться для уточнения схем лечения и поддержания ремиссии при эрозивном и язвенном поражении, что актуально в связи с широким

применением этого класса препаратов. Также полученное в работе доказательство тесного взаимодействия nNOS с циклооксигеназой актуально для развития терапевтического потенциала нестероидных противовоспалительных препаратов, конъюгированных с донорами оксида азота.

Апробация работы

Материалы исследования были представлены на: Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», посвященной 95-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 9-11 декабря 2020 г.; XVI Всероссийской конференции «XVI Собрание по эволюционной физиологии имени академика Л.А. Орбели», Санкт-Петербург, 19-22 октября 2020 г.; Всероссийской конференции, посвященной 170-летию со дня рождения И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 24–26 сентября 2019 г.; 20-м Юбилейном Междунар. Мед. Славяно-Балтийском научном съезде «Санкт-Петербург – Гастро-2018» и XIX Съезде Общества гастроэнтерологов России, Санкт-Петербург, 16-18 мая 2018 г.; Санкт-Петербургском научном форуме, посвященном 100-летию Физиологического общества им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 17–19 апреля 2017 г.; XXIII съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова, посвященном 100-летию Физиологического общества им. И.П. Павлова, Воронеж, 18-22 сентября 2017; Всероссийском симпозиуме «Фундаментальные и прикладные аспекты физиологии пищеварения и питания», посвященном 90-летию со дня рождения академика А.М. Уголева, Санкт-Петербург, Россия, 15–17 марта 2016 г.; 15-ом Юбилейном съезде научного общества гастроэнтерологов России «Гастро-2015». Санкт-Петербург, 25-27 мая 2015 г.; VIII Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 220-летию со дня рождения академика К.М. Бэра «Механизмы функционирования висцеральных систем». Санкт-Петербург, Россия. 25-28 сентября 2012 г.; 6th

International Symposium On Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (Focus on GI Tract), St. Petersburg, Russia, 12-14 October 2011; XIV международном совещание и VII школе по эволюционной физиологии, Санкт-Петербург, 24 - 29 октября 2011 г.; XXI съезде Физиол. общества им. И.П. Павлова, Калуга, 19-25 сент. 2010 г.; XX съезде Физиол. общества им. И.П. Павлова, Москва, 4-8 июня 2007 г.; V Всероссийской конф. с межд. участием, посвященной 100-летию со дня рожд. В.Н. Черниговского «Механизмы функционирования висцеральных систем», Санкт-Петербург, 16-19 октября 2007 г.; Всероссийском симп. с междунар. участием «Гормональные механизмы адаптации», Санкт-Петербург, 3-5 октября 2007 г.; Всероссийской конф. с междунар. участием «Актуальные проблемы физиологии пищеварения и питания», посвященной 80-летию акад. А.М. Уголева. Санкт-Петербург, 3-5 октября 2006 г.; VI Всероссийской конф. «Механизмы функционирования висцеральных систем», Санкт-Петербург, 4-6 октября 2005 г.; XIX съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова. Екатеринбург, октябрь 2004 г.; III Всероссийской конф. «Механизмы функционирования висцеральных систем», Санкт-Петербург, 2003 г.; XIX Всероссийской научной конференции «Физиология и патология пищеварения», Сочи, 2003 г.

Личный вклад диссертанта

Все экспериментальные результаты получены лично диссертантом либо при его решающем непосредственном участии. Постановка и обоснование целей и задач работы проведены автором самостоятельно на основе анализа литературы и результатов предварительных экспериментов в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий (ГП-14, раздел 64). Автор сформулировал новое направление исследования - оценку роли изоформ конститутивной NOS (нейрональной и эндотелиальной) в регуляции экзокринной секреции и кровотока в желудке в

[Type here]

условиях слабой ирритации СОЖ. Развитие этого направления опиралось на проведенную автором разработку и верификацию экспериментальной системы для непрерывной количественной оценки рН и PCO_2 в желудочном полостном перфузате, что позволило получить приоритетные данные о состоянии защитного бикарбонатного барьера при сохраненной собственной секреции кислоты в желудке. Автор самостоятельно провел обработку основного объема результатов. Интерпретация данных представлена автором в публикациях в рецензируемых изданиях, рукопись которых он готовил самостоятельно.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 52 научные работы, включая 22 статьи в рецензируемых журналах (16 оригинальных и 6 в переводе).

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов экспериментальных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы. Список литературы включает 665 источников, в том числе 23 на русском языке. Диссертация изложена на 325 страницах, содержит 45 рисунков, 1 таблицу и 2 приложения.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Адаптивная гастропротекция и барьерная функция желудочного эпителия

1.1.1 Понятие гастропротекции

Более 200 лет в центре внимания исследователей находится вопрос, как верхние отделы ЖКТ сохраняют свою целостность, несмотря на неблагоприятные воздействия, которые не выдерживают другие ткани организма. Ранняя гипотеза, предложенная Дж. Хантером в 1772 г. и в последствии развитая Р. Вирховым (1853), предполагала, что кровь, имеющая значительную буферную емкость, нейтрализует диффундирующую из полости желудка кислоту (Laine et al., 2008). Важнейшим наблюдением, прояснившим структуру защитных процессов в желудке, было описание В. Бьюмонтом в 1833 г. постоянно присутствующего на поверхности желудочного эпителия и непроницаемого для пепсина слоя слизи (Werther 2000). На этих положениях строилась теория так называемого однокомпонентного желудочного защитного барьера, доминировавшая до 1950-х годов. Позднее в 1954 г. Ф. Холландер описал двухкомпонентный защитный барьер в желудке, как самообновляющуюся систему, состоящую из эпителиального клеточного слоя и секретируемой на его поверхность слизи (Hollander 1954). Дальнейшее развитие концепции многокомпонентного желудочного защитного барьера позволило выявить разнообразные механизмы защиты эпителия от агрессивных воздействий полостного содержимого, а именно секрецию на поверхность СОЖ ионов бикарбоната (гидрокарбоната), пептидов трилистника, белков теплового шока, поддержание кровотока и восстановления эндотелия в кровеносных сосудах подслизистого слоя, ускоренную пролиферацию клеток пришеечной зоны желудочных желез и т.д. (Laine et al., 2008).

Этапным событием в изучении защитной функции СОЖ было открытие Дж. Вейном подавления синтеза простагландинов аспирином (Vane, 1971),

[Type here]

которое в 1970-80-е годы было развито А. Робером и соавт. (Robert et al., 1978) в теорию цитопротекции. Цитопротекция определялась как способность фармакологических агентов, первоначально простагландинов (ПГ), предотвращать поражение СОЖ и кишечника разнообразными ulcerогенными агентами, такими как аспирин, индометацин, соли желчных кислот, а также некротизирующими агентами, включая воду высокой температуры, абсолютный этанол, соляную кислоту, гидроксид натрия. Предварительное введение малых доз неметаболизируемого аналога простагландина E₂ (16,16 диметил простагландина E₂) за 15-30 мин до аппликации поражающего агента в значительной мере ослабляло некроз (Robert et al., 1978). Важно отметить, что использованные наномолярные дозы ПГ не подавляли секрецию кислоты, т.е. механизм цитопротекции не тождественен угнетению секреции кислоты (Tarnawski, Hollander, 1987). После демонстрации цитопротективного эффекта ПГ было выявлено защитное действие ряда других субстанций: факторов роста тканей, гастрина, холецистокинина, тиротропин-рилизинг гормона, бомбезина, кортикотропин-рилизинг гормона, пептида YY, нейрокинина А, соматостатина, лептина, оксида азота, агонистов аденозина и др. (Laine et al., 2008; Brzozowski, 2012; Palileo, Kaunitz, 2011).

Термин «цитопротекция» в его исходном понимании объединяет далеко не все защитные реакции СОЖ. Еще в ранних работах было установлено, что главный фактор защиты, простагландины, способствует заживлению только глубоких геморрагических поражений, мало затрагивая эрозивное повреждение поверхностного эпителия (Szabo, 2014). Поскольку сохранение кровотока в подслизистом слое способствует быстрому заживлению в целом, ряд авторов вслед за С. Контуреком посчитали более уместным рассматривать реакцию органа, т.е. гастропротекцию (Konturek, 1986).

По мере развития исследований явление гастропротекции стали рассматривать шире, в частности, как естественный, а не только

фармакологический процесс. В результате были описаны подтипы этой реакции: заместительная, непосредственная и адаптивная гастропротекция. В случае поражения СОЖ нестероидными противовоспалительными препаратами заместительная гастропротекция может быть достигнута путем введения экзогенных ПГ, восполняющих дефицит ПГ. Так называемая непосредственная гастропротекция наблюдается на фоне действия поражающих факторов, отличных от НПВП, таких как концентрированный этанол, кислоты или основания. Эти агенты разрушают мембраны эпителиальных клеток, не блокируя синтез ПГ в пораженном участке. В этом случае дополнительная доза ПГ также препятствует развитию поражений (Szabo, 2014).

Основной фундаментальный и практический интерес в контексте данной работы вызывает третий подтип реакций - адаптивная гастропротекция, которая объединяет естественные процессы, повышающие устойчивость СОЖ. Реакции адаптивной гастропротекции развиваются в ответ на слабую ирритацию слизистой оболочки (Robert et al., 1983; Takeuchi et al., 2001a) и характеризуются большим разнообразием. Термин слабая ирритация введен, скорее всего, Ф. Холландером и подразумевает воздействие на СОЖ субпороговыми дозами ульцерогенных веществ, что усиливает защитные механизмы эпителия и уменьшает степень воспаления при последующих повреждающих воздействиях (Hollander et al., 1946). В основе реакций адаптивной гастропротекции лежит активность циклооксигеназы-1 (ЦОГ-1) и синтез ПГЕ₂ и ПGI₂ (Konturek et al., 1982; Takeeda et al., 2004), а также относительно независимое от ПГ локальное выделение кальцитонин ген-родственного пептида (КГРП) из капсаицин-чувствительных первичных афферентных окончаний (КЧПА) и продукция оксида азота (Aihara et al., 2005a).

Адаптивная гастропротекция представляет комплексный процесс, связанный с действием паракринных факторов и медиаторов в нескольких

тканевых слоях. Более того, реакция не ограничивается локальными взаимодействиями, но зависит также от вагусной и спланхнической иннервации желудка (Foschi et al., 1989). Базовый механизм адаптивной гастропротекции рассматривается ведущими специалистами в данной области достаточно узко, как локальное влияние ПГ и других агентов (оксида азота, КГРП, глюкокортикоидов, глутатиона), направленное против эндоваскулярных поражений и агрегации тромбоцитов и лейкоцитов. Гистологические исследования с использованием сосудистых маркеров подтвердили, что первичным сигналом для запуска реакции стоит считать эндотелиальные изменения, поскольку они возникают практически сразу, в течение 1-5 мин, после действия ульцерогенного фактора (Szabo et al., 1985). Эти реакции приводят к усилению барьерной функции СОЖ, к которой относят увеличение секреции слизи и бикарбонатов, и угнетение продукции кислоты. Необходимо отметить, что классическая концепция адаптивной гастропротекции, рассматривает все реакции кроме сосудистых как вторичные (Szabo, 2014). Точка зрения других авторов (Takeuchi, 2010), включающих усиление щелочного барьера на поверхности СОЖ в реакции адаптивной гастропротекции, представляется более перспективной, поскольку ориентирует на поиск механизмов взаимодействия сосудистых, секреторных и пролиферативных механизмов защиты желудочного эпителия.

1.1.2 Барьерная функция слизистой оболочки желудка

Среди гастропротективных (барьерных) механизмов СОЖ принято выделять иерархически организованные презпителиальные, эпителиальные и подслизистые (субэпителиальные) реакции (Tarnavski et al., 2013).

1.1.2.1 Презпителиальные факторы гастропротекции

Слизисто-бикарбонатно-фосфолипидный слой на поверхности желудочного эпителия формирует наружный защитный барьер, который, постоянно обновляясь в здоровой СОЖ, сохраняет свою устойчивость.

[Type here]

Поскольку на этот слой направлено первичное деструктивное действие полостного содержимого, его можно рассматривать как главную и в норме достаточную динамическую защиту желудочного эпителия от поражения кислотой. Слизь и фосфолипиды, активно секретируются клетками поверхностного эпителия (Wallace, Granger, 1996). Толщина слизи в антральной зоне у человека 50-100 мкм, у крыс – 90-160 мкм (Allen, Flemstrom, 2005). Желеобразную структуру и вязкость преэпителиальной слизи придают гликопротеины, составляющие 3-5%, остальные 95% приходятся на воду и небольшое количество солей, липидов, нуклеиновых кислот и белков, включая иммуноглобулины. Гликопротеины слизи, муцины, представляют собой крупные молекулы ($5-45 \times 10^6$ Da), состоящие из мультимерных единиц весом $2-3 \times 10^6$ Da. В молекуле выделяют пептидное ядро, окруженное цепями гликанов, которые ограничены с обоих концов протеинами, обогащёнными цистеином. Последние образуют дисульфидные мостики между муциновыми единицами, собирая из них макромолекулы. Из 4-х структурных разновидностей муцина, представленных в ЖКТ, в желудке присутствуют MUC5, экспрессированный в поверхностных слизистых клетках тела, дна и привратника, и MUC6, обнаруженный в слизистых пришеечных клетках желез дна и привратника (Allen, Flemstrom, 2005).

Заметную роль в структурировании и стабилизации слизистого геля, а также в пролиферации СОЖ играют пептиды трилистника, которые обнаруживаются во внутриклеточных везикулах, содержащих муцин. Одна разновидность пептидов трилистника (TFF1) секретируется в желудке совместно с муцином MUC5, а пептид TFF2 - вместе с MUC6 в желудочных железах (Allen, Flemstrom, 2005). Известно, что у человека пептиды трилистника стимулируют миграцию клеток и ускоряют заживление эпителия после повреждений (Hoffmann et al., 2001). У мутантных мышей, лишенных пептида TFF1, наблюдали практически полную утрату слизистого слоя и значительную гиперплазию в антральном и пилорическом отделах желудка

(Lefebvre et al., 1996). Пептид TFF2 отчасти тормозит диффузию H^+ через слизистый слой в желудке свиньи и тем самым ослабляет закисление цитоплазмы желудочных эпителиоцитов *in vivo* (Tanaka et al., 1997).

В слизистом слое велика доля липидов, которая достигает до 25% от сухого веса. Липиды представлены нейтральными жирами, гликолипидами и фосфолипидами (Slomiany et al., 1987). При этом фосфолипиды концентрируются на люминальной поверхности слизи, где формируют сплошной гидрофобный слой (Lugea et al., 1997; Goddard et al., 1990).

Слизь служит физическим барьером, препятствующим проникновению из полости желудка пепсина и других макромолекул и уменьшающим, хотя и незначительно, скорость диффузии протонов (Flemstrom, Isenberg, 2001). Слизь присутствует на поверхности эпителия в двух физических состояниях: слабоадгезивный легко смываемый поверхностный слой и несмываемый малорастворимый слой, прочно соединенный с апикальными мембранами эпителиоцитов. Несмываемая стабильная слизь представляет сплошную пленку в антральной зоне и в теле желудка, но заметно истончается в двенадцатиперстной кишке. Именно плотно прилегающий слой слизи является основной структурой защитного барьера, в то время как поверхностный слабо адгезивный слой расходуется во время пищеварения, выполняя роль лубриканта (Atuma et al., 2001). Плотнo прилегающий слой слизи сохраняет стабильность в широком диапазоне pH (1-8), повышенного осмотического давления (2 М NaCl), в присутствии солей желчных кислот, которые не вызывают его дисперсии и изменения реологических свойств (Bell et al., 1985; Sellers et al., 1988).

Сплошная пленка слизи на поверхности желудочного эпителия, которая в покое закрывает устья желудочных желез, не является преградой для выхода секрета. В активную фазу пищеварения в полости железы давление водно-солевого раствора, содержащего кислоту и пепсин, увеличивается примерно до 5-20 мм рт. ст. (Holm, et al., 1992), и жидкость механически прокладывает в

несмываемом слое временный каналец, по которому изливается в полость органа (Holm, Flemstrom, 1990). Поперечник такого каналца, подкрашенного кислоточувствительным красителем Конго красным, на поверхности желудочного эпителия крысы равнялся 5-7 мкм (Johansson et al., 2000).

Общепринято, что основная функция слизи, прочно соединенной с поверхностью желудочного эпителия, заключается в защите эпителия от некротизирующего действия полостной кислоты. Несмотря на незначительную толщину в несколько десятков микрометров, этот стабильный гель препятствует быстрому соединению HCO_3^- с кислотой. За счет постепенного насыщения слоя слизи с эпителиальной поверхности ионами HCO_3^- и встречной диффузии H^+ формируется кратный 10^6 градиент протонов от $\text{pH} \sim 1.5$ на люминальной поверхности слизи до нейтральной среды на поверхности эпителия. Последнее подтверждено в исследованиях на разных видах позвоночных (Allen, Flemstrom, 2005), причем величина градиента связана с толщиной несмываемого слизистого слоя (Engel et al., 1995; Baumgartner, Montrose, 2004). С применением микроэлектродной техники и неинвазивной конфокальной микроскопии было показано, что градиент pH сохраняется даже при сравнительно большой полостной кислотности (pH 1-3). В то же время, в опытах на крысах увеличение pH в полости органа до 5.0 приводило к извращению градиента кислотности, а именно реакция у мукозной поверхности слизи становилась более кислой, чем у люминальной. Ряд авторов объясняли это явление тем, что при нейтрализации протонов CO_2 выделяется ближе к мукозной поверхности (Garner, Flemstrom, 1978). Также предполагалось, что при $\text{pH} \sim 4$ муцин претерпевает конформационные изменения, влияющие на проницаемость слизи (Chu et al., 1999).

1.1.2.2 Барьерная функция поверхностного эпителия

Второй линией защиты СОЖ вполне очевидно выступает постоянно обновляющийся поверхностный эпителий. Именно эпителиальные клетки

[Type here]

обеспечивают и регулируют состояние презепителиального слоя, секретируя в него HCO_3^- , муцин, пептиды трилистника, синтезируя простагландины и дефензины. Клетки поверхностного эпителия соединены между собой плотными контактами, состоящими из F-актина и E-кадгерина. Молекулы последнего создают избирательную парацеллюлярную проницаемость и тем самым препятствуют обратной диффузии протонов и пепсина. Плотность межклеточных контактов увеличивается под действием эпидермального фактора роста (Tarnawski et al., 2013; Laine et al., 2008). Сам же двойной фосфолипидный слой плазматической мембраны обладает очевидными гидрофобными свойствами (Yandrapu, Sarosiek, 2015).

За счет скоординированной пролиферации клеток поверхностный эпителий обновляется каждые 2-4 дня, сохраняя свою структуру. В желудочных железах одиночные стволовые клетки в результате нескольких делений превращаются в клетки-предшественники, которые дифференцируются в зрелые эпителиоциты (Modlin et al., 2003). При этом клетки-предшественники, перемещаясь из области шейки железы, вытесняют поврежденные или старые эпителиоциты. Реэпителизация и восстановление структуры желез происходит через несколько минут после повреждения. Полная замена поверхностного эпителия длится 3-7 дней, замена желез занимает месяцы (Laine et al., 2008), что определяется факторами роста, которые выделяются мезенхимными клетками. Основные факторы роста, трансформирующий фактор α (TGF- α) и инсулиноподобный фактор-1 (IGF-1), после взаимодействия с эпидермальным рецептором ростовых факторов (EGF-R) стимулируют митоген-активируемую протеинкиназу (Tarnawski, Stachura, 1992; Hritz et al., 2005; Nguyen et al., 2007). Сам пептид EGF отсутствует в здоровой СОЖ. Он поступает в полость желудка из слюнных и пищеводных желез (Laine et al., 2008). Простагландины (PGE_2 и PGI_2) также надо отнести к основным паракринным факторам, стимулирующим пролиферативные процессы (Tarnawski et al., 2012). Простагландин E_2 и гастрин, опосредованно

действуя на EGF-R, увеличивают активность митоген-активируемой протеинкиназы (Pai et al., 2002). Анти-апоптозный пептид, сурвивин, экспрессирующийся в клетках предшественниках, активирует митоз (Chiou et al., 2005). Температура, стресс и цитотоксические агенты стимулируют эпителиальные клетки к выделению белков теплового шока, препятствующих денатурации и улучшающих проницаемость эпителия (Laine et al., 2008).

1.1.2.3 Гастропротективные реакции подслизистого слоя

Защита более глубоких слоев желудочной стенки связана в основном с поддержанием циркуляции в микрососудах. Кровоток в подслизистом слое обеспечивает разбавление, нейтрализацию и удаление как кислоты, диффундировавшей из полости органа, так и проникших токсинов. Эндотелий сосудов пронизан многочисленными перфорациями, но, тем не менее, рассматривается как определенный барьер, организующий направленную диффузию веществ. Эндотелий играет основную роль в регуляции скорости кровотока и, следовательно, питания и дыхания СОЖ (Tarnawski et al., 2012). Именно эндотелиальные клетки являются одними из самых активных продуцентов вазодилататоров, а именно оксида азота и простациклина (ПГ₂), которые не только усиливают кровоток, но противодействуют повреждающему действию вазоконстрикторов, таких как лейкотриен С₄, тромбоксан А₂ и эндотелин, и препятствуют агрегации тромбоцитов и лейкоцитов (Guth, 1992). Защитные свойства эндотелия усиливаются под действием ПГЕ₂, монооксида углерода, тканевого активатора плазминогена, фактора роста эндотелия сосудов и основного фактора роста фибробластов. Эти эндотелиальные факторы уменьшают адгезию тромбоцитов и лейкоцитов, препятствуют тромбообразованию, стимулируют тромболизис, поддерживают кровоснабжение тканей и тем самым защищают стенки сосудов от повреждения (Tarnawski et al., 2012). Синтезирующийся в эндотелии сосудов NO способствует поддержанию щелочной реакции презепителиального бикарбонатного барьера, а также тормозит секрецию

кислоты (Tulassay, Herszenyi, 2010). Сернистый водород – еще один вазодилататор, генерируемый в эндотелии сосудов подслизистого слоя. Он препятствует адгезии лейкоцитов, подавляет экспрессию фактора некроза опухолей α и уменьшает степень поражения в присутствии НПВП (Tulassay, Herszenyi, 2010; Laine et al., 2008).

1.1.3 Нейрогуморальная регуляция барьерной функции СОЖ

Важную интегрирующую роль в поддержании целостности СОЖ играют центральная нервная система (парасимпатическая и симпатическая иннервация, кортикотропин рилизинг гормон, тиреотропин рилизинг гормон, мелатонин) и гормоны ЖКТ (гастрин, холецистокинин, грелин, кортикостероиды) (Tarnawski et al., 2013).

Парасимпатические волокна в составе блуждающего нерва, которые достигают клеток межмышечного и подслизистого нервного сплетения, являются главными регуляторами секреции поражающих факторов, кислоты и пепсиногена. Хорошо известно, что повышенная активность блуждающего нерва, например, при стрессе, увеличивает риск язвообразования. Электрическое раздражение вагуса в эксперименте стимулирует образование геморрагических язв. Ваготомия, в свою очередь, уменьшает повреждения, вызванные сильным стрессом, ацетилсалициловой или соляной кислотой (Ко, Cho, 2011). Вместе с тем, ваготомия, несмотря на свою эффективность для подавления секреции кислоты, в течение более длительного срока может провоцировать язвообразование, а также уменьшать цитопротекторную эффективность синтетических аналогов простагландинов, например, 16, 16-диметил ПГЕ₂ (Henagan et al., 1984; Cho et al., 1992).

С другой стороны, ваго-вагальные рефлексy являются центральным звеном многих реакций адаптивной гастропротекции, вызванных раздражением СОЖ. Показано, что вагусная иннервация необходима для распространения локального протективного эффекта этанола (20%), либо 0.3М HCl, но не 5%

NaCl, с одной стороны СОЖ на противоположную, которая не вступала в контакт с ирритантом. Обеспечивающие подобные реакции ваго-вагальные рефлекторные дуги в качестве сенсорного звена имеют капсаицин-чувствительные нервные окончания. Десенситизация этих афферентов приводит не только к усилению повреждающего действия концентрированного этанола, но полностью отменяет протективное действие предварительной слабой ирритации (Ko, Cho, 2011).

Эфферентным звеном реакции являются преганглионарные холинергические волокна. Как ulcerогенное действие этанола, так и адаптивная гастропротекция, вызванная ирритацией, ослабевали в присутствии блокаторов холинорецепторов (Ko et al., 1994). Ацетилхолин через мускариновые рецепторы активирует продукцию ПГ и NO (Ko, Cho, 2011). Давно известно, что электрическая стимуляция желудочных ветвей блуждающего нерва частотозависимо усиливает продукцию простагландинов в желудке *in vitro*. Хроматографический анализ показал, что при этом выделяются в основном ПГЕ₂ и ПГФ₂. Стимуляция же симпатических волокон не влияет на желудочную продукцию ПГ (Cocceani et al., 1967; Bennett et al., 1967).

Роль симпатической нервной системы в патогенезе язвообразования и в цитопротективных реакциях оценивается по-разному. Блокада α 1-, β 1- и β 2-адренорецепторов никак не сказывалась ни на ulcerогенном действии 100% этанола, ни на защитном эффекте слабой ирритации (Ko, Cho, 1995). С другой стороны, антагонисты α 2-адренорецепторов, которые усиливают выброс катехоламинов из пресинаптических терминалей, усиливают поражающую способность 100% этанола и полностью устраняют цитопротективное влияние 20% этанола, хотя действие 5% NaCl и 0.3 M HCl сохраняется (Ko, Cho, 2011).

Парасимпатические гастропротективные эффекты возникают при активации центральных ядер блуждающего нерва, дорзального вагусного комплекса и ядра одиночного пучка. В продолговатом мозге эти структуры

наиболее плотно иннервируются волокнами, содержащими тиреотропин релизинг гормон (ТРГ). Показано, что центральная инъекция ТРГ усиливает импульсную активность эфферентных волокон вагуса (O-Lee et al., 1997), а также приводит к уменьшению поражений, вызванных внутрижелудочной аппликацией этанола (Tache et al., 1994). Блуждающий нерв, кроме того, опосредует гастропротективное действие ряда других нейропептидов, таких как амилин, адреномедуллин, нейротензин, опиоидные пептиды, мелатонин, грелин, а также каннабиноидов (Gyires et al., 2013; Tache, 2012). Церебровентрикулярное введение малых протективных доз ТРГ активирует капсаицин-чувствительные спланхнические афференты (Adelson et al., 1999) и усиливает локальную секрецию КГРП и NO (Kato et al., 1994).

Практически все эффекты блуждающего нерва в желудке, включая ulcerогенные и протективные, связаны с действием оксида азота, что предопределено многообразием NO продуцирующих клеток, с которыми вступают в контакт пресинаптические и постсинаптические окончания вагуса. Например, в препилорической области NOS присутствует примерно в 20% преганглионарных волокон вагуса, в которых она экспрессируется совместно с холин-ацетилтрансферазой (Gańko, Całka, 2013). Кроме прямого действия на иннервируемые клетки NO может потенцировать холинергическую синаптическую передачу. Исследования на изолированном предсердии выявили фосфорилирующее действие экзогенного NO на пресинаптические кальциевые каналы, за счет чего увеличивался синаптический выброс ацетилхолина и усиливалась брадикардия. Анализ внутриклеточных ферментативных механизмов этого явления показал, что NO усиливает холинергическую трансмиссию через цГМФ – фосфодиэстераза-3-зависимый каскад, усиливающий фосфорилирование пресинаптических Ca^{2+} каналов типа N посредством цАМФ и протеинкиназы A (Herring, Paterson, 2001).

Выделение NO в тканях желудка в ответ на активацию центральных ядер вагуса при интрацистеральной инъекции ТТГ стимулирует секрецию

[Type here]

кислоты (Saperas et al., 1995). Блокада NOS приводила к ослаблению рефлекторной желудочной секреции кислоты, вызванной кормлением (Bilski et al., 1994), либо растяжением желудка (Koduru et al., 1995). С другой стороны, известны и противоположные результаты. В частности, NO является медиатором торможения рефлекторной желудочной секреции, активированной эндотоксином *E. coli* (Barrachina et al., 1995). Действие NO в дорзальном моторном ядре вагуса также играет определяющую роль в торможении секреции кислоты на фоне стресса (Esplugues et al., 1996).

Разнообразные пептиды, включая гастрин 17, холецистокинин, ТРГ, бомбезин, кортикотропин-рилизинг фактор, эпидермальный фактор роста, пептид YY, нейрокинин А оказывают гастропротективное действие, которое прекращается после афферентной денервации, блокады КГРП рецепторов, либо торможения синтеза NO (Laine et al., 2008). Грелин, пептидный гормон, продуцируемый у грызунов желудочными А клетками, а у человека P/D₁ клетками, характеризуется на периферии защитным действием и ускоряет заживление, стимулируя кровоток в подслизистом слое через усиление продукции NO и КГРП (Brzozowski et al., 2005). Заметную потенцирующую роль в защите СОЖ и ускорении ее заживления играют глюкокортикоиды надпочечников. Резкий подъем уровня кортикостерона при стрессе имеет выраженный гастропротективный эффект (Filaretova et al., 1998). Введение глюкокортикоидов приводит к длительному ослаблению выброса кортикостерона при стрессе и стимулирует ульцерогенез в различных экспериментальных моделях (Filaretova et al., 2001). В целом, протективное действие глюкокортикоидов заключается в поддержании гомеостаза глюкозы, желудочного кровотока, снижении проницаемости сосудов и увеличении секреции слизи (Filaretova et al., 2007). Другим защитным механизмом СОЖ при стрессе является активация периферических КРФ2 (кортикотропин релизинг фактор-2) рецепторов и тучных клеток. В частности, в желудке человека активация КРФ2 рецептора приводит к торможению апоптоза.

Периферическая инъекция КРФ или урокортина через КРФ2 рецепторы тормозит моторику и эвакуаторную активность желудка (Laine et al., 2008).

1.2 Апикальный и базолатеральный ионный транспорт в СОЖ

Реакции адаптивной гастропротекции реализуются в значительной мере через изменение ионного транспорта, как в преэпителиальном слое слизи, так и в нижележащих слоях стенки желудка. Для понимания механизмов этих реакций необходимо характеризовать ионные транспортеры в апикальных и базолатеральных мембранах СОЖ. Хотя основные группы ионных транспортеров в СОЖ описаны, их связь с внутриклеточными ферментативными каскадами изучена недостаточно. В частности, привлекающие основное внимание в рамках данной работы молекулярные механизмы обмена бикарбонатов в СОЖ остаются наименее исследованными по сравнению с аналогичными процессами в почечных канальцах, эпителии дыхательных путей, протоках поджелудочной железы и в эпителии ДПК.

1.2.1 Ионный транспорт в обкладочных клетках

Секреция протонов – самый мощный транспортный процесс в СОЖ, оказывающий влияние на перенос других ионов и секрецию ферментов и гормонов. Секреция протонов, наряду с Cl^- и H_2O , осуществляется в желудке оксинтными (обкладочными) клетками. Уникальная функция этих высокоспециализированных клеток отразилась в строении. Кратко, их апикальная плазматическая мембрана, проецирующаяся в полость железы, образует несколько впячиваний в форме канальцев (canaliculi), соединенных анастомозами. Цитоплазма обкладочных клеток насыщена мембранными структурами в виде везикул, тубул и цистерн, экспрессирующих H^+ , K^+ -АТФазу. При активации канальцы существенно увеличиваются в размерах, что еще в XIX веке наблюдал в световой микроскоп К. Гольджи. Активация сопровождается значительным увеличением площади апикальной мембраны

[Type here]

за счет сглаживания микроворсинок (Ito, 1987; Forte et al., 1977) и встраивания цитоплазматических вакуолей, насыщенных белками протонного насоса (Pettitt et al., 1996; Duman et al., 2002).

1.2.1.1 Транспорт протонов через апикальную мембрану обкладочных клеток

Протонный насос, H^+ , K^+ -аденозин трифосфатаза (H^+ , K^+ -АТФаза) – фермент, ответственный за перенос протонов из цитозоля в полость желудочной железы в обмен на ионы калия. В активную фазу секреции pH в полости желудка снижается до чрезвычайно низкой величины ≤ 1 , что говорит о больших затратах энергии на циклические конформационные изменения фермента. Подтверждается это плотностью митохондрий в обкладочных клетках, которая настолько велика, что они занимают до 40% внутреннего объема (Duman et al., 2002).

Протонный насос принадлежит к P2-типу АТФаз, к которому причисляют также Na^+ , K^+ -АТФазу и Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматического ретикулума. Это димер, α -субъединица которого содержит 10 трансмембранных доменов, и образует каталитический сайт, обеспечивающий перенос ионов. Другая β -субъединица представляет собой интегральный гликозилированный пептид. Отдельные протомеры H^+ , K^+ -АТФазы объединяются в группы по 4. Встраивание фермента в апикальную мембрану осуществляется связями α -субъединицы. Углеводные цепи, ассоциированные с β -субъединицей, обеспечивают соединение пептидов и транслокацию фермента. Когда обкладочные клетки находятся в покое, протонный насос, встроенный в мембрану туболовентрикул, также пребывает в неактивном состоянии, причиной чему низкая проницаемость мембран везикул для ионов K^+ . В результате перемещения H^+ , K^+ -АТФазы в плазматическую мембрану в непосредственной близости от фермента увеличивается концентрация K^+ и Cl^- , а сам фермент катализирует электронейтральный обмен протонов на ионы

K^+ , создавая чрезвычайно большой градиент H^+ на апикальной мембране обкладочных клеток (Forte, Soll, 1989).

Транслокация протонного насоса управляется ферментами внутриклеточного трансдукционного каскада, действующими на структурные элементы цитоскелета, факторы присоединения и механизмы слияния липидных слоев: миозин, актин, Rab ГТФазы, эзерин и растворимые N-этилмалеимид-чувствительные рецепторы белка - фактора присоединения, SNAREs (Schubert, 2015).

Присутствие ионов калия в полости железы является необходимым условием для поддержания активности H^+ , K^+ -АТФазы. Выход ионов K^+ на люминальную поверхность в обкладочных клетках обеспечивается главным образом потенциал-зависимыми калиевыми каналами (KCNQ1), относящимися к семейству калиевых каналов входящего выпрямления (Kir) (Kopić, Geibel, 2010). Увеличение внеклеточной концентрации K^+ создает осмотический градиент в плазматической мембране, приводящий к выходу воды в полость железы, что увеличивает объем секрета (Gerbino et al., 2007).

Секреция ионов хлора обеспечивает перенос заряда, противоположного ионам калия, и необходима для образования хлороводородной кислоты. В отличие от транспорта протонов экструзия ионов Cl^- не является АТФ-зависимым процессом. В то же время блокада движения хлора значительно угнетает транспорт протонов (Malinowska, 1990). В апикальной мембране перенос Cl^- происходит через два канала и один ионный транспортер. Это муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости (CFTR), хлорный канал 2-го типа (CIC-2) и Cl^-/HCO_3^- обменный белок SLC26A9. При активации обкладочных клеток секреция ионов Cl^- осуществляется CIC-2 и CFTR. Ионный обменник SLC26A9 в фазу покоя транспортирует Cl^- внутрь клетки, а внутриклеточный HCO_3^- в противоположном направлении (Xu J. et al., 2008). Хлоридная проводимость эффективно регулируется внутриклеточными ферментными каскадами. В частности, проводимость

[Type here]

через CFTR возрастает при повышении концентрации цАМФ. Канал взаимодействует с РКА, РКС, цАМФ активируемой протеин-киназой (Guggino, Stanton, 2006).

1.2.1.2 Функции карбоангидраз в обкладочных клетках

Кислота, которую переносит на поверхность клетки протонный насос при его фосфорилировании, образуется из диоксида углерода под действием карбоангидразы. Карбоангидразы (КА) – это наиболее активная группа цинксодержащих металлоэнзимов. У млекопитающих КА присутствует во всех тканях. Всего идентифицировано 12 активных альфа-карбоангидраз, включая 5 цитоплазматических изоформ, 2 митохондриальные, 1 секреторную и 4 мембранных (Tashian, 1989).

В желудке цитоплазматическая КА (CAII) присутствует в обкладочных клетках, где участвует в генерации протонов (Kivela et al., 2005). Неселективный блокатор карбоангидраз ацетазоламид подавляет секрецию кислоты, вызванную мнимым кормлением или инъекцией пентагастрина (Feldman, Goldschmiedt, 1991). В последнем случае параллельно уменьшался метаболический алкалоз (Regev et al., 2001). В базолатеральной мембране париетальных и поверхностных эпителиальных клеток обнаружена мембранная КА (CA IX) (Pastoreková et al., 1997).

Ранее было установлено присутствие КА на наружной поверхности плазматической мембраны канальцев обкладочных клеток. На цитоплазматической стороне апикальной мембраны КА не была выявлена (Cross, 1970). Продукция кислоты за счет гидратации диоксида углерода требует значительного притока CO_2 в обкладочную клетку. Принято считать, что источником CO_2 , необходимого для секреции кислоты, является тканевая жидкость, что, тем не менее, не подтверждено экспериментально. Оригинальная гипотеза предложена Х. Стиром (Steer, 2009). Согласно ей используемый обкладочными клетками CO_2 появляется в результате декарбоксилирования аминокислот (главным образом аргинина),

происходящего на наружной поверхности канальцев. Этот процесс может быть связан с пепсиногеном II, обнаруженным в канальцах обкладочных клеток. Там же накапливается продукт декарбоксилирования аргинина сильное основание агматин. Присутствие агматина, таким образом, защищает апикальную мембрану обкладочной клетки от разрушения кислотой.

1.2.1.3 Апикальный перенос HCO_3^- в обкладочных клетках

Секреция протонов в обкладочных клетках сопровождается эквивалентными потоками HCO_3^- . Микроэлектродные измерения pH в изолированной СОЖ лягушки выявили защелачивание мукозной поверхности в глубине желез, которое осуществлялось оксинтными клетками на фоне подавления секреции H^+ циметидином (Caroppo et al., 1997; Debellis et al., 1998). Позднее в желудочных железах был обнаружен анионный транспортер SLC26A6, функционирующий как $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (OH^-) обменник, причем локализовался он совместно с H^+ , K^+ -АТФазой (Wang et al., 2002).

Белок SLC26A6 относится к семейству электрогенных $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменников SLC26A (белок-транспортер растворенных веществ, solute carrier transport protein). Эти белки состоят из 10-14 трансмембранных сегментов с ориентированными в цитоплазму С- и N-терминалями. Помимо апикальных мембран обкладочных и эпителиальных клеток желудка транспортер SLC26A6 экспрессируется в эпителии альвеол, бронхов и трахеи, а также в протоках поджелудочной железы и в предстательной железе (Lohi et al., 2002; Xu J. et al., 2005). Важная особенно с методической точки зрения характеристика семейства SLC26A – это угнетение транспортной функции белков производными дисульфонового стильбена, такими как DIDS (4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота) (Romero, 2013).

В обкладочных клетках желудочных желез SLC26A6 встраивается в мембраны секреторных канальцев, где $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ анионный обмен происходит в фазу покоя. Такая локализация SLC26A6 препятствует проникновению кислоты в неактивные тубуловезикулы и вакуоли, отделяющиеся от

секреторных канальцев (Petrovic et al., 2002). При этом активность SLC26A6 никак не связана с цАМФ/ПКА, которые опосредуют усиление секреции кислоты в ответ на действие многих секретогогов (Lohi et al., 2000; Flemstrom, 1994).

Возможно, что в апикальных мембранах обкладочных клеток экспрессируется и другой белок этого семейства, а именно SLC26A9. Его делеция сопряжена с ослаблением продукции кислоты в желудке. Кроме того, у нокаутных животных были заметны нарушения в строении желудочных желез, связанные с деградацией обкладочных клеток и кистозным расширением полости желез, что позволяет предположить участие SLC26A9 в создании потока жидкости, промывающей железы от кислоты и слизи (Xu J. et al., 2008).

Известны единичные публикации о присутствии в обкладочных клетках транспортера AE4 (SLC4A9), который относится к семейству SLC функционально близкому к электронейтральным $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменникам (Xu J. et al., 2003; Tsuganezawa et al., 2001). Интересно, что в отличие от других белков группы электронейтральных анионных обменников этот транспортер малочувствителен к действию DIDS (Parker, Boron, 2013). Предполагается, что скорость переноса Cl^- этим транспортером зависит от концентрации HCO_3^- и Na^+ в цитоплазме (Peña-Münzenmayer et al., 2016).

1.2.1.4 Базолатеральные транспортеры HCO_3^- в обкладочных клетках

Выделение протонов через апикальную мембрану обкладочных клеток сопряжено с появлением в цитоплазме ионов гидроксила (OH^-), которые превращаются в HCO_3^- с помощью внутриклеточной КА, а затем выводятся через базолатеральную мембрану в основном посредством $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ анионных обменников (Flemstrom et al., 1994). Этот процесс имеет первостепенное значение для предотвращения внутриклеточного защелачивания и обеспечения транспорта Cl^- через апикальную мембрану (Flemstrom et al., 1994, Machen et al., 1989; Paradiso et al., 1989). В

[Type here]

незначительной мере апикальная секреция H^+ обкладочными клетками компенсируется Na^+/H^+ обменом через базолатеральную мембрану (Muallem et al., 1988).

Первым неэлектрогенным Cl^-/HCO_3^- обменным белком, выявленным иммунным мечением в базолатеральной мембране обкладочных клеток, был транспортер AE2, SLC4A2 (Rossmann et al., 2000, 2001a, b; Petrovic et al., 2003). Семейство SLC4 подразделяют на три группы: Na^+ - независимые Cl^-/HCO_3^- анионные обменники (AE1-3), Na^+/HCO_3^- ко-транспортеры (NBCe1, NBCe2, NBCn1, NBCn2), и Na^+ -связанные Cl^-/HCO_3^- транспортеры (NDCBE, NCBE). В основном белки SLC4A обеспечивают электронеutralный анионный транспорт, но как минимум два из них (NBCe1 и NBCe2) отвечают за электрогенный перенос (Romero, 2013).

В настоящее время сложилось единое мнение, что обмен Cl^-/HCO_3^- через базолатеральную мембрану практически полностью осуществляется переносчиком AE2 (Wang Z. et al., 1996; Cox et al., 1996; Jöns, Drenckhahn, 1998; Rossmann et al., 2001a). Уровень его экспрессии в желудке, особенно в обкладочных клетках, существенно превосходит другие органы (Wang Z. et al., 1996; Rossmann et al., 2001b). В ооцитах лягушки, экспрессирующих AE2, скорость трансмембранного переноса анионов зависит от pH цитоплазмы, а также активируется гиперосмотичностью и NH_4^+ , которые действуют на цитоплазматический домен транспортера (Humphreys et al., 1997). В изолированных обкладочных клетках кролика транспортер AE2 проявляет высокую чувствительность к DIDS. Его активность также ослабевает при уменьшении внутриклеточного pH (Seidler et al., 1994). Опыты на мышах с нулевой мутацией AE2 показали ахлоргидрию у таких животных, а также отсутствие развитой системы канальцев в обкладочных клетках (Gawenis et al., 2004).

Модуляция базолатерального AE2 потенциально может происходить с помощью коэкспрессированных с ним катионных обменников. Из 3-х

изоформ Na^+/H^+ ионообменников (NHE1,2,4), присутствующих в обкладочных клетках (Rossmann et al., 2001b), работа AE2 функционально связана с NHE4 (Gawenis et al., 2004). При этом в желудке NHE4 обильно представлен в базолатеральных мембранах обкладочных и главных клеток, а также в клетках слизистого эпителия (Rossmann et al., 2001b). Значительная функциональная роль NHE4 подтверждается гипохлоргидрией у NHE4 нокаутов (Schultheis et al., 1998). Взаимодействуя, хотя бы частично, с базолатеральным $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменом, NHE4 вместе с Na^+,K^+ -АТФазой поддерживают внутриклеточную концентрацию ионов и мембранный потенциал, необходимый для секреции HCl и KCl, а также регулируют клеточный объем (Bachmann et al., 1998; Gawenis et al., 2004).

В обкладочных клетках присутствуют еще 2 Na^+ -независимых неэлектрогенных $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменника из семейства SLC26. Переносчик SLC26A6 был обнаружен в тубуловезикулах и поэтому прямо не участвует в базолатеральном переносе $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Другой переносчик SLC26A7 уникален тем, что встречается только в желудке. При этом, как показало иммунное мечение у мышей, SLC26A7 локализован в основном в базолатеральных мембранах клеток железистой части желудка. Двойная иммунная окраска подтвердила его колокализацию с H^+,K^+ -АТФазой, т.е в обкладочных клетках (Petrovic et al., 2002).

1.2.1.5 Медиаторные и ферментативные механизмы, обеспечивающие желудочную секрецию кислоты

Адекватное гомеостазу функционирование обкладочных клеток достигается за счет нервной, эндокринной и паракринной регуляции. Основной стимулятор продукции кислоты – это паракринный фактор гистамин, выделяемый энтерохромаффиноподобными (ECL) клетками в теле и фундальной части желудка и действующий через базолатеральные H_2 -рецепторы. Продуцирующие гормон гастрин G клетки сконцентрированы в пилорической части желудка и в малом количестве в слизистой оболочке ДПК.

[Type here]

Гастрин действует на секрецию обкладочных клеток, в основном стимулируя ECL клетки, но также может влиять на обкладочные клетки напрямую через CCK_B рецепторы (Korís, Geibel, 2010).

Нейромедиатор ацетилхолин (АХ) - ацетильное производное четвертичного аммониевого соединения - холина, который образуется в нервных клетках под действием холин-ацетилтрансферазы. АХ, действующий на секреторные клетки, выделяется из окончаний постганглионарных интрамуральных нейронов. Последние иннервируются волокнами блуждающего нерва, приходящими в составе передней и задней желудочных ветвей, а также печеночной ветви (Browning et al., 2017). Ацетилхолин может активировать обкладочные клетки напрямую через базолатеральные М3 мускариновые рецепторы, либо опосредованно, влияя на М2 и М4 рецепторы на D- клетках. Действие АХ на D-клетки приводит к торможению секреции соматостатина (SST) и тем самым усиливает продукцию гастрина и гистамина (Smolka, Schubert, 2017).

В самом общем виде стимуляция секреции кислоты в обкладочных клетках осуществляется через два ферментативных пути: цАМФ/РКА – зависимый, либо Ca²⁺- зависимый. Роль цАМФ как основного внутриклеточного мессенджера, запускающего секрецию HCl, описана более 70 лет тому назад (Roth, Ivy, 1944). Происходящее под действием гистамина увеличение концентрации цАМФ влечет за собой активацию АМФ -зависимой РКА 1-го типа (Chew, 1985). В результате реакций фосфорилирования происходят перестройки цитоскелета и мембраны обкладочных клеток (Forte, Soll, 1989). Модулирующее влияние на секрецию кислоты оказывает еще несколько киназ. Негативную роль играет протеинкиназа С (РКС), при активации которой уменьшается секреторная реакция на карбохолин и гистамин. Кальций-кальмодулин-зависимая протеинкиназа II, напротив, стимулирует ферментативные каскады, связанные с М3 холинорецепторами (Hanson, Hatt, 1989). Карбохолин индуцирует активность IκB киназы через

[Type here]

Ca^{2+} или PKC-зависимые пути, в результате чего IкВ киназа активирует NF-кВ – важный фактор транскрипции многих генов, связанных с воспалительной реакцией (Todisco et al., 1999; DiDonato et al., 1997). С холинергической медиацией также связана индукция киназ – регуляторов клеточного роста, дифференциации и секреции, включая MAPK, ERK, cJun N-терминальную протеин-киназу. В результате увеличения активности ERK-киназ происходит экспрессия α -субъединицы H^+ , K^+ -АТФазы и небольшое усиление секреции протонов. Элементом каскада, ведущего к экспрессии H^+ , K^+ -АТФазы, является серин-треониновая протеин киназа Akt. С другой стороны, EGF/TGF- α киназы могут тормозить секреторную реакцию на гистамин, ускоряя обратный захват H^+ , K^+ -АТФазы из апикальной мембраны (Yao, Forte, 2003).

Секреция обкладочных клеток управляется различными гормонами, прежде всего соматостатином (SST), выделяемым D клетками желез антральной и фундальной частей желудка, вазоактивным кишечным полипептидом, а также дуоденальным гормоном холецистокинином (Walsh, 1988). На периферии SST тормозит продукцию гастрина и гистамина клетками фундальных желез, а также угнетает обкладочные клетки. Специфические рецепторы SST (sstR-2) связаны с Gi белком, ослабляющим активность аденилатциклазы (Park et al., 1987). Соматостатин также может длительно изменять секреторную активность обкладочных клеток, тормозя экспрессию генов раннего ответа, таких как c-fos (Todisco et al., 1997).

1.2.2. Транспорт HCO_3^- в эпителиоцитах желудка

Трансмембранный перенос бикарбонатов идет постоянно практически во всех клетках организма, поскольку HCO_3^- непрерывно накапливается как побочный продукт митохондриального дыхания. В цитоплазме клеток диоксид углерода после гидролиза приходит в равновесие с ионами бикарбоната: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$, т.к. константа диссоциации этой реакции равна 6.2 и близка к физиологическому значению pH в цитоплазме.

Газообразный CO_2 свободно выходит из клетки через плазматическую мембрану, но для HCO_3^- мембрана остается непроницаемой, т.е. для переноса HCO_3^- необходимы транспортные белки, анионные обменники и котранспортеры, которые, перемещая бикарбонаты внутрь клетки или наружу, изменяют кислотность цитоплазмы (Bonag, Casey, 2008). В желудке и ДПК активный транспорт бикарбонатов выполняет также жизненно важную защитную функцию, создавая условия для нейтрализации кислоты вблизи от апикальной поверхности эпителиальных клеток.

Впервые о том, что нейтрализация полостной кислоты происходит именно в слое слизи, было заявлено И.П. Павловым (Pavlov, 1898). Примерно тогда же было выяснено, что нейтрализующая способность желудочного сока меняется в зависимости от концентрации введенной в желудок экзогенной кислоты, о чем сообщил В.Н. Болдырев, редко упоминаемый ученик И.П. Павлова, первооткрыватель мигрирующего моторного комплекса желудка (Seidler et al., 2011). В этом контексте более известна работа датского физиолога Н. Ширбека, который измерил парциальное давление углекислоты (PCO_2) в желудочном соке собак после мнимого кормления и установил, что оно значительно превышало таковое в крови (Schierbeck, 1892).

Современные исследования желудочной секреции бикарбонатов начались в 1970-е годы, когда Г. Флемстрём и соавт. определили активный характер секреции HCO_3^- , опубликовав данные о зависимости транспорта HCO_3^- в изолированном желудочном эпителии лягушки от тканевого метаболизма (Flemström, 1977; Flemström, Sachs, 1975). Дальнейшее развитие техники эксперимента способствовало обнаружению сходного с желудком амфибий *in vitro* транспорта HCO_3^- у млекопитающих *in vivo*: у морских свинок (Garner, Flemström, 1978; Flemström, Garner, 1981), собак (Bolton, Cohen, 1978; Kauffman et al., 1980; Miller et al., 1983), кошек (Gascoigne, Hirst, 1981) и человека (Forssell, 1987). Окончательное подтверждение защитной роли слизистого бикарбонатного барьера связывают с опытами Л. Турнберга

и соавт., измеривших градиент pH вблизи от поверхности желудочного эпителия (Bahari et al., 1982). Кратный 10^6 градиент протонов, от pH~1.5 на люминальной поверхности слизи до нейтральной среды у поверхности эпителия, образуется по мере насыщения несмываемого тонкого слоя слизи ионами HCO_3^- (Allen, Flemstrom, 2005), причем величина градиента пропорциональна толщине слизистого слоя (Engel et al., 1995; Baumgartner, Montrose, 2004).

Суммарная желудочная продукция бикарбонатов невелика, не превышает 10% от пиковой секреции кислоты (Мыш, 1987; Garner et al., 1984), но при этом транспорт HCO_3^- через СОЖ постоянно адаптируется к текущим условиям, а именно к химическому составу химуса и фазе желудочной секреции. Ранние работы определили, что щелочная секреция в СОЖ осуществляется в основном поверхностными эпителиоцитами (Garner, Flemström, 1978; Flemström, Garner, 1982; Takeuchi et al., 1982). В слизистой оболочке фундальной части желудка лягушки секреция HCO_3^- не сопровождалась изменением трансэпителиального электрического потенциала, но зависела от присутствия ионов Cl^- , что позволило считать $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ механизм обмена электронейтральным. Такой перенос HCO_3^- представляется наиболее физиологически оправданным, т.к. Cl^- , постоянно диффундирующий из полости желудка в слой слизи, создает достаточную движущую силу для обменного механизма $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Flemstrom, 1980a). Гипотеза о ведущей роли $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обмена в транспорте бикарбонатов через желудочный эпителий получила обоснование благодаря демонстрации угнетающего действия DIDS на секрецию бикарбонатов в желудке крысы (Phillipson et al., 2002).

Уже в начале современного этапа исследований было высказано предположение, что бикарбонаты, секретируемые в желудке, в основном захватываются из тканевой жидкости подслизистого слоя (Takeuchi et al., 1982). С другой стороны, угнетение щелочной секреции в СОЖ под действием сравнительно больших доз блокаторов карбоангидразы позволяет считать, что

[Type here]

некоторая часть HCO_3^- все же синтезируется внутриклеточно из H_2O и CO_2 (Flemström, 1977; Flemström, Sachs, 1975; Reichstein, Cohen, 1984).

1.2.2.1 Апикальный транспорт HCO_3^- в поверхностных эпителиальных клетках СОЖ

Молекулярный механизм секреции бикарбонатов поверхностными эпителиальными клетками желудка был исследован несколькими научными группами. Тем не менее представление о нем остается достаточно противоречивым, в частности, не ясно соотношение в этом процессе электронейтрального и электрогенного транспорта HCO_3^- , упомянутых выше. С другой стороны, до сих пор не удалось полностью идентифицировать типы задействованных апикальных анионных транспортеров.

Иммуное окрашивание выявило у мышей в апикальных мембранах слизистых эпителиальных клеток электронейтральный анионный обменник AE4 (SLC4A9) (Xu J. et al., 2003). На ооцитах лягушки показано, что белок AE4 осуществляет электронейтральный обмен $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, который не связан с переносом Na^+ (Tsuganezawa et al., 2001). Тем не менее ведущая роль этого мембранного транспортера для апикального переноса HCO_3^- в полость желудка не вполне доказана. Характерной особенностью белка AE4 является незначительная чувствительность к DIDS. При этом известно, что стимулированная повышением кислотности в полости желудка секреция HCO_3^- сильно ослабевает в присутствии DIDS (Synnerstad et al., 2001; Phillipson et al., 2002).

В апикальной мембране эпителиальных клеток также выявлен транспортер SLC26A9, характерный для обкладочных клеток, но не встречающийся в других отделах ЖКТ. Он обеспечивает сопряженный перенос $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ и недостаточно изученную хлор-независимую экструзию HCO_3^- (Xu J. et al., 2005). С другой стороны, SLC26A9 обладает слабой проводимостью HCO_3^- ионов и не может полностью определять желудочную продукцию бикарбонатов. Возможно, он имеет определенное значение для

[Type here]

щелочной продукции в повреждённой СОЖ, что подтверждено при сравнении *in vivo* реакции на язвенное поражение у дикого типа и *Slc26a9*-ген нокаутных мышей (Demitrack et al., 2010).

Ионный транспорт, осуществляемый SLC26A9, угнетается дисульфоновым стильбеном DIDS (Rossmann et al., 2000; Xu J. et al., 2005). Кроме того, в отличие от других известных анионных транспортеров или ионообменных белков, активность SLC26A9 тормозится ионами аммония, NH_4^+ . Возможно, с белком SLC26A9 может взаимодействовать бактерия *H. pylori*, в уреазном цикле которой генерируется аммоний (Xu J. et al., 2005). Сообщается также, что вследствие длительного угнетения транспортера SLC26A9 у мышей, инфицированных *H. pylori*, экспрессия его мРНК увеличивается в 1.9 раза (Henriksnäs et al., 2006).

Специальные исследования активности апикальных транспортеров AE4 и SLC26A9 в эпителиальных клетках желудка неизвестны. Исходя из общих свойств этих белков, можно полагать, что скорость осуществляемого ими трансмембранного переноса в первую очередь определяется концентрацией субстратов (Рейна-Münzenmayer et al., 2016). Возможно влияние на активность белков со стороны тесно взаимодействующих с ними карбоангидраз (Bonag, Casey, 2008).

1.2.2.2 Базолатеральные транспортеры HCO_3^- в поверхностных эпителиальных клетках желудка

Исследования на изолированной СОЖ амфибий позволили предположить особое значение Na^+ и HCO_3^- - зависимого базолатерального транспортера, поставляющего в клетки основную долю бикарбонатов, предназначенных для дальнейшей секреции в полость желудка (Takeuchi et al., 1982). Также хорошо известна принципиальная важность захвата HCO_3^- из тканевой жидкости и кровотока для поддержания целостности желудочного эпителия при закрытии повреждений клетками, мигрирующими из области шейки желудочных желез (Ito et al., 1984; Paimela et al., 1995). Этот процесс исключительно чувствителен

к pH и протекает только при нормальной физиологической концентрации $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ с серозной стороны эпителия (Svanes et al., 1983).

Система натрий-бикарбонатных (NBC1 и NBC2) котранспортеров рассматривается как основной элемент электрогенного импорта HCO_3^- через базолатеральную мембрану поверхностных эпителиальных клеток желудка при уменьшении внутриклеточного pH. Концентрация NBC1 и NBC2 в эпителиальных клетках примерно в 2.5 раза больше, чем в обкладочных. В желудочных эпителиоцитах кролика котранспортеры NBC1 и NBC2 обычно осуществляют $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ обмен в соотношении 1:2 и 1:3, соответственно (Rossmann et al., 1999).

Условием электрогенного обмена $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ является достаточная (физиологическая) концентрация $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ с серозной стороны эпителия. В эпителиоцитах переносчики $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ экспрессируются наравне или даже в большей мере, чем белки, удаляющие протоны из цитоплазмы, такие как NHE1 и NHE2 изоформы Na^+/H^+ обменных белков (Seidler et al., 2000). Ионообменные Na^+/H^+ белки, по-видимому, играют определенную роль в поддержании внутриклеточного pH и функциональной активности эпителиальных клеток, поскольку у NHE1 и NHE2- нокаутных мышей проявляется атрофия СОЖ (Rossmann et al., 2001b).

1.2.3 Щелочной прилив

Известно, что при естественном выделении протонов обкладочными клетками существенно меняется баланс электролитов в подслизистом слое, что приводит к усилению гастропротективных реакций на фоне собственной продукции кислоты (Phillipson et al., 2002). Защитный эффект эндогенной кислоты определяется так называемым щелочным приливом (Moore, 1967; Allen, Flemstrom, 2005). При расщеплении угольной кислоты в обкладочных клетках ионы HCO_3^- продуцируются в количестве, эквивалентном секретлируемым протонам (Teorell, 1951). Протоны выносятся через

[Type here]

апикальную мембрану в полость желудка, а бикарбонаты направляются в подслизистый слой и далее в кровеносные сосуды, увеличивая щелочную реакцию венозной крови, которая и получила название щелочного прилива (Niv, Fraser, 2002). Синтез бикарбонатов *de novo* в эпителиоцитах незначителен и, по-видимому, не является важным источником этих ионов в желудке (Flemström, Sachs, 1975), вследствие чего эти ионы в основном транспортируются на поверхность эпителия из тканевой жидкости (Allen, Flemström, 2005). Происходящее защелачивание собственной пластинки желудочного эпителия настолько велико, что вызывает сдвиги кислотно-щелочного равновесия всего организма, а именно временно увеличивает рН крови и мочи на фоне желудочной секреции кислоты (Rune, 1965; Johnson, Rai, 1990; Niv, 1992). Заслуживает упоминания также конкурентная точка зрения на природу щелочного прилива, связывающая это явление с выделением бикарбонатов в основном в поджелудочной железе (Johnson et al., 1995). Все же ряд исследований подтвердил, что щелочной прилив синхронизирован именно с выделением кислоты в желудке, и подавление секреции кислоты с помощью ваготомии, антагонистов гистаминовых H_2 рецепторов, либо блокаторов кальциевых каналов ведет к уменьшению щелочного прилива (Niv, 1992; Niv et al., 1993; Niv, Asaf, 1995; Niv, Vardi, 1995).

Вместе с тем значение щелочного прилива как фактора поддержания бикарбонатного барьера остается спорным. В частности, непрерывная внутривенная инфузия $NaHCO_3$, которая симулирует «щелочной прилив», не влияла на базальную секрецию бикарбонатов в желудке крысы, хотя и поддерживала градиент рН в поверхностном слое слизи при полостной аппликации кислоты, что оценивается как результат усиления транспорта бикарбонатов из подслизистого слоя (Synnerstad et al., 2001). Прямая демонстрация зависимости транспорта HCO_3^- от концентрации бикарбонатов в желудочном кровотоке при ирритации СОЖ, а также анализ механизмов его регуляции до последнего времени не проведены.

Измерение щелочного прилива активно обсуждалось в литературе как потенциально удобный, неинвазивный и дешевый способ диагностики гипо- и гиперацидного состояния. При этом предлагался простой расчёт щелочного прилива (АТ) на основе щелочного сдвига крови (ВЕ) и веса тела (BW): $AT (mEq) = VE (mEq) \times 0.3 \times BW(kg)$. Рассчитанный таким образом у человека щелочной прилив в ответ на инъекцию пентагастрина был примерно равен 20 mEq (Regev et al., 2001).

1.3 Секреция пепсиногена и гастропротекция

1.3.1 Пепсиноген как фактор поражения слизистой оболочки желудка и пищевода

Желудочный протеолитический фермент пепсин длительное время привлекает к себе внимание как важный фактор, усиливающий поражение слизистой оболочки в гастродуоденальной зоне, для чего был введен специальный термин «пептическое язвообразование». В исследованиях на животных добавление пепсина к кислому перфузату увеличивало вероятность и величину поражения желудка и кишечника, в то время как в отсутствии пепсина слизистая оболочка сохраняла устойчивость даже при низком полостном рН. Кроме того, ингибиторы пепсина (пепстатин-А) дозозависимо ослабляют индометациновое поражение СОЖ даже в условиях ацидификации (Raufman, 1996).

Воспалительные процессы в верхних отделах ЖКТ сопровождаются усилением секреции пепсиногена. В частности, уровень пепсиногена в крови заметно увеличен у пациентов с язвой ДПК. Повышенный уровень пепсиногена А характерен при инфекции *H. Pylory*, а иррадикация возбудителя приводит к снижению концентрации пепсиногена (Hunter et al., 1993; Wagner et al., 1994; Kuipers et al., 1996; Chittajallu et al., 1992). Вероятно, липополисахариды оболочки *H. pylory* действуют на мембраны главных клеток напрямую. В изолированных желудочных железах кролика и морской

свинки гомогенат *H. pylori* или бактериальные липополисахариды самостоятельно стимулировали продукцию пепсиногена (Cave, Cave, 1991; Young et al., 1992). Бактерия усиливает секрецию пепсиногена, вызванную гистамином, цАМФ и цГМФ, но не карбахолином или холецистокинином. Усиление секреции пепсиногена под действием бактерии подавлялось блокатором NO синтазы (Lorente et al., 2002). Пепсин, кроме того, рассматривается как важный фактор рефлюкс-эзофагита, хотя прямых клинических наблюдений, касающихся этой его роли нет. В то же время в опытах на животных агрессивная роль пепсина при эзофагите описана достаточно подробно (Takeuchi, Nagahama, 2014).

1.3.2 Пепсиногены, структура и секреция

Пепсиногены классифицируются как эндопептидазы, относящиеся к семейству аспартатных протеиназ (кислых протеиназ, т.к. они активируются при pH 5.0 – 1.5). Это гетерогенная группа ферментов, появившаяся в результате экспрессии нескольких структурных генов, имеющих аллельные вариации, и посттрансляционных модификаций белка. Они продуцируются главными клетками желез в теле желудка, а в фундальной части – слизистыми пришеечными клеткам. Пепсиногены секретируются антральными железами, железами Бруннера в проксимальном отделе ДПК, а также в предстательной железе. Слизистая оболочка желудка человека продуцирует 4 разновидности пепсиногенов: пепсиноген I (пепсиноген А), пепсиноген II (пепсиноген С), катепсин Е (медленно движущаяся протеиназа) и катепсин D (Gritti et al., 2000). В желудке крыс синтезируются в основном пепсиногены I и II, и в незначительном количестве еще несколько форм, имеющих очень близкие аминокислотное строение. При этом вследствие генетического полиморфизма примерно у половины крыс линии Вистар в желудке обнаружен только пепсиноген I, а у отдельных особей – только пепсиноген II (Muto et al., 1980).

Пепсиногены продуцируются как неактивные проферменты, зимогены, с молекулярным весом 42000 Da. В своей N-терминали профермент содержит гидрофобную сигнальную последовательность из 15-16 аминокислот, которая утрачивается в посттрансляционном процессинге. Затем, когда профермент попадает в просвет желудочной железы при pH ниже 5.0, от молекулы отделяется N-терминальный участок, содержащий 44-47 аминокислот, в результате чего открывается активный центр фермента. Когда pH достигает 2.5, активный центр разрушает N-терминальный фрагмент. После этих превращений молекулярный вес фермента уменьшается примерно до 35000 Da, и образуется его активная форма (Gritti et al., 2000).

В эндоплазматической сети секреторных клеток пепсиноген синтезируется полисомой на основе мРНК, а затем накапливается в гранулах, откуда выделяется в просвет железы. После действия стимула пептические гранулы выделяются путем экзоцитоза, во время которого происходит слияние вакуолей, содержащих гранулы, с плазматической мембраной и слияние этих вакуолей между собой. Экскреция развивается двумя путями. В ответ на краткий стимул происходит быстрая экскреция, высвобождающая запасы пепсиногена, а затем начинается цикл восстановления. Если сильный стимул действует непрерывно, синтез пепсиногена нарастает до максимума в течение 45-60 мин, пока не уравнивает секрецию. Такое состояние может поддерживаться часами, при этом полноценные гранулы не образуются (Helander, 1965; Gibert, Hersey, 1982; Tao et al., 1998).

1.3.3 Регуляция секреции пепсиногена

У всех исследованных видов животных продукция пепсиногена зависит прежде всего от активности блуждающего нерва. Она может быть вызвана прямой электрической стимуляцией нерва, инсулиновой гипогликемией, 2-деоксиглюкозой, алкоголем, мнимым кормлением, гипервентиляцией, вагo-вагальными рефлексамн на растяжение желудка и психическими стимулами.

[Type here]

Все эти воздействия становятся неэффективными после ваготомии, либо атропинизации (Haukeland et al., 1982). Исследования *in vitro* и *in vivo* подтвердили, что АХ и другие холиномиметики усиливают секрецию пепсиногена, действуя в основном через M1 и отчасти через M3 (ранее M2) мускариновые рецепторы (Helander et al., 1996; Sutliff et al., 1989). При этом M1 рецепторы ассоциированы с торможением цАМФ, а эффект M2 рецепторов связан с мобилизацией Ca^{2+} (Tao et al., 1998; Harden et al., 1986; Blandizzi et al., 1997).

Гистамин, по-видимому, нельзя считать непосредственным регулятором секреции главных клеток, поскольку он оказывает разнонаправленные воздействия, в которые вовлечены другие структуры. Эксперименты *in vivo* показали, что гистамин способен как усиливать, так в большой дозе и ослаблять секрецию пепсиногена (Hersey, 1989). Предполагается, что эти реакции, реализующиеся через H2 рецепторы, возникают при ацидификации полости желудка, что в свою очередь запускает локальные холинергические рефлексy и может активировать секрецию пепсиногена (Hirschowitz, Hutchison, 1977; Gibson et al., 1977; Johnson, 1972). В опытах *in vitro* секреция пепсиногена не зависела от гистаминовой регуляции (Hersey et al., 1983; Koelz et al., 1982; Simpson et al., 1980).

Адренергическая стимуляция секреции пепсиногена осуществляется, скорее всего, напрямую через активацию $\beta 1$ и $\beta 2$ адренорецепторов (Skouho-Kristensen, Fryklund, 1985; Bliski et al., 1983; Bojamic et al., 1985; Bondot et al., 1989).

Гастрин и пентагастрин вызывают секрецию у интактных животных (Tao et al., 1998) через холецистокининовые рецепторы (ССКа и ССКb) на главных клетках, активируя синтез цГМФ (Blandizzi et al., 1995; Meyer et al., 1996). Секретин и вазоактивный кишечный полипептид, действуя на одни и те же рецепторы главных клеток, усиливают продукцию пепсиногена. Бомбезин стимулирует продукцию пепсиногена непосредственно, а также

через усиление секреции гастрина. Глюкагон и соматостатин угнетают секрецию пепсиногена, влияя на ингибирующий пептид Gi (Gritti et al., 2000).

Базальная секреция пепсиногена тесно связана с кислотностью в полости желудка (Basson et al., 1988). Секреция пепсиногена, вызванная холинергической стимуляцией главных клеток, зависит от выделения кислоты и воды находящимися поблизости обкладочными клетками (Hersey, 1987; Sandvik et al., 1987; Johnson, 1972; Smith, Torres, 1990). При этом ирритация полости желудка экзогенной кислотой на фоне омепразола не влияла на базальную секрецию пепсиногена, но потенцировала продукцию фермента в ответ на холинергическую стимуляцию (Blandizzi et al., 1997).

С другой стороны, длительное (12-18 часов) подавление H^+/K^+ -АТФазы приводит к увеличению концентрации пепсиногенов А и С, как в желудочном соке, так и в плазме крови пациентов (Baak et al., 1991a,b). Блокаторы протонного насоса, вероятно, действуют на главные клетки опосредованно, вызывая ахлоридию и гипергастринемию (Basson et al., 1988), которая в свою очередь стимулирует продукцию гастрина (Wilde, McTavish, 1994).

Главные клетки желудочных желез потенциально способны взаимодействовать с капсаицин-чувствительными первичными афферентами. Тем не менее, капсаицин не оказывал влияния на секрецию пепсина (Schmidt et al., 1999). С другой стороны нейропептиды, содержащиеся в КЧПА модулируют секрецию пепсина. В частности, субстанция Р и нейрокинин А, которые выделяются в ответ на электрическое раздражение блуждающего нерва, усиливают секрецию (Schmidt et al., 1999). Инфузия КГРП, напротив, приводила к быстрому подавлению секреции пепсина, стимулированной пентагастрином (Kraenzlin et al., 1985).

1.3.4 Внутриклеточные ферментативные механизмы, регулирующие секрецию в главных клетках

Исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что цАМФ и его производные обеспечивают усиление секреции пепсиногена. Под действием форсколина, холерного токсина, гистамина, ПГЕ₂, секретина, вазоактивного кишечного полипептида, β-адреномиметиков концентрация цАМФ в главных клетках увеличивается посредством Gs- белка и аденилатциклазы (Hersey, 1989; Raufman, 1996). С другой стороны, известно, что простагландины способны замедлять секрецию пепсиногена, подавляя через белок Gi синтез цАМФ (Wollin et al., 1979; Beinborn et al., 1989). Холиномиметики, ХЦК-родственные пептиды и субстанция Р усиливают секрецию пепсиногена, активируя каскад, включающий белок Gq, фосфолипазу C, инозитол-1, 4, 5 трифосфат и 1, 2 диацилглицерол, в результате чего повышается внутриклеточная концентрация Ca²⁺ (Streb et al., 1983, 1984; Williamson et al., 1985; Raufman, 1996).

Иммуногистохимические работы показали, что почти в 70% изолированных главных клеток морской свинки присутствует Ca²⁺/кальмодулин-зависимая NOS. Краткая инкубация этих клеток с карбохолином вызывала рост концентрации цитруллина (маркера синтеза NO), цГМФ и продукции пепсиногена. Поскольку основной выброс цитруллина приходился на 1-ую минуту реакции, запускаемой холинорецептором, продукцию NO стоит рассматривать как начальный этап реакции клетки. Подтверждением участия NOS в реакции является то, что базальная и активированная карбохолином продукция цитруллина угнетались в присутствии блокатора конститутивной NOS. Наконец, секреция пепсиногена увеличивалась в присутствии доноров NO либо аналогов цГМФ (Fiorucci et al., 1995a). Тем не менее Окаяма и соавт. (Okayama et al., 1995) показали, что увеличение концентрации цГМФ в результате аппликации донора NO нитропрусида в культуре главных клеток желудочных желез

морской свинки, напротив, приводила к уменьшению внутриклеточного содержания Ca^{2+} и ослаблению секреции пепсиногена. Синтез NO, запускающий секрецию пепсиногена, может быть обусловлен также вагo-вагальными рефлексами, например, вызванными механической стимуляцией стенки желудка. На фоне растяжения желудка *in vitro* и *in situ* продукция кислоты и пепсиногена, а равно и рост концентрации NO прекращались после ваготомии и атропинизации, а также блокировались L-NAME (Ito et al., 2008).

Как показали исследования *in vitro*, НПВС способны значительно усиливать секрецию пепсина, повышая риск пептического язвообразования. Неселективный блокатор циклооксигеназ индометацин стимулировал продукцию пепсиногена в культуре главных клеток, что происходило наряду с увеличением внутриклеточного содержания Ca^{2+} . Параллельно в культуре главных клеток усиливалась продукция лейкотриенов (LNB4), которые описаны как мощный стимулятор секреции пепсиногена, т.к. активируют специфические рецепторы на главных клетках, запускающие гидролиз инозитол-1, 4, 5 трифосфата, мобилизацию Ca^{2+} , продукцию NO и цГМФ. При этом обсуждается аддитивное воздействие ПГ и NO на главные клетки (Fiorucci et al., 1995b).

1.4 Простагландины и гастропротекция

Простагландины (ПГ) - семейство аутокринных и паракринных липидных медиаторов, локально регулирующих различные физиологические процессы в желудке, включая секрецию кислоты, продукцию муцина и бикарбонатов, а также кровотоков в подслизистом слое и, следовательно, напрямую связанные с реакциями адаптивной гастропротекции (Robert, Ruwart, 1982).

1.4.1 Простагландины и циклооксигеназы

По химической природе ПГ – это группа физиологически активных липидов, которые синтезируются из жирных кислот с 20-ти углеродной цепью и 4-мя цис-двойными связями, в основном из арахидоновой кислоты, в меньшей степени из γ -гомолиноленовой и 5,8,11,14,17-эйкозапентаеновой. Эти жирные кислоты высвобождаются под действием фосфолипазы A_2 из мембранных фосфолипидов в ответ на физиологические и патофизиологические стимулы (Nagumiya et al., 1999). ПГ часто объединяют с простаноидами, к которым кроме ПГ относятся более специализированные тромбоксан и простациклин. Структура простаноидов включает цикlopентан с двумя, связанными с ним боковыми цепями, названными α и ω . Для тромбоксанов характерно цикlopентановое кольцо, в которое включен атом кислорода (Salvemini et al., 2013).

ПГ образуются во всех тканях с помощью фермента циклооксигеназы (ЦОГ). Превращение арахидоновой кислоты происходит в 2 этапа. В начале фермент превращает арахидоновую кислоту в циклический эндопероксид (PGG_2). Затем происходит расщепление PGG_2 пероксидазой с образованием эндопероксида PGH_2 . Это нестабильное производное арахидоновой кислоты с помощью специфических изомераз превращается в простагландины PGE_2 , PGF_2 , тромбоксан A_2 , PGI_2 (Needleman et al., 1986). Большинство ПГ, синтезируемых в желудке человека и грызунов, – это PGE_2 и PGI_2 (Peskar et al., 1980; Peskar, 1977; Knapp et al., 1978). Тромбоксан также был обнаружен в СОЖ, но он в основном производится тромбоцитами (Wallace, Whittle, 1985).

Фермент ЦОГ представлен 3-я изоформами, среди которых выделяют конститутивный (ЦОГ-1) и индуцибельный фермент (ЦОГ-2) (Simmons et al., 2004). Третья изоформа ЦОГ-3 является сплайс вариантом ЦОГ-1, который экспрессируется в основном в головном мозге и сердце (Chandrasekharan et al., 2002). Молекулы ЦОГ-1 и ЦОГ-2 кодируется 2-я генами, в результате чего совпадения отмечаются лишь в 60% аминокислотной последовательности. В

каждой изоформе выделяют 3 участка: домен связывания эпидермального фактора роста, домен связывания с мембраной и ЦОГ каталитический домен, включающий циклооксигеназный и пероксигеназный сайты, расположенные по обе стороны гема. Человеческие циклооксигеназы функционируют в виде гомодимеров (Rouzer, Marnett, 2009).

Несмотря на определенную структурную схожесть изоформ ЦОГ их экспрессия и локализация заметно различаются. Постоянно экспрессируемая изоформа ЦОГ-1 присутствует в тканях ЖКТ. В здоровой СОЖ, а также на фоне гастрита, вызванного *H. pylori*, ЦОГ-1 выявляется иммуногистохимически в отдельных мезенхимных клетках базальной пластинки, фибробластах и макрофагах. Менее интенсивное окрашивание ЦОГ-1 обнаруживается в железистых, обкладочных и слизистых клетках пилорических желез, но не встречается, что обращает на себя внимание, в поверхностных эпителиальных клетках (Tatsuguchi et al., 2000).

Исполняя явно противоположную функцию, ЦОГ-2 экспрессируется в очагах воспаления во многих активированных защитных клетках, где обеспечивает резкое увеличение концентрации провоспалительных ПГ (Simmons et al., 2004). В здоровой СОЖ ЦОГ-2 не экспрессируется. На фоне гастрита, вызванного *H. pylori*, либо язвенной болезни сильное иммуногистохимическое окрашивание ЦОГ-2 отмечено в мезенхимных клетках собственной пластинки, мезенхимных клетках вокруг капилляров, в макрофагах и фибробластах, в зоне грануляции, а также в регенерирующем эпителии и в зоне кишечной метаплазии. Фермент локализуется в ядерной мембране и ЭПС (Tatsuguchi et al., 2000). Ингибиторы протонной помпы (ИПП) и H₂ гистаминовые блокаторы не влияют на уровень экспрессии мРНК ЦОГ-1. Экспрессия ЦОГ-2, напротив, на фоне лечения ИПП и H₂ блокаторами со временем возрастает (Okazaki et al., 2007).

ПГГ, ПГН, ПГИ и ТхА являются химически нестабильными веществами. В условиях физиологической нормы период их полужизни близок к 30 с.

[Type here]

Другие ПГ обладают определенной химической устойчивостью, но метаболизируется также быстро. Например, в легких ПГ инактивируются за один проход. Поэтому общепринято, что ПГ осуществляют свое действие локально в непосредственной близости от места синтеза (Narumiya et al., 1999).

1.4.2 Простагландиновые рецепторы

Поскольку ПГ синтезируются из жирных кислот, логично было бы отнести их к гидрофобным веществам, которые, как считалось в начале исследований, встраиваются в клеточные мембраны, изменяя их свойства. Тем не менее ПГ не работают как гидрофобные агенты, но каждая их разновидность вступает в контакт со специфическим рецептором (Narumiya et al., 1999). Аутокринная и паракринная функция ПГ реализуется при взаимодействии с 11 разновидностями специфических рецепторов: DP1, DP2, EP1, EP2, EP3, EP4, FP α , β , IP и TP α , β . Рецепторы ПГ принадлежат к суперсемейству рецепторов, связанных с G-белками, с характерным наличием семи трансмембранных доменов (Hirata, Narumiya, 2011).

Функционально рецепторы ПГ подразделяют на 3 группы, которые взаимодействуют с различными внутриклеточными сигнальными каскадами (Woodward et al., 2011). Группу 1 описывают как релаксирующие рецепторы. Она включает подтипы EP2, EP4, IP и DP1, которые связаны с белком G α_s и поэтому активируют АЦ, что приводит к повышению концентрации цАМФ и расслаблению гладкой мускулатуры. Группа 2 - контрактивные рецепторы. Она объединяет рецепторы EP1, FP, and TP, которые взаимодействуют с G α_q . В основном они способствуют повышению концентрации внутриклеточного Ca $^{2+}$, что приводит к сокращению гладких мышц. В нескольких работах показано, что активация рецептора EP1 стимулирует фосфолипазу C/протеинкиназу A (PLC/PKA) (Nicola et al., 2005; Tang et al., 2005). Группа 3 включает тормозные рецепторы EP3 и DP2, которые преимущественно взаимодействуют с G α_i , в результате чего наблюдается торможение продукции

цАМФ (Sugimoto et al., 1993). Уникальность этой группы определяется наличием как минимум 8 сплайс вариантов EP3, активирующих не только Gi субъединицу, но также и Gs, в результате чего концентрация цАМФ повышается (Pierce, Regan, 1998). Есть также данные, что EP3 рецептор может взаимодействовать с малым G белком Rho и его мишенью является p160 Rho-А связывающая киназа ROK α (Katoh et al., 1998; Tamma et al., 2003). Кроме того, EP3 рецепторы активируют раковые сигнальные пути Ras (Yano et al., 2002).

1.4.3 Распространение ПГ и EP рецепторов в желудке

Простагландин ПГЕ₂ продуцируется в различных клетках слизистой оболочки ЖКТ, а его многообразные физиологические эффекты определяются типом и положением рецепторов, на которые направлено действие.

Подтип рецепторов EP1 описан в ЖКТ различных видов животных. У крыс mRNA EP1 обнаруживается в мышечных клетках стенки желудка (Ding et al., 1997), в главных клетках желудочных желез, в обкладочных клетках, и в секретирующих слизь эпителиальных клетках (Northey et al., 2000). Обильная экспрессия EP2 рецепторов в желудке мышей найдена в основном в слизистых клетках желудочного эпителия (Northey et al., 2000). У людей этот подтип в основном связан с люминальной мембраной желудочных эпителиальных клеток (Takafuji et al., 2002). У грызунов mRNA EP3 рецептор встречается преимущественно в обкладочных клетках (Ding et al., 1997). Кроме того, достаточно большая плотность этого подтипа рецепторов характерна для миэнтеральных нейронов и глиальных клеток (Morimoto et al., 1997; Northey et al., 2000). В обкладочных и слизистых эпителиальных клетках желудка грызунов выявлена mRNA EP4 рецепторов (Ding et al., 1997; Northey et al., 2000). Кроме того, рецепторы EP4 экспрессируются в многочисленных крупных и мелких артериях и венах (Yokoama et al., 2013), причем они встречаются не только в гладкомышечных клетках, но и в эндотелии сосудов

(Rao et al., 2007). В условиях физиологической нормы сигналы, передаваемые от EP4 через цАМФ, являются основным путем вазодилатации, к которому в дальнейшем могут подключаться другие сигнальные молекулы (Morgado et al., 2012). Например, цАМФ снижает чувствительность миофиламентов к Ca^{2+} через фосфорилирование киназы легкой цепи миозина, в результате чего снижается аффинность к Ca^{2+} -кальмодулиновому комплексу, и происходит расширение сосуда (Conti, Adelstein, 1981).

1.4.4 Значение простагландинов в управлении желудочной секрецией и в гастропротекции

Простагландины оказывают существенное локальное действие на секреторные клетки в желудочных железах, влияя, как на процесс пищеварения, так и на продукцию агрессивных и защитных факторов СОЖ. Хорошо известно, что ПГ тормозят продукцию кислоты. Этот эффект опосредуется EP3 рецепторами двумя путями: прямым через торможение секреции обкладочных клеток и непрямым через угнетение продукции гистамина в ECL клетках. Дополнительно в мембране ECL клеток присутствуют рецепторы EP4, через которые ПГ оказывают небольшое стимулирующее действие на продукцию гистамина, хотя, насколько опосредованная EP4 продукция гистамина влияет на секрецию кислоты, неизвестно (Kato et al., 2005).

ПГ описаны как ведущий стимулятор защитной секреции бикарбонатов в желудке. Интересно, что физиологические и морфологические данные о роли подтипов EP рецепторов в усилении секреции HCO_3^- в желудке, в том числе вызванной слабой ирритацией, расходятся. Опыты с использованием селективных блокаторов ПГ рецепторов и соответствующих ген-нокаутных линий мышей показали, что усиление секреции муцина и бикарбонатов происходит через рецепторы EP4 и EP1, соответственно (Takeuchi et al., 2010a). В то же время иммуногистохимические методы определили в

эпителиальных клетках в гастродуоденальной зоне преимущественно подтипы EP3 и EP4. Транскрипция же EP1 рецептора отчетливо проявляется в гладкомышечном слое и в нейронах миэнтерального сплетения (Ding et al., 1997). Функциональное значение подтипа рецепторов EP1 для управления продукцией HCO_3^- подтверждается данными об активации внутриклеточных сигнальных систем. В частности, стимуляция рецепторов EP1 в тканях желудка вызывает подъем внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , независимый от фосфоинозитольной системы (Coleman et al., 1994). Кроме того, секреция HCO_3^- в желудке, вызванная аппликацией ПГЕ₂ угнеталась в присутствии антагониста Ca^{2+} каналов верапамила, но не зависела от торможения фосфодиэстеразы изобутилметилксантином (Takeuchi et al., 1997b).

Стимуляция рецепторов EP2 и EP4 приводит к увеличению внутриклеточной концентрации цАМФ (Coleman et al., 1994). Однако стимулятор аденилатциклазы форсколин не влияет на секрецию HCO_3^- в желудке, что четко указывает на отсутствие эффекта цАМФ в этом процессе (Takeuchi et al., 1997a). Таким образом, секреция HCO_3^- в желудке полностью опосредуется EP1 рецепторами (локализация которых в СОЖ не подтверждена) и зависит от увеличения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} .

Регуляция продукции HCO_3^- посредством ПГ и ЦОГ-1 в слизистой оболочке ДПК заметно отличается от таковой в СОЖ. Она осуществляется через EP3/4 рецепторы (Takeuchi et al., 1997b, 2002; Aoi et al., 2004). В эпителиальных клетках предшествующая секреции HCO_3^- активация G-протеин-связанных рецепторов EP3/4 опосредовалась увеличением концентрации цАМФ (Aoi et al., 2004; Coleman et al., 1994).

В концепции цитопротекции, разработанной в 1980-е годы А. Робером, ПГ занимают центральное место. Предварительное пероральное, либо подкожное введение экспериментальным животным микрограммовых доз (0.1-1 мкг/кг) 16,16-диметил ПГЕ₂ почти полностью предотвращают поражения СОЖ, которые провоцировали спустя 15-30 мин с помощью

внутрижелудочной аппликации сильных некротизирующих агентов, таких как 100% этанол или кипящая вода (Robert et al., 1978). Впоследствии цитопротективное действие ПГ было показано многими авторами, как на животных, так и в клинической практике (Tarnawski et al., 1981, 1993).

Защитное действие ПГ по отношению к СОЖ связано исключительно с их локальными репаративными эффектами на уровне эпителия и не вовлекает нервные и гуморальные процессы, т.к. ПГ не оказывают влияния при системном введении (Konturek et al., 1982). Кроме того, экзогенный ПГЕ₂ уменьшал поражающий эффект этанола и индометацина по отношению к изолированным клеткам СОЖ и изолированным желудочным железам *in vitro* (Tarnawski et al., 1993). В то же время исходное положение, что ПГ являются первичными медиаторами адаптивной гастропротекции, рассматривается как спорное. Известно, что начало выделения слизи и усиление кровотока в ответ на действие слабых ирритантов предшествует синтезу ПГ (Svanes et al., 1991; Cho et al., 1994; Mutoh et al., 1995). Кроме того, ПГ усиливают защитные процессы в относительно глубоких регенерирующих зонах желудочных желез, стимулируя миграцию клеток из интактных пришеечных участков, но при этом не предотвращают разрушение поверхностного эпителия и слущивание клеток, например, после этанола (Lacy, Ito, 1982; Tarnawski et al., 1985; Hawkey, Rampton, 1985).

В состоянии физиологического покоя гастропротективная активность обеих форм ЦОГ, по-видимому, невелика. В экспериментах на крысах блокада любой изоформы по-отдельности не вызывает ulcerогенного эффекта, но одновременная блокада ЦОГ-1 и ЦОГ-2 провоцирует развитие поражений СОЖ (Peskar, 2001). Это наблюдение позволило сформулировать общепринятую в настоящее время концепцию, что в здоровом желудке ЦОГ-1 - единственная изоформа фермента, поддерживающая нормальное состояние СОЖ. В базальных условиях уровень ЦОГ-2 очень низкий, либо фермент

вообще не определяется, а экспрессия мРНК ЦОГ-2 возникает только при деструкции эпителия (Vane, Botting, 1995; Warner et al., 1999).

Увеличение активности ЦОГ-1, предшествующее синтезу ПГ, является основной реакцией на ирритацию СОЖ, вызванную, например, 0.3 N HCl, но экспрессии ЦОГ-2 при этом не отмечается (Gretzer et al., 2001). Кроме того, селективный ингибитор ЦОГ-2 изоформы Rofecoxib не усугубляет кислотного поражения слизистой оболочки. В то же время селективное угнетение ЦОГ-1 с помощью SC-560 является достаточным для дозозависимого усиления поражения (Peskar, 2001). Увеличение экспрессии ЦОГ-2 отмечается в СОЖ при развитии воспалительных процессов, прежде всего индуцированных *H. pylori*, а также в желудочных аденокарциномах человека, где этот фермент ускоряет рост опухоли, тормозя апоптоз, способствуя быстрой клеточной пролиферации и стимулируя ангиогенез (Dubois et al., 1998; Ristimäki et al., 1997; Tsujii, Dubois, 1995).

Заживление эпителия ЖКТ связывают в основном с действием ПГЕ₂, который влияет на 4 подтипа рецепторов (EP1-4). В частности, ПГЕ₂ оказывает двойной эффект на развитие кислотного рефлюкс-эзофагита на фоне индометацина (ИНД). В малых дозах ПГЕ₂ стимулировал цитопротекцию, но при увеличении дозы усиливал воспаление. Последнее связывают с увеличением секреции пепсина под действием ПГЕ₂. Оба эффекта, заживляющий и поражающий, осуществляются через рецепторы EP1 (Yamato et al., 2005).

Выраженная противоязвенная активность ПГЕ₂ проявлялась при моделировании поражения СОЖ некротизирующими агентами (HCl, этанол), а также НПВП (Araki et al., 2000; Takeuchi et al., 2001a; Suzuki et al., 2001). Защитное действие ПГЕ₂ ослабевало в присутствии EP1 антагонистов (Araki et al., 2000) и отчасти антагониста EP4 (Takeuchi et al., 2010a), но не зависело от подтипа рецепторов EP3 (Araki et al., 2000). Простациклин ПGI₂ в отличие от ПГЕ₂ оказался более эффективным для предотвращения поражений СОЖ в

условиях холодового стресса и ишемии-реперфузии (Kotani et al., 2006; Amagase et al., 2014). Реакции адаптивной гастропротекции, возникающие в результате действия на СОЖ слабых ирритантов, таких как таурохолевая кислота, также зависят от эндогенной активации ЦОГ-1/ПГЕ₂. В этом случае действие ПГЕ₂ осуществляется через рецептор EP1 (Takeuchi et al., 2001a; 2010b).

Действие ПГЕ₂ распространяется на слизистую оболочку ДПК, где ПГ стимулируют секрецию HCO₃⁻ - основного фактора защиты от поражений кислотой. Здесь протективный эффект ПГЕ₂ в ДПК достигается за счет активации рецепторов EP3 и EP4, которые задействуют Ca²⁺ и цАМФ (Takeuchi et al., 2010b).

1.4.5 Взаимодействие простагландинов и капсаицин-чувствительных афферентных нервных окончаний в желудке

Эндогенные ПГ также вовлечены в гастропротективные реакции, вызванные раздражением капсаицин-чувствительных первичных афферентов (КЧПА). Протективное действие капсаицина (КАПС), осуществляемое через ваниллоидные рецепторы 1-го типа (TRPV1), заметно ослабевало в присутствии ИНД, что предполагает участие ПГ в данном процессе (Takeuchi et al., 1991, 2003; Uchida et al., 1991). Особенностью действия КАПС, опосредованного афферентными нейронами и нервными окончаниями, является то, что оно не приводит к выделению ПГ (Holzer et al., 1990). Не влияет на синтез ПГ и медиатор первичных афферентных нервных окончаний КГРП (Lambrecht et al., 1993).

Протективное действие КАПС не менялось под действием селективных блокаторов EP1 рецепторов, которые в то же время ослабляли гастропротективное действие слабых ирритантов (Takeuchi et al., 2003). Кроме того, ни стимуляция первичных афферентов с помощью КАПС, ни сенсорная деафферентация не влияли на концентрацию ПГЕ₂ в желудке, т.е активация

TRPV1 не связана с увеличением продукции ПГЕ₂, но сам эффект КЧПА зависит от эндогенных ПГ (Takeuchi, 2014). Гастропротективное действие КАПС, угнетаемое ИНД, частично восстанавливалось в присутствии агониста EP2 бутапроста, но не было подвержено действию EP3 и EP4 агонистов, либо EP1 антагониста (Takeuchi et al., 2003).

С другой стороны, КАПС не оказывал защитного действия при поражении СОЖ кислотой и этанолом в желудке IP-нокаутных мышей, что ясно указывает на участие IP рецепторов в дополнение к EP2 рецепторам (Takeuchi et al., 2003, 2001b). Более того у IP нокаутных мышей уменьшается продукция КГРП (Boku et al., 2001). Этому соответствует усиление продукции ПГ₂ в желудке в ответ на введение КАПС. Предполагается, что эндогенный ПГ₂ потенцирует капсаицин-зависимые эффекты, возможно через сенситизацию КЧПА (Takeuchi et al., 2001b; Tashima et al., 2002).

Простагландины группы E и I описываются как мощные вазодилататоры, действующие на желудочный кровоток через EP2/EP4 и IP рецепторы (Araki et al., 2000; Kotani et al., 2006), но не через EP1 рецепторы (Takeuchi, 2014). Они усиливают кровоток в желудочной стенке и тем самым повышают устойчивость СОЖ к повреждениям. Более того, вазодилаторный эффект ПГ ускоряет восстановление эпителия, стимулируя более высокий pH в мукоидном куполе над поврежденным участком (Wallace, McKnight, 1990). ПГ, влияющие на базальный кровоток, синтезируются исключительно с участием ЦОГ-1 (Wallace et al., 2000), однако, на фоне сильных повреждающих воздействий на СОЖ, таких как ишемия и реперфузия, возрастает сосудодвигательная роль ЦОГ-2 (Kotani et al., 2006). По-видимому, ПГ не играют существенной роли в модуляции тонуса сосудов желудка в состоянии покоя, но действуют при аппликации кислоты на СОЖ. Кровоток в здоровом желудке на фоне полостного действия кислоты ослабевает после блокады ЦОГ-1 (Funatsu et al., 2007). При пониженной кислотности в полости желудка угнетение ЦОГ-1 не влияет на скорость кровотока. С другой стороны,

[Type here]

угнетение ЦОГ-1 приводит к значительному выбросу эндотелина-1, активного вазоконстриктора, способного вызвать поражение СОЖ у крыс при внутривенном введении (Funatsu et al., 2007; Wallace et al., 1989). При этом выброс эндотелина-1 случается только на фоне действия кислоты на желудочный эпителий, т.е. скорее в ответ на обратную диффузию кислоты, чем на подавление ЦОГ-1 (Funatsu et al., 2007).

1.5 Оксид азота - регулятор желудочной секреции и гастропротекции

Многочисленные фармакологические и физиологические исследования показали, что NO является одной из основных сигнальных молекул в желудке, которая в зависимости от места синтеза выполняет роль как нейротрансммиттера, так и внутриклеточного вторичного мессенджера, или паракринного агента, обеспечивая разнообразные реакции, включая рецептивную релаксацию, регуляцию кровотока в подслизистом слое и модуляцию секреции экзокринных и эндокринных клеток (Bilski et al., 1994; Brown et al., 1993; Curro et al., 1996; Kato et al., 1998; Koduru et al., 1995; Whittle et al., 1992).

1.5.1 Оксид азота. Синтез и механизм действия

Оксид азота (NO) – первый среди открытых представителей класса газообразных сигнальных молекул, осуществляющих межклеточную коммуникацию и регуляцию физиологических и патологических процессов в различных тканях организма. Обладая большой химической реактивностью вследствие свободно-радикальной структуры, NO в живых тканях имеет период полураспада от 2 до 50 с и быстро окисляется до двуокиси (NO_2), нитрита (NO_2^-) и нитрата (NO_3^-) азота. NO активно вступает в реакцию с супероксидом (O_2^-) с образованием пероксинитрита. Эта реакция замедляется супероксиддисмутазой. Уменьшение биологической активности NO в

организме происходит также за счет связывания с гемоглобином и другими железосодержащими белками (Поленов, 1998; Cary et al., 2006).

Оксид азота был выделен как сосудистый расслабляющий фактор эндотелиального происхождения (Furchgott, Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1987) и мощный ингибитор адгезии тромбоцитов (Radomski et al., 1987) и нейтрофилов (Kubes et al., 1991). Однако вскоре стало понятно, что физиологическая активность NO проявляется также за пределами сердечно-сосудистой системы, в частности как медиатора в ЦНС, НАНХ медиатора, релаксирующего периферическую гладкую мускулатуру, модулятора сократительной активности скелетной мускулатуры и неспецифического иммунного агента (Moncada et al., 1991).

Внутриклеточный NO синтезируется из аминокислоты L-аргинина в присутствии NADPH и кислорода группой ферментов с общим названием синтаза оксида азота (NOS), осуществляющей последовательно 5 окислительных реакций с участием кофакторов флавинмоноклеотида, флавинадениндинуклеотида, тетрагидробиоптерина и протопорфирина IX. В результате в эквимольных количествах продуцируются NO и L-цитруллин. Оксид азота при этом образуется из концевых гуанидинового атома азота L-Arg (Calatayud et al., 2001a).

Выделено и клонировано 3 изоформы NOS, кодируемые отдельными генами. Первичная структура этих белковых молекул существенно различается. Сообщается лишь о 50-60% совпадении аминокислотной последовательности изоформ (Forstermann, Kleinert, 1995; Moncada, Higgs, 1995). Нейрональную (nNOS) и эндотелиальную (eNOS) формы относят к конститутивным синтазам (cNOS). Их активность проявляется в присутствии Ca^{2+} и кальмодулина и не требует других стимулирующих агентов (Palmer, Moncada, 1989). Другая изоформа фермента – это макрофагиальная или индуцируемая NOS (iNOS), активация которой не связана с Ca^{2+} - кальмодулиновой системой (Knowles, Moncada, 1994; Brown et al. 1994).

Конститутивная NOS активируется при увеличении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , который в комплексе с кальмодулином связывается с ферментом, после чего синтезируется небольшое количество оксида азота (Moncada et al., 1991). Активность конститутивной NOS непродолжительна и продуктивность сравнительно невелика (Moncada, Higgs, 1995).

Индуцируемая NOS постоянно взаимодействует с кальмодулином, поэтому находится в тонически активированном состоянии независимо от присутствия Ca^{2+} . Ее продуктивность определяется уровнем экспрессии, который регулируется различными путями при транскрипции (Moncada et al., 1991). В общем виде, работа iNOS зависит от сигналов, сопровождающих инфекцию и воспаление: глюкокортикоидов, липополисахаридов, интерлейкина-1, фактора роста опухолей- α , β -трансформирующего тромбоцитарного фактором роста, и фактора роста фибробластов. В отличие от конститутивной NOS, активация iNOS – отсроченный (обычно на 4-6 часов) и продолжительный процесс (Kroncke et al., 1995; Moncada, Higgs, 1995). В результате действия iNOS в макрофагах, нейтрофилах, в эндотелии сосудов, микроглиальных клетках и астроцитах NO образуется в значительной наномолярной концентрации. Оксид азота в данном случае выполняет функцию относительно неспецифической защиты против бактерий, вирусов и опухолевых клеток, способствуя вместе с другими свободными радикалами реакции фагоцитоза (Марков, 1996). Известен ряд веществ, ограничивающих индукцию iNOS, таких как интерлейкины-4 и -8, моноцитарный хемотатический протеин-1 и фактор деактивации макрофагов (Forstermann, Kleinert, 1995).

Угнетение активности NOS достигается путем связывания флавопротеинов, кальмодулина, гема, а также тетрагидробиоптерин-истощающих агентов. В экспериментальной практике широкое применение в качестве блокаторов NOS нашли структурные аналоги L-Arg, в частности, N_ω -нитро-L-аргинин (L-NNA), N_ω -метил-L-аргинин (L-NMMA), и N_ω -нитро-L-

аргинин-метиловый эфир (L-NAME). Эти агенты обладают аффинностью к эндотелиальной и нейрональной NOS и не являются селективными по отношению к какой-то одной изоформе. Некоторые ингибиторы NOS обладают селективностью по отношению к nNOS (например 7-нитроиндозол) или iNOS (аминогуанидин, L-N6-(1-иминоэтил)лизин, S-алкилированная изотиомочевина) (Hobbs et al., 1999). Тоническим ингибитором eNOS является кавеолин-1 (Sowa et al., 2001).

Другой фармакологический инструмент, часто используемый при изучении физиологической роли оксида азота, — это доноры NO, в том числе применяемые в клинике, такие как нитроглицерин и нитропруссид натрия (SNP) и S-нитрозо-N-ацетил-пеницилламин (Calatayud et al., 2001a).

Образующийся в клетке NO осуществляет сигнальное действие в той же самой клетке и в соседних, в цитоплазму которых газообразная молекула диффундирует очень быстро. Основной молекулярной мишенью для NO является водорастворимая серин-треониновая киназа, гуанилилциклаза ГЦ-I. Изозимы ГЦ-I присутствуют во всех разновидностях гладких мышц, тромбоцитах, отдельных нейронах мозжечка и гиппокампа, дорзальных спинномозговых ганглиях и в почках. Небольшая концентрация этого подтипа фермента обнаружена в сердечной мышце, эндотелии кровеносных сосудов, хондроцитах, остеокластах и некоторых ядрах головного мозга. Другой подтип фермента, ГЦ-II, связан с плазматической мембраной. В слизистой оболочке тонкого кишечника ГЦ-II взаимодействует с регулятором хлоридной проводимости CFTR. Кроме того, ГЦ-II присутствует в нескольких ядрах головного мозга, почках, коре надпочечников, хондроцитах и в легких (Hofmann et al., 2009).

Взаимодействие NO с ГЦ-I запускает фосфорилирование более 10 разновидностей сигнальных молекул, специфичность влияния на которые определяется N-терминальной последовательностью изозима. Во-первых, могут быть задействованы цГМФ-зависимые протеин-киназы (Francis et al.,

[Type here]

2010). Во-вторых, под действием цГМФ активируются ионные каналы. В частности, уменьшается в цитоплазме концентрация Ca^{2+} , который необходим для активации киназы легкой цепи миозина и сокращения гладкой мускулатуры (Lincoln, Cornwell, 1993; Katzung, Chatterjee, 1998). В-третьих, в присутствии цГМФ фосфорилируются фосодиэстеразы (PDE_2 , PDE_3), в результате чего увеличивается концентрация цАМФ в тромбоцитах и стенке сосудов (Eckly, Lugnier, 1994; Maurice, Haslam, 1990).

В последние годы получены подтверждения того, что биологическая функция NO определяется его концентрацией. Было определено 5 уровней концентрации NO для регуляции определенных клеточных процессов: $[\text{NO}] < 1\text{-}30$ нМоль – для цГМФ-зависимых реакций, $[\text{NO}] = 30\text{-}100$ нМоль – для фосфорилирования Akt, $[\text{NO}] = 100\text{-}300$ нМоль для стабилизации HIF-1 α , $[\text{NO}] > 400$ нМоль – для фосфорилирования p53 и нитрозивного стресса (Thomas et al., 2008). Следовательно, низкие концентрации NO, синтезируемые обеими изоформами cNOS, можно считать защитными, стимулирующими выживание клетки и пролиферацию, в то время как высокие концентрации, генерируемые iNOS, были цитотоксическими (Keklikoglu et al., 2008).

1.5.2 NOS и NO в слизистой оболочке желудка

Иммуногистохимическое меченье и гибридизация *in situ* показали, что изоформы cNOS широко экспрессируются в стенке желудка. Эндотелиальная NOS присутствует в кровеносных сосудах мышечного слоя, а также в окружающих нижнюю часть желудочных желез сосудах подслизистого слоя (Whittle et al., 1990; Price et al., 1996). Нейрональная NOS выявляется значительно шире в нейронах миэнтерального сплетения (Bredt et al., 1990; García-Vitoria et al., 2000), в клетках поверхностного эпителия и желудочных желез, включая слизистые клетки (Brown et al., 1992b; Byrne et al., 1997; Ichikawa et al., 1998; Price, Hanson, 1998), главные клетки (Fiorucci et al., 1995a), щеточные клетки (Kugler et al., 1994) и некоторые эндокринные клетки (Burrell

et al., 1996). Вероятно, действие NO, синтезированного локально клетками СОЖ, может распространяться на соседние. Известны расчёты, показывающие, что в течение нескольких секунд до окисления молекула NO способна диффундировать на расстояние свыше 200 мкм (Wood, Garthwait, 1994).

В тесном контакте с клетками экспрессирующими eNOS находятся обкладочные клетки (Berg et al., 2001), но присутствие NOS в самих обкладочных клетках оценивается по-разному. Ранние работы сообщали об отсутствии (Price et al., 1996) или слабой экспрессии фермента в соответствующей клеточной фракции (Brown et al., 1992b). Позднее на изолированных железах была показана коэкспрессия в обкладочных клетках nNOS и NADPH-диафоразы (Premaratne et al., 2001).

Индукцируемая форма фермента (iNOS) встречается не только в макрофагах, но, возможно, и в слизистой оболочке. При этом экспрессия iNOS в слизистой оболочке находится на относительно постоянном уровне, не зависящем от экспериментальных условий и кислотности в полости желудка (Phillipson et al., 2003).

1.5.2.1 Оксид азота модулирует секрецию обкладочных клеток

Влияние NO на желудочную секрецию кислоты изучено как на животных моделях, так в клеточных и тканевых культурах. Вполне очевидно, что NO оказывает разнообразное действие на обкладочные клетки, проникая в их цитоплазму, либо опосредованно через эндокринные клетки желудочных желез. В изолированных железах и в культуре обкладочных клеток аппликация доноров NO угнетала секрецию кислоты, вызванную гистамином, либо цАМФ. С другой стороны, блокаторы NOS усиливали реакцию (Berg et al., 2005; Brown et al., 1993a; Kim, Kim, 1996).

Как во многих других тканях, основным подтвержденным механизмом угнетающего влияния NO на обкладочные клетки является взаимодействие с внутриклеточной растворимой ГЦ-І с образованием цГМФ. Проникающий

через мембраны аналог цГМФ (дибутирил- цГМФ) воспроизводил эффекты NO (Berg et al., 2005). До сих пор механизмы действия цГМФ в обкладочных клетках изучены недостаточно. По аналогии с гладкой мускулатурой высказывается предположение, что действие цГМФ, через протеинкиназу G (PKG), снижает уровень цитоплазматического Ca^{2+} . Теоретически возможно, что, уменьшая концентрацию Ca^{2+} , NO/цГМФ вызывает уменьшение секреции кислоты путем угнетения кальций-зависимой транслокации H^+ , K^+ -АТФазы в апикальной мембране обкладочной клетки (Urushidani, Forte, 1997). Другой возможный путь торможения секреции кислоты - через NO/цГМФ зависимую активацию PDE_2 , что усиливает деградацию цАМФ (Bentley, Beavo, 1992). Кроме того, цГМФ может через PKG фосфорилировать Cl^- каналы CFTR (Vaandrager et al., 1998). Увеличение концентрации Cl^- проводимости ведет к деполяризации мембраны, возможно, не только обкладочных, но и соседних эндокринных клеток (Ikari et al., 1999). Наконец, NO может оказывать тормозное влияние на обкладочные клетки через угнетение КА непосредственно или через уменьшение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} (Puscas et al., 2001).

Системное влияние NO на секрецию кислоты, которое рассматривалось в экспериментах на изолированном желудке, либо на целом животном, существенно сложнее, чем в изолированных железах и культуре клеток, поскольку связано с действием таких факторов как кровоток, нервные и гормональные сигналы. В частности, в изолированном желудке мыши неселективный блокатор NOS (L-NNA) угнетал продукцию кислоты, вызванную стимуляцией блуждающего нерва, M1-холиномиметиками, а также пентагастрином, что указывает на потенцирующую роль эндогенного NO по отношению к эффекту желудочных секретогогов. В то же время, не было показано модулирующего участия NO в секреторной реакции, вызванной гистамином. Сама продукция гистамина, стимулированная пентагастрином или бетанехолом, уменьшалась после блокады NOS. Донор

NO в небольшой концентрации усиливал продукцию гистамина и кислоты. Все это позволило предположить, что реакция обкладочных клеток на эндогенный NO в желудке может быть опосредована гистамин-продуцирующими клетками (Hasebe et al., 2005).

1.5.2.2 Оксид азота в главных клетках желудочных желез

Данные об экспрессии NOS и функциональной роли NO в главных клетках желудочных желез не столь обширны, как сведения об обкладочных клетках. В теле желудка у крыс nNOS экспрессируется наиболее стабильно именно в главных клетках, что установлено иммуногистохимическими методами и с помощью гибридизации *in situ* (Garcia-Vitoria et al., 2000). Фермент локализовался в основном в мембранах гранул, содержащих пепсиноген и сконцентрированных у апикальной поверхности, что может указывать на его причастность к внутриклеточному транспорту гранул и секреции пепсиногена (Fiorucci et al., 1995a,b; Garcia-Vitoria et al., 2000). Кальций-мобилизующие агенты, такие как карбохол, холецистокинин и гастрин, которые стимулируют секрецию пепсиногена (Raufman, 1992), одновременно усиливают синтез NO в главных клетках. В культуре главных клеток доноры NO, а также 8-бромо-цГМФ повышают продукцию пепсиногена, а блокада NOS уменьшает внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} и цГМФ и угнетает секрецию пепсиногена, вызванную введением карбохолина (Fiorucci et al., 1995a). Эти сведения в целом подтверждены в опытах на наркотизированных крысах, у которых с эндогенным NO связано усиление секреции пепсиногена в ответ на растяжение желудка (Ito et al., 2008). В то же время известны и противоположные данные. В частности, Окаяма и соавт. (Okayama et al., 1995) сообщали, что в культуре главных клеток повышение концентрации цГМФ, вызванное донором NO, приводило к угнетению продукции пепсиногена, а аппликация дибутирил- цГМФ была связана с уменьшением концентрации Ca^{2+} в цитоплазме.

1.5.2.3 Влияние NO на секрецию слизи и бикарбонатов в пришеечных и поверхностных эпителиальных клетках

Значительная иммунореактивность NOS, которая наблюдается в поверхностных эпителиальных клетках слизистой оболочки и в пришеечных клетках желез (Kugler, Drenckhahn, 1994), подтверждает роль NO как регулятора секреции слизи желудочным эпителием. В культуре поверхностных эпителиальных клеток NO активирует растворимую ГЦ-I, что сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации цГМФ (Brown et al., 1993b). Стоит отметить, что это единственное известное из доступной литературы сообщение о присутствии ГЦ-I в эпителии желудка.

Эндогенный синтез NO потенцирует холинергическое усиление секреции муцина и способствует утолщению слоя слизи у крыс (Price et al., 1994). Полостная аппликация доноров NO или аналогов цГМФ имеет сходный эффект (Brown et al., 1992a). Основным звеном в регуляции продукции муцина в желудочных эпителиоцитах является цАМФ, причем накопление этого нуклеотида происходит под действием ПГЕ₂, а продукцию последнего стимулирует ацетилхолин (АХ) (Nakahari et al., 2002; Ohnishi et al., 2001; Shimamoto et al., 2005). Тот же самый эффект отмечен в изолированных слизистых клетках антрального отдела желудка морской свинки, в которых неметаболизируемый аналог цГМФ потенцировал экзоцитоз муцина, вызванный аппликацией АХ, но сам по себе действия не оказывал (Saad et al., 2006).

Данных об участии изоформ NOS в секреции слизи сравнительно немного. Основное мнение сводится к тому, что фермент представлен скорее нейрональной формой (nNOS), чем эндотелиальной (Price et al., 1996). В то же время, известны работы одного коллектива исследователей, показавшие, что у крыс неспецифический ингибитор конститутивных NOS (L-NNA) не влиял на толщину слоя слизи. Авторы полагают, что накопление слизи, в частности толщина плотно прилежащего слоя, в значительной степени связаны с

активностью в эпителиальных клетках малоизученной iNOS. Последнее подтверждено как в опытах с использованием селективного блокатора iNOS (L-NIL), так и мышей нокаутных по гену iNOS (Phillipson et al., 2008).

Немногочисленные исследования влияния системной и локальной аппликации блокаторов NOS либо доноров NO на секрецию HCO_3^- имеют большое значение для понимания механизмов адаптивной гастропротекции, а также в связи с включением доноров NO в качестве гастропротекторного агента в новое поколение НПВП (Muscara, Wallace, 1999; Brzozowski et al., 2008). Тем не менее результаты функциональных тестов не всегда совпадают, что, безусловно, связано с множественными прямыми и опосредованными влияниями этой молекулы *in vitro* и *in vivo*, которые реализуются не только на уровне эпителиальных клеток, но через нервные и сосудистые воздействия.

Системное введение блокатора конститутивных NOS (L-NAME) приводило к парадоксальному, на первый взгляд, дозозависимому усилению базальной секреции HCO_3^- в иннервированном желудке *in situ*, которое коррелировало с подъемом артериального давления и ослабевало в результате действия адrenoблокаторов. М- и N-холиноблокаторы, ИНД, а также ваготомия отменяли эффект L-NAME (Takeuchi et al., 1993, 1994b, 1996; Lamarque et al., 1997). Внутривенное введение доноров NO, напротив, понижало базальный уровень секреции HCO_3^- (Takeuchi et al., 1993; Aihara et al., 2006). На собаках с изолированным по Гейденгайну малым желудочком, который, как известно, лишен преганглионарной вагусной иннервации, системная блокада cNOS приводила к угнетению как базальной, так и стимулированной секреции бикарбонатов (Bilski et al., 1994). В изолированном желудке мыши серозная аппликация донора NO сопровождалась усилением базальной секреции HCO_3^- , что опосредовалось активацией ГЦ и синтезом ПГ (Kita et al., 2008). Очевидно также, что секреция бикарбонатов в желудке зависит от регулируемых нитергической системой центральных сосудистых реакций и

местного кровотока. Например, увеличение базальной секреции бикарбонатов отмечается при портальной гипертензии (Lamarque et al., 1997).

Участие нитрергической системы в усилении секреции HCO_3^- в ответ на химическое раздражение СОЖ в известных литературных источниках не доказано. Ранние исследования не выявили действия эндогенного NO на продукцию HCO_3^- , стимулированную внутрижелудочной аппликацией гипертонического раствора (Takeuchi et al., 1994a). Позднее было установлено, что эффект неселективной блокады конститутивных NOS проявляется только при сильном раздражении СОЖ. Так L-NAME не действовал на секрецию HCO_3^- , вызванную аппликацией 100 мМ HCl, но ослаблял реакцию на более концентрированный раствор кислоты (200 мМ) или на кислоту, добавленную к гипертоническому раствору (Aihara et al., 2006).

1.5.3 NOS и кровоток в желудке

Синтез оксида азота, происходящий в основном в эндотелии сосудов, играет ведущую роль в поддержании базового кровотока в желудке (Palmer et al., 1987). В определенной степени тонус сосудистой гладкой мускулатуры может регулироваться NO, выделяемым из нервных окончаний (Martinez-Cuesta et al., 1996; Moreno et al., 1996).

Действие NO/ГЦ-I/цГМФ приводит к релаксации крупных и мелких артерий. При активации ГЦ отмечено торможение гормональной вазоконстрикции и вазоконстрикции, вызванной деполяризацией клетки. Это происходит в результате ГЦ-I-зависимого фосфорилирования IP_3 -рецептор связанного субстрата цГМФ киназы и ослабления внутриклеточного IP_3 -зависимого высвобождения Ca^{2+} . Другой мишенью ГЦ-I во время релаксации сосудов являются Ca^{2+} -зависимые K^+ каналы, открытие которых происходит в результате прямого фосфорилирования. Также ГЦ-I может активировать саркоплазматическую и эндоплазматическую ретикулярную Ca^{2+} -АТФазу, что усиливает обратный захват Ca^{2+} . Фосфорилирование с помощью цГМФ

ослабляет активность фосфолипазы С и синтез IP_3 . Наконец, релаксация сосудов под действием ГЦ-I/цГМФ может достигаться путем фосфорилирования фосфатазы легкой цепи миозина (Hofmann et al., 2009).

Кровоток в подслизистом слое активно реагирует на изменение химического фона в полости желудка, например, при раздражении СОЖ кислотой или локальной аппликации КАПС. Эти реакции в основном связаны локальным выделением КГРП и с продукцией NO. Исходно для СОЖ рассматривалась следующая схема КГРП-зависимого усиления синтеза NO. КГРП выделяется из первичных афферентных окончаний в непосредственной близости от артериол подслизистого слоя и диффундирует к клеткам эндотелия (Lippe, Holzer, 1992). Действуя на рецепторы эндотелиальных клеток, КГРП активирует синтез цАМФ и NOS, в результате чего образуется NO, проникающий в гладкомышечный слой (Elliot, Wallace, 1998). В качестве подтверждения было показано, что вазодилатация в подслизистом слое, вызванная действием КАПС ослабевала в присутствии неселективного блокатора cNOS, L-NAME (Whittle et al., 1992). Более позднее исследование с применением селективного блокатора nNOS (N^5 -[imino(propylamino)methyl]-L-ornithine, NPLA), селективного ингибитора eNOS (N^5 -(1-iminoethyl)-L-ornithine, L-NIO) и ингибитора iNOS (1400W) дало неожиданные результаты. А именно, адаптивное усиление подслизистого кровотока при аппликации КАПС оказалось связанным с действием nNOS. Селективная блокада eNOS вызывала непродолжительное повышение базального тонуса сосудов, но не влияла на гиперемию, вызванную капсаицином, равно как и блокада iNOS. В подтверждение этому nNOS иммунореактивность была выявлена в терминалях КЧПА, что говорит о возможности прямого выделения NO из афферентных терминалей (Raimura et al., 2013).

1.5.4 Функции NO в нервном сплетении желудка

Неадренергические и нехолинергические (НАНХ) волокна автономной нервной системы обеспечивают тормозные воздействия в ЖКТ (Abrahamsson, 1986). Хотя часть НАНХ реакций связана с действием нейропептидов и АТФ, их основной эффект реализуется через NO (Toda, Herman, 2005). Нитергические сигналы передают центробежные парасимпатические преганглионарные волокна и ганглии. Синтаза оксида азота присутствует в небольшой популяции (5-15%) нейронов дорзального комплекса вагуса (Guo et al., 2001), участвующего в регуляции двигательной активности ЖКТ (Zheng et al., 1999; Krowicki et al., 1997). В отростках этих нейронов, идущих вместе с вагусом к нижнему пищеводному сфинктеру и желудку (Zheng, Berthoud, 2000), выявляется NADPH-диафораза ассоциированная с NOS (Hyland et al., 2001). Нейрональная NOS из тел нитергических нейронов дорзального моторного ядра (ДМЯ), по-видимому, не транспортируется на периферию. Вызванные раздражением блуждающего нерва или микроинъекцией L-глутамата в ДМЯ сокращения стенок желудка, равно как и НАНХ релаксация полностью блокировались гексаметонием, что говорит об исключительно Н-холинергической природе прегангионарных вагусных влияний на моторику желудка (Zhou et al., 2008).

Выявление NOS-позитивных терминалей в ядрах вагусного комплекса предполагает участие NO и в центральном афферентном контроле функций ЖКТ, что подтверждено в опытах с микроинъекцией ингибиторов NOS в эти структуры (Krowicki et al., 1997). Кроме того, оксид азота присутствует в качестве медиатора в афферентных путях. В узловатом ганглии крысы от 27 до 33% нейронов, связанных чувствительными нервными окончаниями с мышечным слоем и слизистой оболочкой желудка, экспрессируют nNOS. Однако на периферию из тел афферентных нейронов nNOS не транспортируется, и в периферических вагусных афферентных волокнах, которые в стенке желудка распределяются между гладкомышечными

клетками, в подслизистом слое, в нервных ганглиях, не выявляется (Page et al., 2009). Исключение составляет nNOS, которая содержится в окончаниях капсаицин-чувствительных волокон (Riamura et al., 2013).

В миэнтеральном сплетении желудка у животных и человека NOS-позитивные нейроны формируют многочисленную (до 60%) популяцию (Manneschi et al., 1998; Peng et al., 2001), причем их наибольшая плотность обнаруживается в антральной области (Peng et al., 2001). Подтвержденным фактом является то, что nNOS-содержащие миэнтеральные нейроны не экспрессируют холинацетилтрансферазу (ChAT), что говорит о существовании в сплетении желудка двух неперекрывающихся популяций nNOS-позитивных и ChAT-позитивных нейронов (Schicho et al., 2001). Большая часть NOS-позитивных нейронов направляет свои отростки в кольцевой мышечный слой, в то время как отростки меньшей части обнаруживаются в подслизистом слое (Manneschi et al., 1998). В желудке морских свинок доля проецирующихся на СОЖ волокон, содержащих только NOS, равняется 8%, а доля волокон, совместно экспрессирующих NOS и NPY, и, возможно, VIP, достигала 19 %. Представляет интерес поляризованность проекций в СОЖ нервных волокон с различным медиаторным кодом, которая в определенной мере соответствует таковой в кишечнике, но в желудке не получила функционального объяснения. От тел нейронов, содержащих ChAT, идут преимущественно восходящие волокна, в то время как от NOS-позитивных нейронов - нисходящие. Нитрегические нервные проекции к СОЖ идут в основном от клеток, расположенных в ганглиях малой кривизны, а ChAT-позитивные волокна берут начало из большой кривизны (Reiche, Schemann, 1999).

Раздражение СОЖ крысы растворами соляной кислоты большой концентрации (0.35-0.7М) стимулировало Fos в 2-16% клеток миэнтерального сплетения тела желудка. Примерно 50% нейронов, экспрессирующих Fos в ответ на внутрижелудочную аппликацию 0.5 М HCl, оказались

[Type here]

нитрегрическими. При этом не было замечено активации холинергических нейронов (Schicho et al., 2001). Дополнительный анализ медиаторного кода данной группы нейронов выявил в них также присутствие VIP и NPY, что в целом свидетельствует об активации тормозных путей автономного сплетения желудка, когда в полости органа присутствует кислота. Нейрохимический анализ показал, что с-Fos-экспрессирующие нейроны не имеют признаков типичных сенсорных нейронов (Schemann, Wood, 1989; Furnes et al., 1998). Эти мотонейроны иннервируют преимущественно наружный мышечный слой, но не слизистую оболочку. Деафферентация с помощью КАПС, а также блокада N-холинорецепторов гексаметонием значительно снижали уровень с-Fos, что говорит о вовлечении этих нейронов в центральные и локальные рефлекторные пути (Schicho et al., 2003). В целом нервная реакция на сильное закисление полостного содержимого желудка, выражающаяся в активации с-Fos в группе нитрегрических нейронов, вероятно, опосредует релаксацию в ответ на повреждение СОЖ (Takeuchi et al., 1987a), а также расширение сосудов (Ko, Cho, 1996). В то же время, активируемые в присутствии кислоты NOS-позитивные нейроны, скорее всего, не имеют отношения к регуляции функций СОЖ, что подтверждается отсутствием в них иммунореактивности КГРП, которая характерна для волокон, иннервирующих секреторную часть СОЖ (Ekblad et al., 1985; Berthoud, 1996). СОЖ вообще в малой степени иннервируется нитрегрическими волокнами, т.к. клетки коэкспрессирующие КГРП/NOS составляют совсем небольшую долю NOS-позитивных нейронов миэнтерального сплетения (Berthoud, 1996).

Наиболее изученная функция NO, синтезированного в миэнтеральном нервном сплетении желудка, — это участие в релаксации гладкомышечного слоя в стенке органа, являющаяся конечным этапом рефлекторной рецептивной и адаптивной вагусной релаксации в ответ на увеличение давления (Desai et al., 1991; Mashimo et al., 2000). Выделяющийся из нервных окончаний NO запускает релаксацию желудка, действуя в гладкомышечных

клетках через растворимую ГЦ-I, PKA и PDE5 (Murthy, 2001). Также действие NO на мышечный тонус желудка может быть связано с пресинаптическим угнетением холинергических вагусных эфферентов (Paterson et al., 2000).

1.5.5 Роль NO в поддержании целостности СОЖ

Общепринято, что оксид азота является одной из главных гастропротективных молекул, хотя его роль в поддержании целостности СОЖ далеко не однозначна. Физиологическая концентрации NO, синтезированного cNOS, оказывает выраженное защитное действие, в то время как большие дозы NO, продуцируемые iNOS по мере развития воспалительного процесса, имеют обратный эффект. Аналогичным образом действуют разные концентрации экзогенного NO, способные вызвать полностью противоположные реакции (Wallace, Miller, 2000).

Исследования с применением ингибиторов cNOS продемонстрировали различное участие NO в протективных реакциях, включая подавление продукции медиаторов воспаления и цитокинов тучными клетками и макрофагами, уменьшение адгезии лейкоцитов на эндотелии сосудов, снижение проницаемости эпителия, а также на стимуляцию секреции муцина и бикарбонатов (Wallace, 1996). Вызванный блокаторами NOS дефицит NO делает СОЖ более подверженной ulcerогенным воздействиям (Whittle et al., 1990), в то время как доноры NO выполняют защитную функцию (MacNaughton et al., 1989). Активация cNOS, но не iNOS, является одним из основных факторов адаптивной гастропротекции, развивающейся под действием слабых ирритантов (Ko, Cho, 1999).

Известная способность малых доз доноров NO предотвращать поражения слизистой оболочки ЖКТ была использована при создании особого класса НПВП, которые содержат доноры NO. В отличие от классических форм НПВП эти препараты в значительно меньшей степени повреждают слизистую

оболочку ЖКТ, сохраняя при этом противовоспалительные, анальгетические и жаропонижающие свойства (Muscara, Wallace, 1999; Brzozowski et al., 2008).

Экспрессия iNOS, которая наблюдается в позднюю фазу реакции СОЖ на ulcerогенные воздействия, сопровождается выделением NO в большой концентрации (Yamamoto et al., 1999). Пероксинитрит оказывает определенное цитотоксическое действие, окисляя ряд соединений, включающих соли аскорбиновой кислоты, сульфгидрильные группы и тиолы, а также вызывая перекисное окисление мембранных липидов и повреждение ДНК (McCafferty et al., 2000).

Оксид азота способен взаимодействовать с железосодержащими ферментами, в частности с электрон-транспортными системами митохондрий, цитохромом P-450 и COX (Beckman, Koppenol, 1996; Palacios-Callender et al., 2004; Cuzzocrea, Salvemini, 2007). Поскольку в структуре NOS также присутствует гем, существует возможность, что NO может оказывать обратное влияние на активность синтазы оксида азота, в частности iNOS (Cirino et al. 1996).

1.5.6 Взаимодействие нитрергической и простагландиновой систем регуляции

Молекулы NO и ПГ в здоровой ткани и при воспаления продуцируются в непосредственной близости друг от друга. Несмотря на то, что действие NO и ПГ реализуется через различные внутриклеточные сигнальные пути, в большинстве случаев они действуют синергично, влияя на одни и те же физиологические и патофизиологические процессы. Тем не менее обобщение данных о взаимном влиянии NO и ПГ представляет определенную сложность в связи с тем, что эти системы взаимодействуют на разных уровнях локальной регуляции (Cuzzocrea, Salvemini, 2007). Впервые возможность действия NO на активность ЦОГ была показана группой Нидельмана на изолированных семенных пузырьках овец, в которых экзогенный газообразный NO усиливал

активность ЦОГ-1, что приводило к многократному увеличению продукции ПГЕ₂ (Salvemini et al., 1995). Сходное усиление активности ЦОГ-2 и продукции ПГ в фибробластах, стимулированных IL-1 β , наблюдалось под действием газообразного NO или в присутствии доноров NO. В результате была предложена концепция, рассматривающая ЦОГ как важный внутриклеточный «рецептор», служащий для усиления либо модулирования сигналов NO (Salvemini, Masferrer, 1996; Salvemini et al., 1995).

Активация ЦОГ-1 малыми концентрациями оксида азота, синтезированного конститутивными изоформами ЦОГ, приводящая к синергичному действию цГМФ и цАМФ, отмечена в норме при регуляции тонуса сосудов, в цитопротективных механизмах почечных канальцев и кишечника, при агрегации тромбоцитов и адгезии лейкоцитов (Cuzzocrea, Salvemini, 2007). Кроме того, при активации ЦОГ-1 с помощью NO запускается секреция нейропептидов, в частности лютеинизирующего гормона (Rettori et al., 1992). Регуляторные ферментативные каскады, связанные с цАМФ- и цГМФ) могут взаимодействовать на клеточном уровне (Tsai et al., 1994). Ваткинс и соавт. (Watkins et al., 1997) показали, что в культуре клеток A549 человеческой карциномы легких цГМФ сам по себе, либо в комбинации с интерлейкином-1 β , вызывал увеличение продукции ПГЕ₂, активируя ЦОГ. В изолированной ДПК лягушки быка эндогенный и экзогенный цГМФ усиливали каталитическую активность ЦОГ-1, что приводило к ПГ-зависимой секреции HCO₃⁻. Концентрация ПГЕ₂ в этой модели возрастала также под действием донора NO либо dbcГМФ. Эти реакции прекращались в присутствии ИНД, но не NS-398 (селективного ингибитора ЦОГ-2) (Furukawa et al., 2000). Подобное объединение нитрергической и простагландиновой регуляции имело место в реакции слизистой оболочки ДПК на полостную кислоту. Донор NO (NOR3) стимулировал выделение ПГЕ₂ в концентрации достаточной для увеличения продукции HCO₃⁻, причем оба эти эффекта NOR3 подавлялись ИНД (Sugamoto

et al., 2001; Furukawa et al., 1999). Дальнейшие исследования показали, что функциональный контакт нитрергической и простагландиновой систем происходит также на уровне интрамурального нервного сплетения, где опосредуется капсаицин-чувствительными афферентами (Takeuchi et al., 2003; Boku et al., 2001).

В исследованиях *in vivo* было установлено, что взаимное влияние NO и ПГ играет важную роль в патофизиологических процессах. Взаимодействие iNOS и ЦОГ-2 представляет собой мощный механизм усиления воспалительного ответа, который отчасти нивелируется ингибиторами iNOS (Salvemini et al., 1996). Вероятно, потенцирующий эффект по отношению к ЦОГ-2 на фоне воспаления СОЖ, вызванного бактериальным липополисахаридом, может осуществляться также за счет синтеза NO конститутивными ферментами (Uno et al., 2004).

Влияние NO на активность ЦОГ-1 и ЦОГ-2 зависит в значительной мере от скорости синтеза NO и степени окисления молекулы. Большая концентрация NO при воспалении, например, в фибробластах и астроцитах, предполагает прямой контакт его окисленных форм с ферментом ЦОГ-2, минуя этап ГЦ-I/цГМФ (Mollace et al., 1995). К молекулярным механизмам действия NO на активность ЦОГ прежде всего необходимо отнести антиоксидантный эффект NO. Оксид азота связывает с образованием пероксинитрита (ONOO^-) супероксид-ионы (O_2^-), в том числе выделяющиеся под действием ЦОГ, в результате чего ослабляет автоинкативацию ЦОГ-1,2 и поддерживает синтез ПГ (Egan et al., 1976; Gryglewski et al., 1986). Кроме того, ONOO^- взаимодействует с протетической группой гемоглобина, и остатками тирозина циклооксигеназного сайта ЦОГ. Предполагается, что, взаимодействуя с Fe в составе гема, ONOO^- ускоряет процесс катализа (Karthain et al., 1988). Модификация под действием ONOO^- тирозинового остатка, особенно Tyr385, напротив, инактивирует фермент (Boulos et al., 2000; Goodwin et al., 1998; Shi et al., 2000). Так ONOO^- модифицирует ЦОГ при

многих патологических состояниях, включая атеросклероз, болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера (Kim, 2014).

Оксид азота также способен активировать ЦОГ через не связанное с гемом образование S-нитрозотиолов (Hajjar et al., 1995). Такой путь активации характерен для ЦОГ-2, взаимодействие которой с iNOS, а в нервной ткани и с nNOS, приводит к прямому S-нитрозилированию радикалов цистеина (Tian et al., 2008). Кроме того, как показано для макрофагов и хондроцитов, NO может усиливать экспрессию ЦОГ-2, действуя через протеинкиназы и p38 киназу (Notoya et al., 2000).

Способность NO активировать ЦОГ напрямую независимо от цГМФ-связанных путей показана и ЖКТ. В частности, донор NO, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, стимулирует продукцию ПГЕ₂ в культуре слизистых клеток желудочного эпителия кролика. Причем эффект NO сохранялся после аппликации блокатора растворимой ГЦ – метиленовой сини, т.е. NO действовал на ЦОГ независимо от цГМФ (Uno et al., 1997). Аналогичные результаты были получены на полосках толстой кишки крысы, где другой донор NO, нитропруссид, но не dbcГМФ, усиливал транспорт Cl⁻, вызванный эндогенными ПГЕ₄ (Wilson et al., 1996).

Данные о влиянии ПГ на активность NOS и ЦОГ не так многообразны, тем не менее известно, что в случае гастрита, вызванного инфекцией *H. pylori*, ПГЕ₂ потенцирует iNOS (Franco, Talamini, 2009). Увеличение концентрации ПГЕ₂ приводит к увеличению экспрессии ЦОГ-2 и к активации iNOS. Оба эффекта осуществляются посредством аденилатциклазы через связанные с G-белками простагландиновые рецепторы, что, в конечном счете, приводит к повышению уровня цАМФ (Minghetti et al., 1997). Предполагается, что цАМФ активирует iNOS несколькими путями: ускоряя мембранный транспорт L-Arg внутрь клетки, либо подавляя внутриклеточное превращение L-Arg в L-цитруллин (Ferro et al., 1999). Другой возможный путь связан с индукцией ГТФ циклогидролазы I (Pluss et al., 1996). На основе этих данных выдвигается

[Type here]

предположение, что конститутивная продукция ПГ, осуществляемая ЦОГ-1, оказывает противоположное действие на индуцируемые изоформы NOS и ЦОГ (Minghetti, Levi, 1998), в то время как действие на сами конститутивные ферменты останется неподтвержденным.

Как видно из вышеизложенного, NOS и ЦОГ во многих тканях взаимно потенцируют друг друга. Тем не менее есть сведения о негативном взаимодействии NO и ПГ, причем это явление отмечено и в желудке. У крыс системная инъекция ингибиторов NOS вызывала примерно 50% усиление синтеза ПГЕ₂ в СОЖ. Индометацин, неселективный блокатор ЦОГ, в свою очередь, существенно усиливал базальную активность cNOS, но не влиял на активность cNOS и экспрессию iNOS, вызванную ирритацией СОЖ (Ko, Cho, 1999). Полученный эффект авторы объясняют сложным взаимодействием нервных и гуморальных факторов, сопровождающих биосинтез эндогенных NO и ПГ *in vivo*. Стоит отметить несколько исследований *in vitro*, продемонстрировавших сходные результаты. Инкубация культуры эндотелиальных клеток быка с NO приводила к угнетению продукции 6-кето-ПГF_{1α} (Doni et al., 1988). Кроме того, в изолированных подкожных венах собак блокада ЦОГ усиливала продукцию NO (Illiano et al., 1996).

1.6 Физиологическое значение капсаицин-чувствительных первичных афферентов в желудке

Изменение кислотности в просвете ЖКТ, происходящее вследствие желудочной секреции хлороводородной (соляной) кислоты, рассматривается как основной фактор регуляции пищеварения. Кислота активирует пищеварительные ферменты и защищает ЖКТ от патогенных микроорганизмов (Holzer, 2011; Canani, Terrin, 2010). Физиологические функции кислоты в желудке включают превращение пепсиногена в пепсин, денатурацию пищевого белка и участие в абсорбции некоторых нутриентов, стимуляцию энтероэндокринной секреции, продукцию паракринных факторов

[Type here]

(Pohl et al., 2008). Увеличение кислотности является сильным болевым стимулом во многих органах, где вследствие ишемии и воспаления развивается ацидоз. Значительное повышение концентрации кислоты приводит к разрушению слизистой оболочки верхних отделов ЖКТ (Steen et al., 1992; Kress and Waldmann, 2006; Wemmie et al., 2006; Holzer, 2009). На изменение полостной кислотности и на тканевой ацидоз реагируют как эпителиальные клетки, так и интрамуральные нейроны, являющиеся первичным звеном местных механизмов поддержания кислотно-щелочного равновесия и системных процессов регуляции гомеостаза.

1.6.1 Сенсоры кислоты в ЖКТ

Впервые предположение о том, что в чувствительных нервных клетках имеются молекулярные структуры, реагирующие на изменения в физиологическом диапазоне кислотности окружающей среды, опубликованы в 1981 г. (Krishtal, Pidoplichko, 1981). С тех пор было выявлено несколько молекул, чувствительных к концентрации протонов в межклеточном пространстве. Наличие таких молекулярных сенсоров подтверждается генерацией в дорзальных спинномозговых ганглиях в ответ на увеличение тканевой кислотности двух типов входящих токов: быстро инактивируемого входящего натриевого тока, зависящего от концентрации H^+ , с порогом активации около pH 7, и медленного тока в нейронах, реагирующих на капсаицин, переносимый Na^+ , K^+ и Ca^{2+} , менее чувствительного к протонам (активируются при $pH \leq 6.2$). Последний тип токов имеет большое сходство с проводимостью через ванилоидный ионный канал переменного потенциала 1-го типа (TRPV1), под действием кислоты, в то время как первый тип напоминает токи кислото-чувствительных ионных каналов (Waldmann et al., 1997; Kress, Waldmann, 2006). И те и другие токи являются наиболее вероятным результатом активации мембранных сенсоров кислоты, в частности в СОЖ.

1.6.1.1 Кислоточувствительные ионные каналы и мембранные рецепторы, реагирующие на изменение pH

Кислоточувствительные ионные каналы (ASICs) относят к семейству потенциал-независимых амилорид-чувствительных катионных дегенерин/эпителиальных каналов, которое у млекопитающих кодируется 3 генами (*ACCN1*, *ACCN2* и *ACCN3*) и экспрессируется в виде 5 сплайс-вариантов: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b и ASIC3. При активации ASICs усиливается преимущественно натриевый ток, но через каналы могут проходить и другие катионы, например Ca^{2+} (Kellenberger, Schild, 2002; Kress, Waldmann, 2006; Wemmie et al., 2006). Субъединицы ASIC1b, ASIC2b и ASIC3 находят в нейронах спинальных ганглиев и в афферентах блуждающего нерва, иннервирующих ЖКТ и другие внутренние органы (Kress, Waldmann 2006; Wemmie et al. 2006; Holzer, 2007b). Ретроградное мечение у крыс выявило ASIC3-иммунореактивность в 75% нейронов узлового ганглия и 82% клеток дорзальных спинальных ганглиев, дающих проекции к желудку (Schicho et al., 2004).

Вполне понятно, что вследствие своей особой активности протоны влияют также на конформацию многих мембранных белков, поэтому к восприятию кислотности афферентными нервными окончаниями, кроме описанных выше, имеют отношение многие другие молекулярные структуры. Калиевые каналы образуют тандемные поры ($\text{K}_{2\text{P}}$) и кодируются генами KCNK, они составляют одно из семейств внутри большого суперсемейства K^+ каналов (Goldstein et al. 2005; Duprat et al. 2007). Каналы этого семейства участвуют в поддержании потенциала покоя, входного сопротивления мембраны и возбудимости нейрона. Типы $\text{K}_{2\text{P}}$, TASK-1, TASK-2, TASK-3, TRESK, TREK-1, TREK-2 и TRAAK, экспрессируются в первичных афферентных нейронах и могут реагировать на изменение кислотности (Holzer 2009). В частности, каналы TASK-1, TASK-2 и TASK-3 закрываются при

внеклеточном закислении, что увеличивает возбудимость нейрона (Goldstein et al. 2005; Duprat et al. 2007).

В качестве сенсоров кислоты выступают и некоторые рецепторы, связанные с G белками (GPCR). Кислоточувствительные GPCR встречаются в малых афферентных нейронах дорзальных ганглиев спинного мозга, обеспечивающих ноцицепцию (Huang et al. 2007). Их функциональные изменения отмечаются при сдвиге pH в диапазоне 7.2-7.5, а при pH 6.4-6.8 происходит их полная активация (Ludwig et al. 2003; Tomura et al., 2005).

Пуриновые рецепторы P2X представляют собой мембранные катионные каналы, открывающиеся при взаимодействии с внеклеточным АТФ. Они образованы несколькими субъединицами (P2X1 - P2X7), собранными в гомо- и гетеротримеры или гексамеры (North 2002; Burnstock, 2007). Эти рецепторы экспрессируются в первичных афферентных нейронах узлового ганглия и дорзальных ганглиев спинного мозга (Burnstock, 2007). Активность субъединиц P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5 и P2X7 модулируется внеклеточным pH (Holzer, 2003), причем реакция зависит от присутствия АТФ или родственных пуринов, действие которых как агонистов усиливается при снижении внеклеточного pH (Xu, Huang, 2002).

Значительную чувствительность к колебаниям в физиологическом диапазоне внеклеточного и внутриклеточного pH проявляют K^+ каналы входящего выпрямления (Kir), нифедипин-чувствительные Ca^{2+} каналы L-типа (Holzer, 2009) и многие ионные транспортеры, включая Na^+/H^+ обменные белки (Akiba, Kaunitz, 2009). Перечисленные выше каналы, в отличие от ASICs и рецептора транзитного потенциала, речь о котором пойдет дальше, не рассматриваются как непосредственные сенсоры кислоты, скорее с их участием внешняя кислотность модулирует возбудимость клеточной мембраны при ацидозе (Holzer, 2009).

1.6.1.2 Ванилоидный рецептор 1-го типа

Среди мембранных сенсоров кислоты, в том числе в нервном сплетении ЖКТ, преобладают и наиболее подробно изучены представители большого семейства мембранных рецепторов транзитного потенциала ванилоидных 1-го типа (TRPV1), относящиеся к обширному семейству TRP, которое у млекопитающих кодируется примерно 28 генами, (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002; Montell et al., 2002).

В настоящее время обсуждается две основных гипотезы о функциональном назначении TRP. Одна предполагает, что TRP — это сенсоры разнообразных эндогенных и экзогенных стимулов. Другая, напротив, утверждает, что с участием TRP в клетке передаются сигналы, которые приходят через PLC, активируемую G-протеин связанными рецепторами (Montell, 1997; Clapham, 2003). TRPV1 каналы млекопитающих инактивируются, связываясь с фосфатидилинозитолом 4,5-бифосфатом (PIP₂), и активируются при гидролизе PIP₂ (Runnels et al., 2002). Управлять TRP каналами могут также некоторые производные липидов. Эндоканнабиноид анандамид и его метаболит арахидоновая кислота активируют TRPV4 через образование эйкозаноидов и цитохрома P450 (Watanabe et al., 2003).

Характерная особенность TRPV1 — это взаимодействие с природными соединениями, имеющими в своём составе ароматическую ванильную группу, откуда появилось распространённое название TRPV1 - ванилоидный рецептор 1-го типа. Более раннее название, капсаицин-чувствительный рецептор, происходит от известного относительно избирательного природного лиганда этих рецепторов капсаицина - алкалоида жгучих перцев. Рецептор TRPV1 представляет собой 838 аминокислотный пептид с молекулярным весом 95 кД, формирующий интегральный белок с 6 трансмембранными участками, имеющий пору между пятым и шестым доменами, и N и C терминали, обращённые в сторону цитоплазмы, что характерно для всех TRP. Белки

TRPV1 объединяются в гомотетрамеры, отдаленно напоминающие концентрационно-зависимые кальциевые каналы (Cao et al., 2013).

В отличие от других управляемых лигандами каналов, которые обеспечивают быструю синаптическую передачу, TRPV1 демонстрируют замедленные кинетические свойства, что отчасти связано с расположением сайта связывания лигандов с цитоплазматической стороны клеточной мембраны. Природные агонисты TRPV1, капсаициноиды и др., представляют собой липофильные вещества, которые, прежде чем достигнуть сайта связывания на рецепторе, должны преодолеть плазматическую мембрану. Несущие же некомпенсированный заряд аналоги капсаицина не проходят сквозь двойной липидный слой и поэтому проявляют свою активность только при внутриклеточной аппликации (Jung et al., 1999).

В самом общем виде роль TRP описывается как регуляция входа Ca^{2+} в клетку в зависимости от его содержания в цитоплазме. Физиологические функции ванилоидных рецепторов реализуются в связи с их способностью реагировать на простые физические и химические факторы, такие как нагревание (42 – 53 °C) и снижение pH (Caterina et al., 1997; Kress et al., 1996; Petersen, LaMotte, 1993). Протоны присоединяются к TRPV1 с наружной стороны клеточной мембраны, увеличивая вероятность пребывания канала в открытом состоянии (Tousova et al., 2005). При этом чувствительность TRPV1 к протонам в отдельности невелика. Низкий внеклеточный pH (5-6) главным образом уменьшает температурный порог реакции рецептора (Tominaga et al., 1998). Температурные реакции TRPV1 приводят к изменению третичной структуры белка в области поры и особенно сайта связывания с протонами (Grandl et al., 2010). Еще один простой химический фактор, действующий на ванилоидные рецепторы, – это свободные радикалы кислорода (Schultz, Ustinova, 1998).

В свете перечисленных данных TRPV1 рассматриваются как важный сайт интеграции химических и физических составляющих воспаления и

[Type here]

болевых стимулов. Кроме того, ванилоидные рецепторы, как и многие другие члены семейства TRP, имеют сродство к эндогенным лигандам, в частности к эндогенному каннабиноиду анандамиду (Smart et al., 2000; DiMarzo et al., 1998). На TRPV1 могут влиять метаболиты арахидоновой кислоты, образующиеся под действием липооксигеназы, лейкотриена B₄ и 2-гидропероксиэйкозатетраеновой кислоты (Hwang et al., 2002).

Хорошо известно, что посттрансляционные модификации рецептора, включая фосфорилирование, увеличивают активность TRPV1. Сенситизация рецептора запускается медиаторами воспаления, такими как фактор роста нервов, ПГ, субстанция Р и брадикинин. Эти медиаторы активируют несколько типов киназ, включая протеинкиназы – А и –С, а также MAP киназы. Те, в свою очередь, фосфорилируют различные сайты TRPV1, что приводит, например, к сенситизации болевых ощущений (Cheng, Ji, 2008; Xia et al., 2011). Изменение ионной проницаемости в результате открывания TRPV1 каналов и последующей деполяризации реализуется через генерацию и распространение ПД. Вызванные закислением внешней среды токи, опосредуемые TRPV1, регистрируются в телах нейронов задних рогов спинного мозга, имеющих немиелинизированные волокна (Leffler et al., 2006), а также в миелинизированных волокнах, идущих в узловатый ганглий. Ортодромное распространение ПД в капсаицин-чувствительных нейронах запускает рефлекторные ответы, такие как кашель, опорожнение мочевого пузыря и усиление кишечной перистальтики (Holzer, 2009).

Ванилоидные рецепторы 1-го типа широко распространены в центральной и периферической нервной системе. Значительная экспрессия мРНК TRPV1 наблюдается в первичных А-, δ- и С сенсорных нейронах, т.е. в полимодальных ноцицепторах, реагирующих на механические, химические и температурные стимулы. Кроме того, мРНК TRPV1 найдена в разных участках ЦНС, включая лимбическую систему, стриатум, гипоталамус, центромедиальные и паравентрикулярные ядра таламуса, черную субстанцию,

[Type here]

ретикулярную формацию, синее пятно, мозжечок и оливу (Mezey et al., 2000). Получены единичные свидетельства присутствия мРНК и белка TRPV1 в тканях, не относящихся к нервной системе, например, в эндотелии мочеточников (Birder et al., 2001), кератиноцитах (Inoue et al., 2002) и эпителии небных дужек (Kido et al., 2003), где их функциональная роль, однако, не ясна.

1.6.1.3 Фармакология TRPV1

Участие ванилоидных рецепторов TRPV1 в болевых и воспалительных реакциях разного генеза, включая астму, воспалительный колит, остеоартрит, мигрень, цистит и т.д., объясняет их пристальное изучение как особой мишени для создания отдельного класса анальгетиков (Premkumar, Bishnoi, 2011). В связи с тем, что некоторые агонисты и антагонисты TRPV1 применялись в данном исследовании, необходимо кратко ознакомиться с основными группами известных в настоящее время агонистов и антагонистов TRPV1.

TRPV1 агонисты. Строго говоря, группу лигандов TRPV1, названных агонистами, стоит разделить на активаторы и сенситизаторы. Капсаицин и его растительные и животные аналоги – это преимущественно сенситизаторы каналов, поскольку их основная функция заключается в уменьшении порога физиологической температурной активации рецептора. С другой стороны, эти вещества напрямую связываются с TRPV1, что позволяет также причислить их к прямым активаторам рецептора (Vriens et al., 2009). Большое число природных активаторов выявлено для ванилоидного рецептора 1-го типа, что указывает на его адаптационное значение. Группа липидных соединений организма, способных в физиологической концентрации модулировать чувствительность TRPV1 к температурным стимулам при воспалении и ноцицепции, носит название эндованилоиды (Van Der Stelt, Di Marzo, 2004). К ней относят конъюгаты биогенных аминов, например, N-арахидонилэтаноламин, анандамид, N-арахидоноилдопамин и др. (Appendino et al., 2008) и окси-эйкозатетраеновые кислоты (Ahern, 2003; Wang et al., 2005), такие как продукты липоксигеназ 5-, 12-, и 15-гидроксиперокси-

эйкозотетраеновые кислоты (Hwang et al., 2005), простагландины и лейкотриен B₄ (Huang et al., 2002).

С TRPV1 взаимодействуют и некоторые синтетические лекарственные средства, хотя и не так эффективно, как природные агонисты. К таким веществам относят активирующий TRPV1 лидокаин. При этом лидокаин, действуя, вероятно, на ванилоид-связывающий домен TRPV1, также проявляет способность стимулировать выделение КГРП в изолированных нервах и препаратах кожи (Leffler et al., 2008).

Первым выделенным еще в 1955 г. агонистом TRPV1 был капсаицин – 8-метил-N-ванилил-6-ноненамид с молекулярным весом 305.42 (Jancso, 1955, 1968). Контакт КАПС и большинства его аналогов с первичными афферентами запускает каскад событий, в котором можно выделить ранний возбуждающий эффект, следующие за ним десенситизацию и деструкцию нейронов (нейротоксический эффект). Все три компонента действия КАПС используются как нейрофармакологические инструменты. Начальным проявлением действия КАПС является возбуждение вследствие длительной деполяризации аксонов и тел афферентов при вхождении в клетку Ca²⁺ и Na⁺ (Bevan, Szolcsanyi, 1990; Wood et al., 1988). Когда деполяризация сенсорных нейронов достигает пороговых значений, происходит генерация серии ПД, распространение которых в ЦНС приводит к ощущению боли или зуда (Holzer, 1991). Важным следствием капсаицин-зависимого входа Ca²⁺ является высвобождение нейропептидов из центральных и периферических окончаний сенсорных нейронов. При аппликации относительно низких концентраций КАПС (10⁻⁸ М) выделение нейропептидов происходит только после генерации ПД. В этом случае их секреция блокируется тетродотоксином, ТТХ, и ω-конотоксином, СТХ (Maggi et al., 1988). Под действием больших концентраций (10⁻⁶ М), когда происходит массивный вход Ca²⁺ в клетку, выделение нейропептидов осуществляется в основном за счет кальциевого экзоцитоза. Этот процесс устойчив к ТТХ и СТХ (Lou et al., 1992). Феномен

прямого кальциевого экзоцитоза нейропептидов, не опосредованного ПД, лег в основу выдвинутой Я. Жолжани (Szolcsanyi et al., 1998) гипотезы о выделении нейропептидов из самой области рецептора, так называемой локальной эффекторной функции первичных афферентов (Holzer, 1988), которая нашла подтверждение в тесной взаимосвязи TRPV-1 и малых прозрачных вакуолей в рецепторных нервных окончаниях (Guo et al., 1999).

Типичным следствием ранней фазы возбуждения, вызванной аппликацией КАПС, является снижение чувствительности к самому лиганду и к другим сенсорным стимулам. Десенситизация проявляется в блокаде вызванной активности отдельных афферентных нейронов, в прекращении секреции нейропептидов, а также в угнетении поведенческих реакций на болевые стимулы (Holzer, 1991). Такое состояние длится от нескольких часов до нескольких дней. В частности, у крыс аппликация 100 мкМ КАПС делает роговицу невосприимчивой к химическим раздражающим стимулам по крайней мере на 2 часа (Szolcsanyi, Jancso-Gabor, 1976). Системное введение 1-100 мг/кг КАПС блокирует кожную чувствительность к болевым и температурным стимулам на несколько суток. Точно так же болевая чувствительность языка у человека после аппликации капсаицина восстанавливается на протяжении нескольких дней (Szolcsanyi, 1989; Szolcsanyi et al., 1975).

Дозозависимым развитием десенситизации является нейротоксический эффект (дегенерация), в качестве основного механизма которого рассматривается резкое повышение в цитоплазме концентрации Ca^{2+} , активирующее Ca^{2+} -зависимые протеазы и другие ферменты, разрушающие цитоскелет нейрона и блокирующие аксоток (Gamse, 1982; Kamakura et al., 1983; Wood et al., 1988). Дегенерация возникает под действием тех же доз КАПС и в тот же период, что и неспецифическая десенситизация. В изолированном узловатом ганглии крысы 1-10 мкМ КАПС приводили к разрушению микротубул уже через 5-10 мин. Удаление Ca^{2+} из раствора, либо

блокада ионных токов с помощью рутениевого красного уменьшает дегенеративные процессы. В то же время блокада потенциал зависимых Ca^{2+} каналов не влияет на степень дегенерации (Marsh et al., 1987; Winter et al., 1990). Системное введение 35-300 мг/кг КАПС взрослым млекопитающим приводит к избирательным и обширным дегенеративным процессам в периферических нервных структурах. Развивающиеся в считанные минуты деструктивные изменения сохраняются в течение месяцев (Gamse, 1982; Szallasi et al., 1989). В изолированном узловатом ганглии через 30 мин после введения КАПС дегенеративные процессы успевают распространиться на 75% малых сенсорных нейронов, но практически не затрагивают нейроны А- типа (Marsh et al., 1987). У млекопитающих чувствительность к ванилоидам меняется во время онтогенеза. Новорожденность (у крыс до 10-14 суток) является критическим периодом, когда системное введение нейротоксина вызывает наиболее масштабные и необратимые поражения нервной ткани. В это время подкожное введение КАПС (15- 50 мг/кг) приводит к потере 72-95% С- и примерно 10% А δ – волокон в задних корешках спинного мозга (Arvidsson, Ygge, 1986; Holzer, 1991). Дегенерация распространяется на тела 28-44% нейронов в спинальных ганглиях (Arvidsson, Ygge, 1986; McDougal et al., 1985; Neuhuber, 1987). В узловатом и яремном ганглиях неонатальное введение КАПС (50 мг/кг подкожно) вызывает обширную дегенерацию, захватывающую примерно 70 % малых сенсорных нейронов (Carobi, 1996).

TRPV1 антагонисты. Несмотря на явную гетерогенность обширной группы веществ, являющихся антагонистами TRPV1, их объединяют общие структурные особенности. Прежде всего, это наличие центральной группы доноров/акцепторов протонов, способной образовывать водородные связи, к которой с одной стороны примыкает липофильная цепь, а с другой - полярная ароматическая группа, содержащая акцептор водородных связей (Vriens et al., 2009). Природные TRPV1 антагонисты встречаются чрезвычайно редко, что вполне согласуется с экологической ролью TRPV1.

Первым среди синтетических антагонистов TRPV1 был капсазепин - производное тиомочевины, структурно напоминающее КАПС. Капсазепин может рассматриваться как аналог КАПС с ограниченными конформационными возможностями в связи с заменой амидной связи на тиомочевину. Капсазепин конкурирует за капсаицин-связывающий сайт, угнетая активацию канала TRPV1 (Tominaga et al., 1998). КПЗП тормозит реакции изолированных нейронов дорзальных рогов спинного мозга у грызунов (Jerman et al., 2000; Urban, Dray, 1991) и подавляет болевые реакции на КАПС *in vivo* (Santos, Calixto, 1997). В то же время капсазепин метаболически нестабилен и демонстрирует в опытах на грызунах фармакокинетические показатели недостаточные для его использования в качестве лекарственного средства (Walker et al., 2003).

Среди неконкурентных антагонистов TRPV1 больше других известен рутениевый красный. Это вещество взаимодействует преимущественно не с сайтами связывания лигандов, а блокирует канал рецептора. Пора рецептора в открытом состоянии блокируется также тетраэтиламмонием, который, кроме того, входит в семейство блокаторов калиевых каналов (García-Martínez et al., 2000). Резкое угнетение активности TRPV1 наблюдается в присутствии ацилполиамидных токсинов (Vriens et al., 2009).

1.6.2 Экспрессия и функциональное значение кислоточувствительных ионных каналов и рецепторов в желудке

Вполне очевидно, что реакции на изменение кислотности в верхних отделах ЖКТ имеют большое функциональное значение. В частности, защитные процессы в слизистой оболочке пищевода, желудка и ДПК инициируются главным образом эпителиальными клетками и первичными афферентными нейронами, реагирующими на уменьшение pH. Процесс передачи колебаний pH из полости желудка и ДПК в подслизистый слой нуждается в особых пояснениях прежде всего потому, что основные сенсоры

[Type here]

кислоты в стенке желудка и ДПК, а именно капсаицин-чувствительные первичные афферентные окончания, отделены от полости органа слоем эпителиальных клеток и входят в контакт лишь с тканевой жидкостью базальной пластинки. Слизистый эпителий желудка и ДПК к тому же обладает чрезвычайно малой проницаемостью для протонов (Flemstrom, Garner 1982). Показано, что в ДПК изменение полостной кислотности воспринимается афферентами после диффузии CO_2 в эпителиальные клетки и его гидролиза в присутствии карбоангидразы до H^+ и HCO_3^- с последующими ацидификацией цитоплазмы и переносом протонов в подслизистый слой через базолатеральные HNE1 транспортеры (Feitelberg et al., 1992; Montrose et al., 2006; Holzer 2007b; Akiba, Kaunitz, 2009).

Интралюминальная аппликация больших концентраций экзогенного CO_2 , например, в виде газированных напитков, усиливала секрецию HCO_3^- в слизистой оболочке ДПК и желудка, что было связано с активностью КА и продукцией ПГ (Furukawa et al., 2005; Sasaki et al., 2009). В реакции слизистой оболочки на газированную воду также принимали участие КЧПА, что подтверждено экспериментально в ДПК, но не в желудке (Sasaki et al., 2009). Эти расхождения связывают с относительно низкой проницаемостью СОЖ для CO_2 , не создающей в подслизистом слое градиент рН, достаточный для стимуляции КЧПА (Stevens et al., 1987).

1.6.2.1 Реакция спинальных и вагусных ноцицепторов на повышение желудочной кислотности

Физиологические ответы на изменение кислотности в полости желудка связаны в основном с возбуждением сенсорных нервных окончаний в стенке органа, которые относятся к 3-м относительно независимым популяциям чувствительных нейронов, различающиеся по локализации и проекции. Тела внутриорганных первичных афферентных нейронов, относящихся к энтеральной нервной системе, располагаются в межмышечном или подслизистом нервном сплетении. Еще у двух групп экстраорганных

[Type here]

афферентных нейронов тела локализованы либо в яремном и узловатом ганглиях блуждающего нерва, либо в дорзальных ганглиях спинного мозга (Holzer, 2006). Из афферентных нейронов, иннервирующих желудок у крысы, в узловатом ганглии 42-80% имеют TRPV1 рецепторы, а в спинальных ганглиях таких нейронов насчитывается 71-82% (Patterson et al. 2003; Robinson et al. 2004; Schicho et al. 2004).

Анализ вызванных токов в клетках дорзальных ганглиев спинного мозга и узловатого ганглия вагуса обосновывает предположение, что в нервных окончаниях при аппликации кислоты на СОЖ активируются как ASICs, так и TRPV1 (Sugiura et al., 2005, 2007). В определенной мере это подтверждается экспрессией белка c-Fos, маркера возбуждения, во многих нейронах ядра солитарного тракта в стволе головного мозга грызунов в ответ на увеличение в желудке концентрации HCl (>0.15 M), превышающее физиологические значения (Schuligoi et al., 1998; Danzer et al., 2004; Wultsch et al., 2008). Действие больших концентраций кислоты на СОЖ сопровождается висцеромоторными реакциями, характерными для болевых ощущений (Lamb et al., 2003). При этом в передаче ноцицептивных сигналов основную роль, по-видимому, играют вагусные афференты, т.к. висцеромоторные ответы и экспрессия c-Fos прекращались после перерезки блуждающего нерва и не были связаны с симпатической афферентацией (Schuligoi et al. 1998; Lamb et al. 2003). Помимо болевых реакций повышение кислотности приводит к сенситизации механочувствительных афферентов в пищеводе и желудке (Coffin et al., 2001; Medda et al. 2005). При этом реакции на внутрижелудочную аппликацию HCl связаны с активацией КЧПА, поскольку прекращаются под действием нейротоксических доз КАПС (Lamb et al., 2003). Как ни странно, вызванная действием кислоты на СОЖ экспрессия c-Fos в ядрах ствола головного мозга не устранялась в присутствии КАПС (Schuligoi et al. 1998). В связи с этим сделано предположение, что при воспалении основную роль в формировании гиперчувствительности вагусных афферентов и нейронов

ствола головного мозга играют ASIC каналы. Реакция c-Fos на избыточное действие кислоты на здоровую СОЖ сохраняется у ASIC3-нокаутных мышей; однако, при развитии гастрита усиление экспрессии c-Fos в стволе головного мозга блокируется выключением гена ASIC3 (Wultsch et al. 2008).

Повышение концентрации кислоты в полости желудка активирует не только центральные афферентные нейроны, но и чувствительные окончания клеток энтерального нервного сплетения. В частности, у крыс аппликация на СОЖ кислоты в большой концентрации вызывает экспрессию c-Fos примерно в 12% нейронов миэнтерального сплетения желудка. Важно отметить, что реагирующие на полостную кислотность миэнтеральные нейроны содержат NOS, вазоактивный кишечный полипептид и нейропептид Y. Поскольку аналогичный набор нейротрансмиттеров характерен для нервных волокон в мышечном слое, предполагается, что на изменение кислотности в желудке реагируют в основном тормозные мотонейроны миэнтерального сплетения, исполняя роль сенсорного звена локальных рефлексных дуг (Schicho et al., 2003). Как сообщал П. Хольцер (Holzer, 2002), реагирующие на полостную кислотность КЧПА, имеющие центральное и миэнтеральное происхождение, участвуют в двух разных локальных механизмах защиты слизистой оболочки желудка и ДПК, усиливая эпителиальный барьер и адаптируя двигательную активность передних отделов ЖКТ, соответственно.

1.6.2.2 TRPV1 иммунореактивность в стенке желудка

В стенке ЖКТ дендриты первичных афферентов направляются в мышечный слой, в ганглии энтеральной нервной системы и к серозной оболочке. Такая обширная проекция позволяет сенсорным нейронам отслеживать изменения кислотности в составе химуса, в межклеточном пространстве и в крови, а также реагировать на механические стимулы, такие как растяжение и прикосновение (Holzer, 2006).

Интенсивная иммунореактивность TRPV1, характерная для КЧПА, обнаружена в фундальной области, в теле желудка и в антруме, где эти

[Type here]

варикозные волокна ориентируются вдоль желез. В телах нейронов миэнтерального и подслизистого сплетений TRPV1 выявлено не было (Horie et al., 2004, 2005). Такие волокна не проникали в саму слизистую оболочку (Ward et al., 2003), но некоторое их количество выявлялось вблизи базальной пластинки (Horie et al., 2004). Нервные окончания, экспрессирующие TRPV1, в желудке крысы концентрируются рядом с пролиферативной зоной пришеечных слизистых клеток, вокруг кровеносных сосудов подслизистого слоя и в адвентиции сосудистой мускулатуры (Nozawa et al., 2001). Наиболее плотное сплетение КЧПА окружает артериолы в подслизистом слое (Horie et al., 2004). Во многих TRPV1-содержащих волокнах в стенке желудка обнаружена nNOS. Некоторое количество волокон, содержащих одновременно TRPV1 и nNOS, присутствует в области базальной пластинки и в мышечном слое, но в основном они распределены вокруг артериол подслизистого слоя (Raimura et al., 2013).

1.6.2.3 Локальная эффекторная функция КЧПА в желудке

Кроме передачи сигналов в ЦНС, сенсорные нейроны, экспрессирующие TRPV1, в том числе в стенке желудка, при деполяризации выделяют из своих периферических окончаний несколько типов пептидных нейротрансмиттеров: КГРП, тахикинины, соматостатин, а также АТФ (Holzer, 1998; Maggi, 1995; Pinter et al., 2006). Воздействие нейропептидов на рецепторы КГРП и тахикининов (NK1, NK2 и NK3), расположенные на эффекторных клетках, в частности в стенках кровеносных сосудов, вызывает реакции нейрогенного воспаления (Geppetti, Holzer, 1996).

В желудке крысы КГРП обнаруживается в экстраорганных афферентных волокнах, в основном спинального происхождения (Tan et al., 2009; Green, Dockray, 1988; Sternini, 1992). Некоторое количество медиатора все же синтезируется в нейронах узлового ганглия, откуда движется на периферию по афферентным волокнам блуждающего нерва (Luo et al., 2013). После ваготомии КГРП-иммунореактивность в СОЖ уменьшается (Suzuki et al.,

[Type here]

1997). КГРП, скорее всего, отсутствует в вагусных афферентах, экспрессирующих TRPV1 (Tan et al., 2009). В некотором количестве КЧПА спинальных ганглиев КГРП может соседствовать с субстанцией Р (SP) и соматостатином (Holzer, 1991; Szallasi, Blumberg, 1999; Sternini, 1992; Hwang et al, 2005; Price, Flores, 2007).

Большинство волокон, содержащих SP, идут в блуждающем нерве, но в отличие от нервных окончаний, содержащих КГРП, они не относятся к капсаицин-чувствительным. Тем не менее аппликация КАПС все же стимулирует продукцию SP в желудке грызунов (Kwok, McIntosh, 1990). Вероятно, КЧПА, содержащие SP, берут начало из миэнтерального сплетения, в то время как КГРП-содержащие КЧПА имеют экстраорганный происхождение (Sternini, 1992).

Кальцитонин ген-родственный пептид. КГРП – полипептид из 37 аминокислот, основной нейромедиатор, выделяющийся из капсаицин-чувствительных сенсорных нервных окончаний. КГРП существует в виде 2-х очень похожих (различие в 3 аминокислоты) изоформ, кодируемых разными генами, которые у крыс обозначаются α и β , а у человека I и II. Основным местом синтеза КГРП являются дорзальные ганглии спинного мозга, откуда полипептид транспортируется к периферическим сенсорным нервным окончаниям. Время полужизни КГРП 10 мин, что говорит о его достаточно быстром расщеплении эндопептидазами, триптазами и химотрипсином. Физиологический эффект КГРП осуществляется через мембранный КГРП рецептор, связанный с белком $G_{\alpha s}$ и аденилатциклазой. Через этот сигнальный каскад реализуется влияние КГРП на гладкие мышцы в стенках сосудов и на нейроны. Повышение концентрации цАМФ активирует протеинкиназу А и в некоторых случаях открытие АТФ-чувствительных калиевых каналов (K_{ATP}), что также способствует вазодилатации. Важным свойством КГРП является запуск эндотелий-зависимой вазорелаксации, которую обеспечивает цАМФ, взаимодействующий с eNOS. Кроме того, КГРП ускоряет транскрипцию через

РКА-зависимое фосфорилирование транскрипционного фактора CREB (Russel et al., 2014).

Рецепторы КГРП выявлены во всех отделах желудка, но преобладают в кольцевом гладкомышечном слое и в эндотелии артерий и артериол подслизистого слоя. В фундальной части рецептор КГРП обнаружен, кроме прочего, в мизентеральном сплетении (Gates et al., 1989). Гены, кодирующие субъединицы рецептора КГРП, также коэкспрессируются в мембране малых эпителиальных клеток пилорических желез, включая D-клетки (Kawashima et al., 2002).

Рецепторы КГРП, находящиеся в подслизистом слое, в значительной мере связаны с осуществлением гастропротективных функций. Системное введение блокатора КГРП рецепторов RUG8-37 увеличивало язвенные поражения СОЖ, вызванные этанолом либо индометацином (Kinoshita et al., 1993; Hayashi et al., 2001). Реакции адаптивной гастропротекции, запускаемые слабыми ирритантами, полностью отсутствовали у КГРП ген-нокаутных животных (Ohno et al., 2008; Shimozawa et al., 2006). Гастропротективные реакции на КГРП включают нескольких физиологических механизмов. Достаточно давно выяснено, что этот нейропептид активно подавляет желудочную секрецию кислоты (Lenz et al., 1985; Tache et al., 1984). С другой стороны, КГРП как вазодилататор усиливает кровоток в подслизистом слое, поддерживая микроциркуляцию в поврежденных участках (Holzer, Guth, 1991). Действуя в основном на проводимость K_{ATP} –зависимых каналов в стенке сосудов желудка, КГРП не оказывает заметного системного влияния на артериальное давление (Luo et al., 2013). В ряде исследований убедительно доказывается, что гастропротективное действие КГРП связано с активацией NOS. Кроме того, КГРП, вероятно, угнетает продукцию основного ингибитора NOS, асимметричного диметиларгинина (Kaneko et al., 1998; Matsumoto et al., 2001; Liu et al., 2008). Наконец, в присутствии КГРП увеличивается

устойчивость СОЖ к ишемии и реперфузии и ослабевают проявления апоптоза (Feng et al., 2011).

Субстанция Р и нейрокинины. Тахикинины представляют отдельное семейство нейропептидов с общей С-терминальной последовательностью аминокислот: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, в которой X — это ароматическая гидрофобная группа. Тахикинины млекопитающих включают субстанцию Р, нейрокинин А и нейрокинин В, а также две формы нейрокининов А и В с удлинённой терминалью N, нейропептиды К и μ , соответственно (Schmidt, Holst, 2000).

Примерно одинаковая иммунореактивность к SP и нейрокинину А обнаружена в фундальном и пилорическом отделах желудка (Flatt et al., 1991). Большое количество нейронов и нервных окончаний, содержащих SP, присутствует в миэнтеральном сплетении и кольцевом мышечном слое желудка разных видов млекопитающих (Ekblad et al., 1985; Sharkey et al., 1984; Mawe et al., 1989). Хотя в иннервации СОЖ и подслизистого слоя имеются большие межвидовые различия, у большинства видов в теле и в антральном отделе лишь единичные SP-содержащие волокна достигают подслизистого слоя. В желудке NK-2 рецепторы присутствуют только в мышечном слое, относительно небольшое число рецепторов NK-1 обнаружено в мышечном слое, в стенках сосудов и в нейронах энтерального сплетения, рецепторы NK-3 встречались только в энтеральном сплетении (Schmidt, Holst, 2000).

В желудке афферентные и, возможно, эфферентные волокна вагуса, содержащие тахикинины, образуют незначительную популяцию, что, конечно, не исключает их участия в центральной регуляции функций. Электрическое раздражение вагуса, а также ацетилхолин усиливали выделение SP и нейрокинина А в изолированном органе (Jensen, 1997). Афферентные окончания в желудке, проецирующиеся в дорзальные спинномозговые ганглии, напротив, в большом количестве (40-70% волокон у грызунов) содержат SP (Sharkey et al., 1984; Green, Dockray, 1988).

Начиная с ранних работ, высказываются сомнения о взаимосвязи иммунореактивности к SP и КЧПА. С одной стороны, К. Шарки и соавт. (Sharkey et al., 1984) показали, что число SP – содержащих нервов в СОЖ и подслизистом слое существенно сокращается в результате ранней постнатальной инъекции КАПС. С другой стороны, П. Хольцер и соавт. (Holzer et al., 1980), а также Сузуки и соавт. (Suzuki et al., 1997) утверждают, что КАПС, напротив, не влияет на иммунореактивность к SP, как в экстрактах тканей желудка крыс, так и у взрослых животных. Тахикинины стимулируют сократимость всех отделов желудка, включая пилорический сфинктер. Это действие опосредуется рецепторами NK-1 и NK-2 в мышечном слое, а также рецепторами NK-1 и NK-3 на интернейронах (Schmidt, Holst, 2000). Участие тахикининов в регуляции желудочной секреции кислоты трактуется неоднозначно. Внутривенная инъекция SP не влияла на базальную секрецию, но подавляла стимулирующий эффект блуждающего нерва (Zanelli et al., 1992; Yokotani, Fujiwara, 1985). Тем не менее SP не действовала на базальную или вызванную АХ секрецию изолированных обкладочных клеток, но угнетала реакцию на гистамин (Schepp et al., 1990). Наконец, SP через NK-1 рецепторы активировала секрецию главных клеток (Vigna et al., 1989; Kitsukawa et al., 1996).

Субстанция Р, продуцирующаяся в стенке желудка, рассматривается как один из патогенных факторов этанолового поражения, который способствует синтезу активного кислорода, и разрушению желудочного эпителия (Gazzieri et al., 2007). При этом, выделяясь из афферентных нервных окончаний, SP не влияет на расширение кровеносных сосудов в желудке крысы, возникающее под действием КАПС, напротив, SP и нейрокинин А стимулируют констрикцию подслизистых вен (Katori et al., 1993; Matsumoto et al., 1991).

1.6.3 КЧПА как регулятор реакций адаптивной гастропротекции

Капсаицин-чувствительные афферентные нейроны играют основную роль в запуске гастропротективных реакций в желудке и ДПК, включая подавление секреции кислоты, усиление кровотока в подслизистом слое и секрецию бикарбонатов (Holzer, 1998; Holzer, Sametz, 1986; Aoi et al., 2004; Nakashima et al., 2004; Takeuchi et al., 1991b, 1992). Слизистая оболочка гастродуоденальной зоны реагирует на закисление увеличением секреции бикарбонатов и муцина, а сосуды подслизистого слоя - гиперемией. Аналогичные реакции имеют место и при полостной аппликации КАПС. Реакции на кислоту, а также на КАПС обеспечиваются капсаицин-чувствительными первичными афферентами, взаимодействующими с простагландиновой и нитреергической системами (Aihara et al., 2005a; Takeuchi et al., 1991b, 1992). При этом паракринные механизмы, которые запускаются в СОЖ капсаицин-чувствительными нервными окончаниями под действием КАПС либо кислоты заметно различаются.

1.6.3.1 КЧПА и продукция кислоты

Кислоточувствительные афференты в желудке вовлечены в механизмы обратной связи, ограничивающие продукцию кислоты при повышении ее концентрации в полости органа. Общепринято, что уменьшение pH ниже 3 тормозит секрецию гастрина (Shulkes et al., 2006). Основным медиатором, задействованный в этой реакции - соматостатин, который через паракринные и эндокринные пути угнетает секрецию обкладочных и главных клеток. Активность продуцирующих соматостатин D-клеток частично управляется кислоточувствительными первичными афферентами, которые по мере закисления содержимого желудка начинают выделять КГРП, стимулирующий секрецию соматостатина (Manela et al. 1995; Holzer, 1998). Чувствительные к кислоте афферентные нейроны участвуют также в поддержании тонуса нижнего пищеводного и пилорического сфинктеров, регулируя уровень

кислотности в пищеводе и ДПК (Lu, Owyang, 1999; Holzer, 2003, 2007a). Кроме центральных афферентов эти двигательные реакции, вероятно, регулируются кислоточувствительными афферентами энтеральной нервной системы (Bertrand et al., 1997; Schicho et al., 2003). Возможно, другие молекулярные сенсоры кислоты присутствуют в мембранах эндокринных и энтерохромаффинных клеток СОЖ, где в их функции может входить усиление секреции серотонина (Wachter et al., 1998).

1.6.3.2 Роль КЧПА и TRPV1 в регуляции продукции бикарбонатов в желудке

Изучение роли КЧПА и TRPV1 в регуляции секреции бикарбонатов в желудке проводила только одна исследовательская группа, в результате чего в понимании этого вопроса имеются явные пробелы. В частности, вопрос об основном сенсоре тканевой кислотности, участвующем в запуске гастропротективной секреции HCO_3^- и гиперемии в желудке по сей день остается открытым.

Опыты К. Такеучи и соавт. (Takeuchi 1991b, 1992, 2003; Takeuchi, Aihara, 2014) показали, что в желудке на фоне омепразола 10-минутная аппликация КАПС на поверхность СОЖ стимулирует секрецию бикарбонатов, сходную с реакцией на полостное введение экзогенной кислоты. Эта реакция устранялась после химического разрушения капсаицин-чувствительных нейронов хроническими инъекциями КАПС, а также блокадой TRPV1 рецепторов с помощью КПЗП или рутениевого красного. Действие КАПС на желудочный эпителий сопровождалось существенным увеличением в СОЖ концентрации продукта гидролиза PGI_2 (6-кето PGF_1 альфа), но не влияло на концентрацию PGE_2 . Секреция HCO_3^- , вызванная КАПС прекращалась в присутствии неселективного антагониста ЦОГ индометацина, либо под действием блокатора конститутивных синтаз оксида азота L-NAME. С другой стороны, антагонист EP1 простагландиновых рецепторов, а также антагонист B2 рецепторов брадикинина не влияли на эффект КАПС. Стимулирующий

эффект КАПС на желудочную секрецию бикарбонатов отсутствовал у нокаутных мышей, лишенных IP_1 рецептора, но воспроизводился в отсутствие простагландиновых рецепторов EP_2 и EP_3 .

Секреция HCO_3^- , вызванная в сходных условиях внутрижелудочным введением экзогенной кислоты, также блокировалась ИНД, L-NNA и антагонистом простагландинового рецептора EP_1 , но не зависела от действия КПЗП или активации V_2 брадикининовых рецепторов. Ацидификация СОЖ значительно увеличивала концентрацию как PGF_2 , так и 6-кето PGF_1 альфа. При стимуляции секреции HCO_3^- экзогенной кислотой эффект сохранялся у IP и EP_3 -нокаутных животных, но прекращался после удаления EP_1 - рецепторов. При этом у перечисленных нокаутных линий реакции на КАПС и ацидификацию СОЖ значительно уменьшались под действием ИНД. Стимулирующий эффект брадикинина на продукцию HCO_3^- также полностью опосредуется V_2 рецепторами, расположенными на КЧПА, и прекращается после химической деструкции афферентов, но сохраняется в присутствии КПЗП.

1.6.3.3 Роль КЧПА и TRPV1 в реакции вазодилатации в подслизистом слое, вызванной аппликацией КАПС или кислоты

Капсаицин-чувствительные афференты необходимы для запуска защитных гиперемических реакций подслизистого слоя, вызванных обратной диффузией кислоты из полости желудка. Внутрижелудочная аппликация небольших доз КАПС, также приводит к расширению артериол подслизистого слоя, активируя КЧПА спинального происхождения. Общепринято, что в основе этой реакции лежит аксон-рефлекс между коллатеральными афферентного волокна, оканчивающимися в подслизистом слое (Holzer, 1991). При этом КАПС действует почти исключительно через TRPV1 рецепторы, поскольку реакция уменьшается при блокаде проводимости этого канала (Saeki et al., 2000; Chen et al., 1992). Изменение локального кровотока в ответ на аппликацию КАПС в значительной мере связано с последующим синтезом

NO под действием КГРП (Chen, Guth, 1995). Однако при аппликации капсаицина на СОЖ это не единственный путь повышения уровня NO в области контакта кровеносных сосудов с КЧПА. В исследованиях Хори и соавт. (Horie et al., 2014) была выявлена возможность синтеза NO непосредственно в самих КЧПА, в большой популяции которых в желудке присутствует nNOS. Таким образом, при полостной желудочной аппликации КАПС из первичных афферентных окончаний в подслизистом слое секретируются и КГРП, и NO. Авторы высказывают предположение, что eNOS поддерживает желудочный кровоток в покое, а также в позднюю фазу активации КЧПА, но не влияет на пиковую вазодилатацию. В то же время nNOS опосредует немедленное воздействие КАПС на кровоток. В эту реакцию вовлечены и другие медиаторы, в основном ПГ. По-видимому, вклад ПГ в реакцию определяется сенситизацией КЧПА через расположенные на них IP рецепторы (Takeuchi et al., 2003).

Тем не менее и в механизмах вазодилатации сайт, на который влияет повышение кислотности в подслизистом слое неочевиден. Ташима и соавт. (Tashima et al., 2002) сообщают, что блокаторы TRPV1 каналов, КПЗП и рутениевый красный, не действовали на описываемую гиперемическую реакцию в стенке желудка. Вероятно, это - специфическая особенность регуляции кровотока в желудке. Акиба и соавт. (Akiba et al., 2006b) показали, что в ДПК в отличие от желудка TRPV1 каналы напрямую участвуют в регуляции гиперемической реакции, вызванной закислением полостного содержимого, и эта реакция одинаково блокируется как после хронического введения КАПС, так и под действием КПЗП.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Экспериментальные животные и хирургические вмешательства

Исследование проведено под контролем Комиссии по биоэтике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН на крысах линии Спрег-Дуули (Колтуши) массой 280-350 г (ЦКП "Биоколлекция ИФ РАН", Программа по сохранению и развитию биоресурсных коллекций ФАНО России). Всего в результативных опытах было использовано 570 половозрелых самцов.

В течение 3-5 дней до эксперимента животные содержались в карантинном помещении по 4-5 особей в полипропиленовых клетках 55x40x20 при температуре 22 ± 2 °C и искусственном 12-часовом освещении. Животные имели постоянный доступ к гранулированному корму Р50258-92 (Рапполово, Россия) и питьевой воде. За 18-20 часов до опыта животные изолировались в отдельные клетки с приподнятым решетчатым полом, были лишены пищи, но имели свободный доступ к воде. После этого животных хирургически подготавливали либо к острому, либо к хроническому эксперименту.

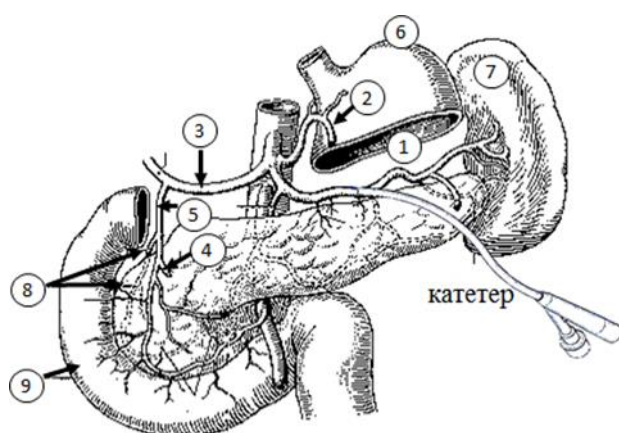
2.1.1 Хирургическая подготовка к острому опыту

Хирургические вмешательства и последующие экспериментальные воздействия проводили под уретановым наркозом (1.2 г/кг; Sigma-Aldrich Co., USA), который вводили внутрибрюшинно (в.б.). Для предотвращения ацидоза и дегидратации в течение опыта животному внутривенно (в.в.) со скоростью 0.5 мл/ч инфузирова­ли изотонический раствор NaCl с добавлением 1 мМ NaHCO₃ и 2% глюкозы. Животное располагали на спине на подогреваемом столике. Дополнительное согревание вентральной поверхности тела проводили лампой накаливания. В течение опыта температуру тела поддерживали на уровне 37 °C, что контролировали ректальным термодатчиком. Состояние животного в течение опыта непрерывно

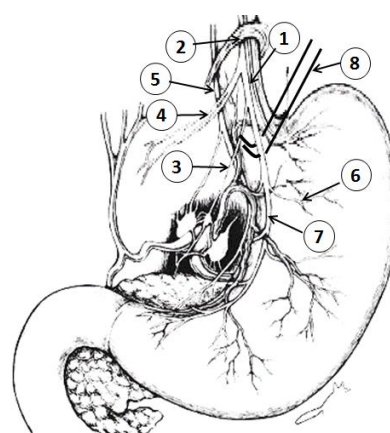
оценивалось по частоте сердечных сокращений (ЧСС) и артериальному давлению (АД).

Стандартные хирургические вмешательства включали трахеотомию, обеспечивавшую спонтанное дыхание в положении на спине, и катетеризацию бедренной артерии и вены. В отдельных опытах катетер вводился в селезеночную артерию ретроградно, т.е. по направлению к чревному стволу. Это давало возможность относительно локальной инъекции веществ в желудочный кровоток, поскольку основной объем инфузии направлялся в левую желудочную артерию, и частично поступал в общую печеночную, гастродуоденальную, правую желудочную и панкреодуоденальную артерии (Рис. 1 А).

Брюшную полость вскрывали по белой линии живота, освобождая доступ к желудку. Через ротовую полость и пищевод в желудок вводили пластиковый зонд с наружным диаметром 2 мм. Чтобы избежать утечки раствора через рот, пищевод перевязывали под диафрагмой вокруг зонда. В тех случаях, когда по условиям эксперимента требовалась субдиафрагмальная ваготомия, пищевод перевязывали вместе с идущими вдоль него блуждающими нервами. Если было необходимо сохранить вагусную иннервацию желудка, лигатура проводилась под нервами. Отток жидкости при перфузии полости желудка происходил через введенную в безжелезистую часть органа (преджелудок) перфорированную на конце канюлю с наружным диаметром 3.5 мм, проксимальный конец которой располагали в железистой части органа. Канюлю прикрепляли к стенке органа лигатурой. В конце препаровки двенадцатиперстная кишка перевязывалась выше луковицы, а брюшная полость закрывалась фольгированным полиэтиленом и согревалась лампой накаливания (Рис. 2 А), после чего приступали к перфузии полости желудка.



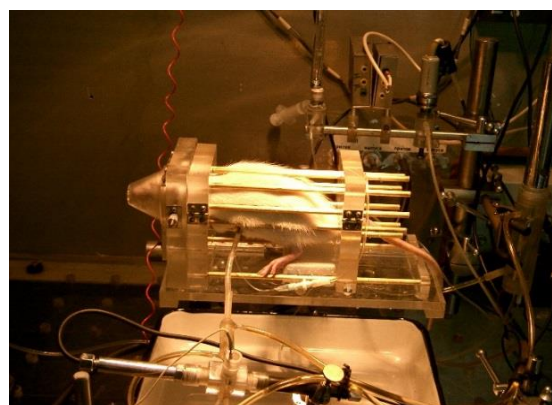
А



Б



В



Г

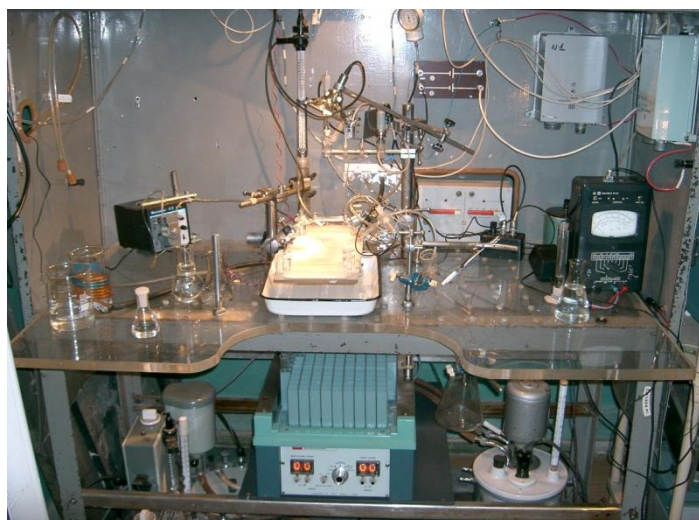
Рис. 1. Препаровка экспериментального животного.

А. Ретроградное введения катетера в селезеночную артерию: 1) селезеночная артерия, 2) левая желудочная артерия, 3) общая печеночная артерия, 4) правая желудочная, 5) гастродуоденальная артерия, 6) желудок, 7) селезенка, 8) панкреодуоденальная артерия, 9) двенадцатиперстная кишка.

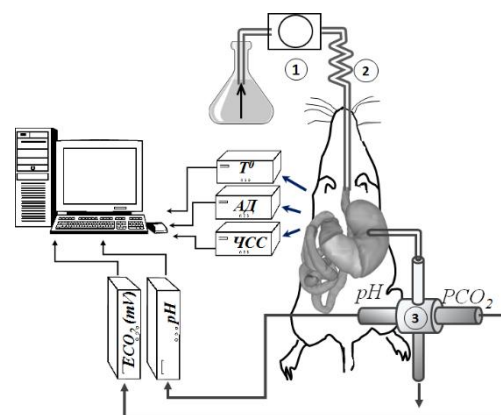
Б. Расположение электродов на левом поддиафрагмальном стволе блуждающего нерва крысы: 1) левый (вентральный) ствол, 2) пищеводное отверстие диафрагмы, 3) печеночная ветвь левого ствола, 4) добавочная чревная ветвь, 5) правый (дорзальный) ствол, 6) желудочная ветвь, 7) нерв Латарже, 8) биполярные электроды.

В. Имплантация титановой трубки в фистулу преджелудка крысы.

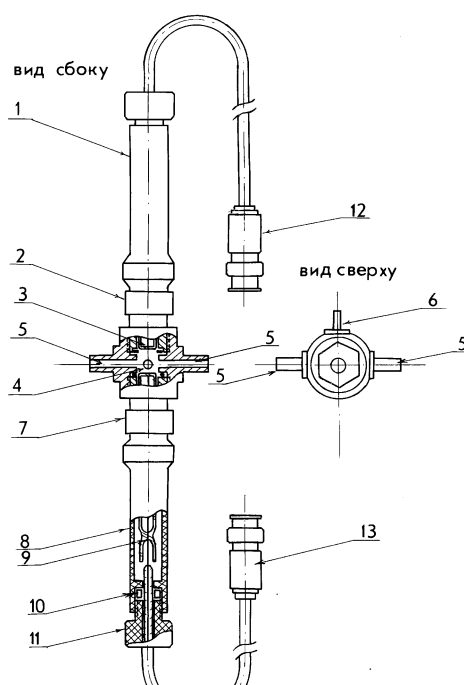
Г. Перфузия желудка бодрствующей крысы, находящейся в клетке Боллмана.



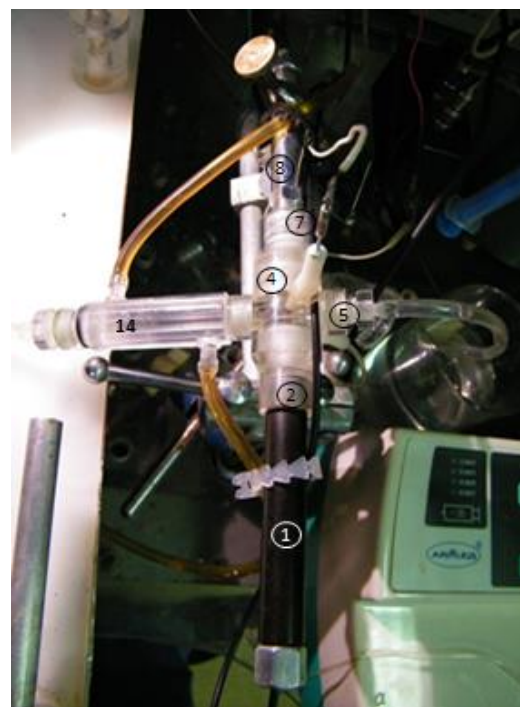
А



Б



В



Г

Рис. 2. А, Б) Экспериментальная установка: фотография и схема: 1) перистальтический насос, 2) водяной термостат, 3) комбинированный датчик pH/PCO₂.

В) Схема комбинированного датчика для измерения pH/PCO₂ в потоке. Г) Внешний вид комбинированного датчика pH/PCO₂.

1) Корпус активного электрода pH, 2) плексигласовая головка активного электрода pH, герметично крепящаяся к корпусу датчика резьбовым соединением, 3) pH электрод, 4) центральная камера датчика (плексиглас), 5) входной и выходной патрубок камеры датчика, 6) патрубок для присоединения pH электрода сравнения, 7) плексигласовая головка датчика PCO₂, герметично крепящаяся к корпусу датчика резьбовым соединением, 8) корпус электрода датчика PCO₂, 9) колба стеклянного электрода датчика PCO₂, 10) фиксатор коаксиального кабеля, 11) крышка корпуса, 12, 13) разъем штекерный BNC, 14) водный термостат.

[Type here]

2.1.2 Хирургическое изготовление хронической фистулы желудка

Хирургическое выведение фистулы желудка на кожу живота проводили за 2 недели до начала эксперимента. Для наркотизации использовали Золетил 50; Vibrac, Франция) с содержанием действующих веществ тилетамина гидрохлорида и золазепама гидрохлорида по 125 мг (10 мг/кг в.б.). После вскрытия брюшной полости через сквозной разрез в вентральной поверхности безжелезистой части желудка в полость органа вводился конец титановой канюли с общей длиной 8 мм и наружным диаметром 5 мм, которая другим концом соединяла полость органа с кожей на животе (Рис. 1В). Канюля фиксировалась лигатурами в мышечном и серозном слоях желудка, а также пришивалась к мышечному слою передней брюшной стенки и коже. После промывания физиологическим раствором наружное отверстие канюли закрывали пробкой. Затем в течение 3-х дней животному вводили антибиотик цефтриаксон (20 мг/кг в.б.).

Перед началом перфузии подвижность бодрствующих животных ограничивалась в клетке Боллмана, к которой они адаптировались в течение нескольких ежедневных сеансов по 60 мин (Рис. 1Г). После открывания фистулы и промывания полости желудка через катетер 10 мл подогретого до 37 °С физиологического раствора, в отверстии фистулы фиксировался двойной коаксиальный зонд. Внутренняя трубка зонда диаметром 1 мм, через которую подавался раствор, углублялась в полость желудка на 10 мм. Срез наружной трубки (диаметром 3 мм) оставался в полости фистулы. Через последнюю перфузат пассивно оттекал из желудка.

2.2 Полостная перфузия желудка

Секрецию протонов, ионов бикарбоната и пепсиногена рассчитывали, исходя из их концентрации в полостном желудочном перфузате и скорости перфузии.

Полость желудка, промытую перед началом опыта 10 мл физиологического раствора, перфузировали с постоянной скоростью растворами различной кислотности и осмотического давления: изотоническим относительно низкой кислотности (154 mM NaCl, pH 4.0), либо гипертоническим раствором (500 mM NaCl) повышенной кислотности (pH 3.0 или pH 2.0). Перфузионные растворы не содержали буфера. Необходимая кислотность устанавливалась путем предварительного титрования 1N соляной кислотой.

Раствор подавался в полость желудка через пищеводный зонд скоростью 1 мл/мин при 37 °C с помощью перистальтического насоса Masterflex C/L (Cole-Parmer Instrument Co., USA). Из желудка перфузат свободно оттекал через канюлю, введенную в преджелудок. (Рис. 2А). В обеих экспериментальных моделях оттекающий из желудка перфузат проходил через термостабилизированную камеру объемом 200 мкл, снабженную pH-электродом и датчиком парциального давления диоксида углерода (Pco₂). Далее пробы перфузата собирали с помощью коллектора фракций (LKB, Швеция) с частотой 1 проба за 15 мин (Рис. 2Б).

2.3. Измерение концентрации кислоты, бикарбонатов и пепсиногена в желудочном перфузате

Количественная оценка продукции кислоты и бикарбонатов в желудке *in vivo*, не может корректно осуществляться классическими методами прямого и обратного титрования (Мыш, 1987). Существенным недостатком этих методов является очевидная недооценка продукции кислоты и значительные технические препятствия в измерении продукции бикарбонатов. В кислом содержимом желудка (в желудочном соке) ионы бикарбоната, концентрация которых составляет в базальных условиях 10-50% от концентрации кислоты (Мыш, 1987; Garner et al., 1984), немедленно вступают в реакцию с соответствующей частью протонов с образованием угольной кислоты.

[Type here]

Последняя практически мгновенно распадается с образованием двуокиси углерода, которая диффундирует в атмосферу и в стенку органа. По этой причине концентрацию HCO_3^- большинство авторов измеряли в нейтральном желудочном соке, после фармакологического угнетения секреции кислоты (Мыш, 1987). Несмотря на то, что метод обратного титрования описан в базовых работах как наиболее точный прием определения концентрации HCO_3^- в пробах желудочного сока (Odes et al., 1992), для решения поставленной задачи он малопригоден, поскольку создание искусственного анацидного состояния неизбежно изменит физиологические механизмы регуляции секреции бикарбонатов и пепсиногена.

Из методов, позволяющих одновременно регистрировать кислотность и концентрацию бикарбонатов, испытанных как в эксперименте, так и в клинике, стабильные результаты показывают два. Первый основывается на расчете концентрации H^+ и HCO_3^- в желудочном перфузате по измеренным величинам pH и парциального давления углекислого газа (PCO_2) (Crampton et al., 1987; Sjoval et al., 1989). С помощью другого метода продукция H^+ и HCO_3^- вычисляется по уменьшению $[\text{H}^+]$ и осмотического давления желудочного сока при реакции H^+ и HCO_3^- с образованием H_2O и CO_2 (Feldman 1983; Feldman et al., 1991; Stevens et al., 1987). Клиническое тестирование показало, что на основе измерения осмолярности и $[\text{H}^+]$ получают завышенные значения базальной секреции HCO_3^- , в то время, как измерение pH/ PCO_2 перфузата давало завышенные значения низких концентраций CO_2 и занижало высокие при pH>4.0 (Odes et al., 1992).

Проведенная верификация измерительной системы, использующей регистрацию pH/ PCO_2 перфузата, показала, что в эксперименте на животных ее точность может быть улучшена, в отличие от клиники, за счет создания специального режима перфузии. В частности, увеличение скорости потока дает возможность уменьшить относительную величину обратной диффузии CO_2 в ткани желудка. Уменьшение pH перфузионного раствора с нейтрального

до 4.0, приближенного к значениям pH в желудке бодрствующих крыс натошак, также увеличило точность измерений, создавая условия практически полной диссоциации HCO_3^- . Важно отметить, что при диссоциации угольной кислоты в растворе, в котором равновесие сильно сдвинуто в сторону CO_2 , значение водородного показателя $\text{pH} \sim 3.9$ (Лидин и др., 2006).

2.3.1 Комбинированный датчик для измерения pH/ P_{CO_2}

Измерение pH и парциального давления CO_2 в оттекающем из желудка перфузате производилось с помощью лабораторного образца комбинированного датчика, изготовленного в мастерских ИФ РАН (Рис. 2Г; Золотарев и др., 1996). Конструкция представляет собой проточную камеру объемом 200 мкл, стенки которой образованы рабочими поверхностями активного pH электрода и датчика CO_2 (Рис. 2В). Исследуемый раствор поступает в камеру и вытекает из нее через симметричные патрубки. На «входе» измерительной камеры располагается трубчатый термостат, поддерживающий в потоке температуру перфузата на уровне 36 ± 1 °C (Рис. 2Г).

В устройстве использованы высокостабильные стеклянные pH электроды с твердым литий-индиевым контактом для измерения ЭДС в диапазоне ± 1000 мВ, изготовленные в НИИ Химии при Санкт-Петербургском государственном университете (Патент РР №705854; Шульц и др., 1979). Электрод сравнения аналогичен активному, но погружен в раствор 0.05 М ацетата Na, 0.05 М уксусной кислоты и 3М KCl. Электрод сравнения вынесен за пределы измерительной камеры и соединен с ней через электролитический ключ.

Датчик P_{CO_2} представляет собой гальванический элемент с индикаторным стеклянным pH-электродом с твердым металлическим контактом (см. выше) и хлорсеребряным электродом сравнения, которые погружены в раствор бикарбоната натрия (5 mM NaHCO_3 , 100 mM KCl). Раствор в датчике отделен

от внешней среды газопроницаемой мембраной из силиконового полимера (Silex Ltd., UK) толщиной 20 мкм (Разумова и др., 1981, 1985).

Перфузат оттекал из измерительной камеры датчика через открытый в атмосферу «выходной» патрубкок, располагавшийся на уровне желудка подопытного животного. Таким образом, давление в полости органа и в измерительной системе оставалось близким к нулю.

2.3.2 Измерение pH и ЕСO_2 , расчет величины секреции кислоты и бикарбонатов в перфузируемом желудке крысы

Калибровка датчика pH производилась путем прокачки через проточную камеру стандартных буферных растворов (pH 4.01 и 1.68) той же температуры, что и при измерении. Датчик PCO_2 калибровался при прохождении через измерительную камеру растворов, насыщенных газовыми смесями с заданной концентрацией CO_2 . Физиологический диапазон концентрации CO_2 в желудочном соке перекрывается при использовании следующих поверочных газовых смесей: 1% CO_2 в N_2 и 4% CO_2 в N_2 . При калибровке регистрировалась ЭДС датчика во время его контакта с первым и вторым калибровочным раствором, на основе чего вычислялась крутизна (D) калибровочной кривой:

$$D = (E_1 - E_2) / \lg \frac{[\text{CO}_2]_1}{[\text{CO}_2]_2} = \frac{dE}{dp\text{CO}_2},$$

где E_1 и E_2 - ЭДС (мВ) датчика PCO_2 в 1-ом и 2-ом калибровочных растворах; $[\text{CO}_2]_1$ и $[\text{CO}_2]_2$ - процентная концентрация углекислоты в 1-ом и 2-ом растворе. Среднее значение крутизны, полученное при испытаниях, $D=46.56 \pm 0.91$.

Для перехода от процентного содержания CO_2 в калибровочных растворах к молярной концентрации растворенного газа учитывался коэффициент растворимости и температура раствора:

$$[\text{CO}_2](\text{моль}) = \frac{[\text{CO}_2]\%}{V_m \times 100} \times \frac{273}{T_i^{\circ}\text{K}} \times S,$$

где V_m - объем 1 моля газа при 0 °C ($V_m=22.4$ л); $T_i^{\circ}K$ - текущая температура исследуемого раствора в градусах Кельвина, s - растворимость углекислоты (при 37 °C $s=0.545$ мл CO_2 /мл $H_2O \cdot atm$) (Fandriks, Stage, 1986).

Текущая концентрация углекислого газа в растворе вычислялась по формуле:

$$[CO_2]_x = [CO_2]_1 \times 10^{-(E_1 - E_x)/D},$$

где E_1 и $[CO_2]_1$ - ЭДС датчика и концентрация углекислоты в калибровочном растворе, а E_x и $[CO_2]_x$ - ЭДС датчика и концентрация CO_2 в исследуемом растворе.

Дальнейшие расчеты секреции соляной кислоты и бикарбонатов в желудке строились на допущении, что CO_2 появляется в перфузате только в результате нейтрализации секретированных бикарбонатов соляной кислотой, а также что существенной обратной диффузии H^+ и CO_2 в слизистую оболочку желудка не происходит. Измеренная потенциометрически активность свободных протонов равна 10^{-pH} . Необходимо также учесть, что в растворах электролитов активность протонов меньше истинной концентрации и связана с последней коэффициентом активности:

$$[H^+] = \frac{1}{a} \times 10^{-pH},$$

где $[H^+]$ – истинная концентрация протонов, 10^{-pH} - активная концентрация протонов, a - коэффициент активности протонов, примерно равный для желудочного сока 0.8 при колебаниях pH в широких пределах (Мыш, 1987; Moore, Scarlata, 1965).

Исходя из этого, секрецию кислоты рассчитывали по формуле:

$$H_{\text{секр}}^+ = Q \times ([H^+]_{\text{вых}} + [CO_2]_{\text{вых}} - [H^+]_{\text{вх}} - [CO_2]_{\text{вх}}) \text{ (моль/мин)},$$

где $[H^+]_{\text{вых}}$ и $[CO_2]_{\text{вых}}$ – концентрация протонов и углекислоты в перфузате, оттекающем из желудка; $[H^+]_{\text{вх}}$ и $[CO_2]_{\text{вх}}$ – концентрация протонов и углекислоты в свежеприготовленном растворе, поступающем в желудок,

измеренные до начала опыта; Q – скорость перфузии (л/мин). Значения $[H^+]$ и $[CO_2]$ в свежеприготовленном перфузионном растворе обычно близки к 0.

Концентрация свободных ионов бикарбоната, находящихся в равновесии с CO_2 , вычислялась по уравнению Гендерсона-Хассельбаха:

$$[HCO_3^-] = [CO_2] \times 10^{pH - pK_a},$$

где $pK_a = 6.10$ – константа диссоциации угольной кислоты с учетом гидратации и ионной силы раствора (Fandriks, Stage, 1986).

Полная продукция бикарбонатов, выраженная в молях в мин, вычислялась по формуле:

$$HCO_3^-_{\text{секр}} = Q \times ([HCO_3^-]_{\text{вых}} + [CO_2]_{\text{вых}} - [HCO_3^-]_{\text{вх}} - [CO_2]_{\text{вх}}) \left(\frac{\text{МОЛЬ}}{\text{МИН}} \right)$$

Значения $[HCO_3^-]$ и $[CO_2]$ в свежеприготовленном перфузионном растворе пренебрежимо малы по сравнению со значениями на «выходе» из желудка.

2.3.3 Верификация измерительной системы *in vitro* и *in vivo*

Оценка точности и инертности измерительной системы была проведена *in vitro*, для чего растворы с известной концентрацией HCl и $NaHCO_3$ подавались шприцевым дозатором (Армед МР-2003, Россия) с постоянной скоростью по стеклянным трубкам в термостабилизированную стеклянную оливу объемом 1 мл, после чего поступали в датчик pH/pCO_2 (Рис. 3А). При тестировании полученные из стандарт-титров растворы HCl с заданной концентрацией (1, 5 и 10 mM) в течение 20 мин интервалов смешивали в потоке с растворами $NaHCO_3$ (0.25, 0.5 и 1 mM). Каждый из растворов подавался со скоростью 0.5 мл/мин, т.е. скорость потока в измерительной камере удваивалась. Здесь и ниже концентрации тестовых растворов даются в пересчете на итоговый объем, протекающий в измерительной системе после смешивания. Величины pH и ECO_2 в каждый интервал измерений фиксировались после достижения плато, на основе чего рассчитывали

«измеренные» значения концентрации H^+ и HCO_3^- (Рис. 3 А-В). Приведенные на рисунке 3Б,В линии регрессии показывают достоверное соответствие заданных и измеренных концентраций, что подтверждает необходимую точность измерительной системы.

Использованная измерительная система характеризовалась заметной инерцией, которая была связана с перемешиванием растворов в потоке и временем отклика датчика PCO_2 . Временем отклика стеклянного рН электрода с твердым металлическим контактом, меньшим на порядок, чем у датчика PCO_2 (Шульц и др., 1979), в этом случае можно было пренебречь. Оценка инерции измерений H^+ *in vitro* при протекании раствора через измерительную камеру со скоростью 1 мл/мин показала, что выход значений на плато происходит в среднем через 4 мин после замены раствора (Рис. 3 Г). Выход концентрации HCO_3^- на плато запаздывал относительно замены растворов в измерительной камере в среднем на 6 мин (Рис. 3 Д). Исходя из этого, время отклика самого датчика PCO_2 можно оценить в 2 мин, что близко к данным литературы, которые указывают на отставание измерений углекислоты от измерений рН на 90 с (Odes et al., 1992). Выявленное таким образом 2-х минутное отставание датчика PCO_2 от рН учитывалось во всех дальнейших автоматизированных расчетах.

Основной задачей верификации измерительной системы *in vivo* была оценка скорости обратной диффузии CO_2 в слизистую оболочку желудка при разной полостной концентрации HCO_3^- и разной скорости перфузии органа. В экспериментах стандартные растворы NaHCO_3 (0.25, 0.5 и 1 mM) смешивались в желудке с 10 mM раствором HCl таким образом, чтобы скорость смеси на выходе из желудка равнялась 0.25, 0.5 или 1 мл/мин (Рис. 3 Е). Опыты производились на наркотизированных животных, которым дважды, за 24 ч и за 50 мин до эксперимента, вводили омепразол 10 мг/кг п.к. В результате было выявлено соответствие измеренных на «выходе» из желудка значений HCO_3^- заданным при скорости полостной перфузии 0.5 и 1 мл/мин.

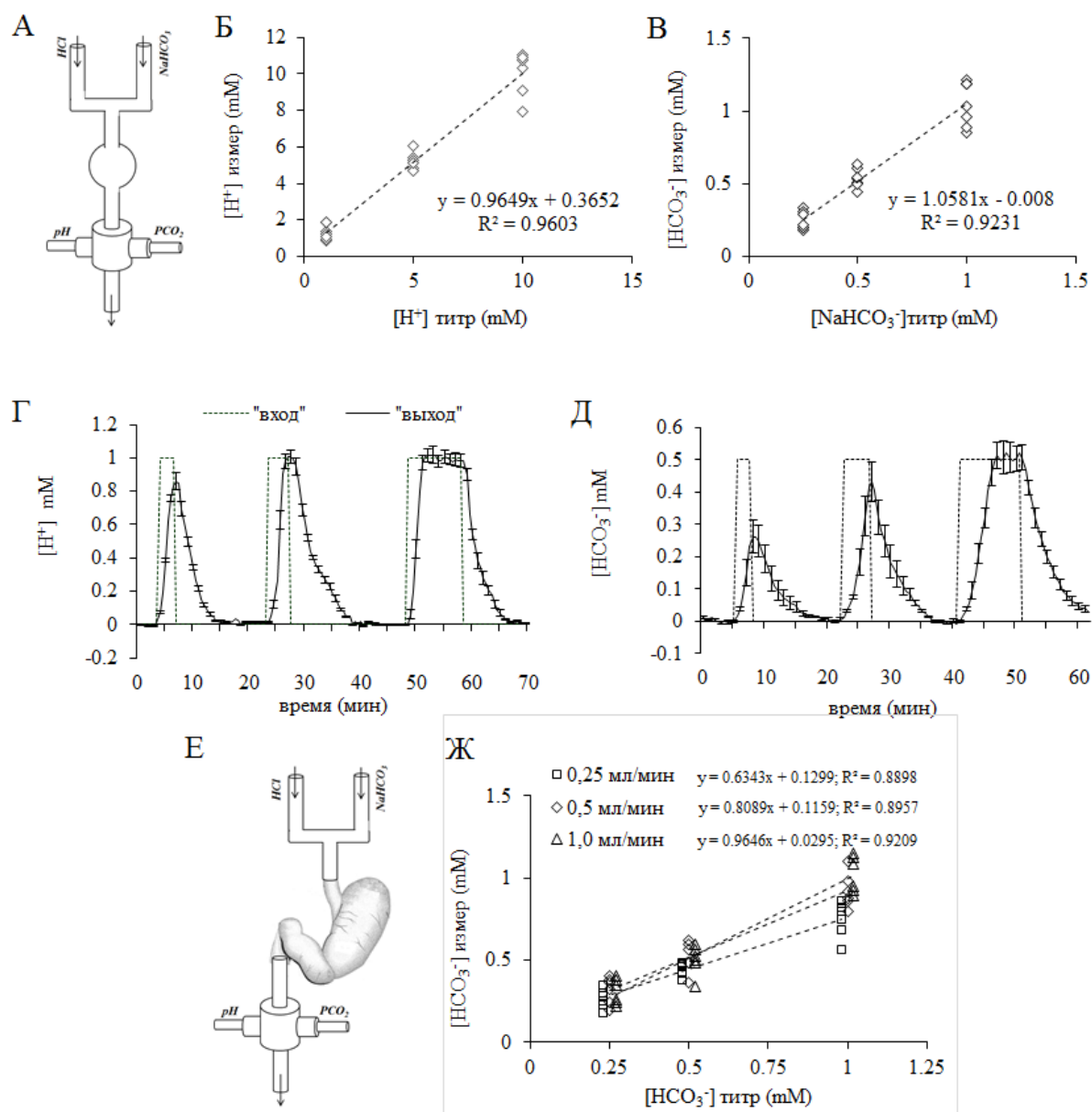


Рис. 3. Верификация измерительной системы pH и ECO₂ *in vitro* и *in vivo*.

А) Схема измерительной системы *in vitro*. Нагреватель при входе потока в датчик не показан. Б) Зависимость измеренной концентрации $[H^+]$ *in vitro* от концентрации HCl (1, 5 и 10 mM) во входящем водном растворе. Через другой входной патрубком подавался 0,25 mM NaHCO₃. В) Зависимость измеренной *in vitro* концентрации $[HCO_3^-]$ от концентрации NaHCO₃ (0,25, 0,5, 1 mM) во входящем водном растворе. Через другой входной патрубком с той же скоростью 0,5 мл/мин подавали 1 mM HCl. Г) Измеренная *in vitro* концентрация $[H^+]$ при введении в поток 1 mM HCl в течение 3, 5 и 10 мин (n=9). Через другой входной патрубком с той же скоростью 0,5 мл/мин подавалась дистиллированная вода. Д) Измеренная *in vitro* концентрация $[HCO_3^-]$ при введении в поток 0,5 mM NaHCO₃ в течение 3, 5 и 10 мин (n=9). Через другой входной патрубком с той же скоростью 0,5 мл/мин подавался 1 mM раствор HCl. Е) Схема измерительной системы *in vivo*. Нагреватель при входе потока в датчик не показан. Ж) Измеренная *in situ* концентрация $[HCO_3^-]$ при прокачивании в течение 3, 5 и 10 мин через желудок растворов NaHCO₃ (0,25, 0,5 и 1,0 mM), смешанных с 10 mM HCl. Измерения проведены после субхронического введения 10 мг/кг п.к. омепразола.

При низкой скорости перфузии (0.25 мл/мин) отмечено существенное уменьшение измеренных значений по сравнению с заданными, которое при большой заданной концентрации HCO_3^- достигает 40% (Рис. 3 Ж). Причиной недооценки «выходных» величин HCO_3^- при сравнительно низком pH в полости желудка стоит считать диффузию CO_2 из измерительной системы, в том числе в СОЖ.

2.3.4 Определение концентрации пепсиногена в перфузате

Концентрацию пепсиногена определяли в пробах перфузионного раствора по разложению гемоглобинового стандарта (Гинодман, Соловьева, 1967). В качестве субстрата использовали 1% раствор бычьего гемоглобина (Sigma-Aldrich Co., USA). Степень гидролиза гемоглобина оценивали по поглощению в ультрафиолетовой части спектра растворимыми продуктами его разложения пепсином, которые не осаждались 7% трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Для этого был использован спектрофотометр СФ-46 (ЛОМО, Россия). В качестве эталона для построения калибровочной кривой использовали свиной пепсин (Sigma-Aldrich Co., USA) с активностью 122 Ед/г. При проведении анализа пробу желудочного перфузата или эталонное разведение свиного пепсина (0-15 мкг) в физиологическом растворе объемом 0.5 мл смешивали с 0.5 мл буфера, содержащего 0.1 М HCl, 0.02 М NaOH и 1.5 mM лимонной кислоты, и 0.5 мл 1% гемоглобина, разведенного в этом же буфере. Полученную смесь инкубировали ½ часа при 37 °C и далее добавляли 1.5 мл 7% раствор ТХУ, после чего оставляли на ½ часа при комнатной температуре для осаждения. После центрифугирования супернатант разбавляли водой в 2 раза и определяли его оптическую плотность при длине волны 280 нм.

Поскольку в работе анализировали влияние ирритации СОЖ на желудочную секрецию, была проведена верификация метода определения

[Type here]

концентрации пепсиногена в условиях повышенного осмотического давления. Для этого эталонные разведения свиного пепсина делали в растворе 154, 500 и 1000 mM NaCl. Сравнение гидролиза гемоглобина в этих растворах, проведенное, как описано выше, не выявило различий.

2.4 Оценка объемного кровотока в стенке желудка

В отдельной серии опытов проводилась лазерная доплеровская оценка скорости кровотока в стенке желудка. Для измерений использовали лазер-доплеровский флоуметр PeriFlux 2200 (Perimed, Швеция) со стандартным датчиком PF 308 (диаметр рабочей части 3 мм). Датчик укреплялся на гибком кронштейне вертикально над серозной оболочкой передней стенки тела желудка. На корпус датчика надевали отрезок силиконовой трубки, удерживающий ткань на расстоянии 0.5-1 мм от рабочей поверхности датчика. Подвижность желудка ограничивалась плексигласовой пластиной, подведенной под малую кривизну со стороны пищевода. Передняя стенка желудка в месте регистрации дополнительно поддерживалась изнутри жестко зафиксированной перфузионной канюлей, введенной через преджелудок. Выходной сигнал флоуметра в мВ преобразовался в перфузионные единицы.

2.5 Регистрация данных и программное обеспечение

Сигналы от кардиографических электродов, датчика артериального давления (ПДП-300, Москва) и ректального термометра передавались в модуль усилителей биопотенциалов (Муравьев и др. 1988). ЭДС pH и PCO₂-датчиков регистрировалась с помощью pH-милливольтметров П-215 (Гомельприбор, Белоруссия). Усиленные сигналы направлялись в аналого-цифровой преобразователь ADC-PCI 6024E (National Instruments Co., США). Выходной сигнал лазер-доплеровского флоуметра передавался через интерфейс RS 232. Компьютерный анализ и обработка данных экспериментов производилась с помощью пакетов программирования LabView 8.5 (National

Instruments Co., США). В экспериментах текущие значения pH, PCO_2 , частоты сердечных сокращений, АД и температуры тела усреднялись раз в 30 с и сохранялись в виде таблицы на жестком диске компьютера. Сигнал доплеровского флоуметра усредняли за 3 сек.

2.6 Препаровка и электрическое раздражение блуждающего нерва

Для проведения нескольких серий экспериментов требовалась препаровка левого поддиафрагмального ствола блуждающего нерва и левого шейного блуждающего нерва. Топография основных ветвей левого (вентрального) и правого (дорзального) поддиафрагмального блуждающего нерва представлена на рисунке 1Б. Оба ствола блуждающего нерва перевязывались под диафрагмой. Участок левого ствола дистальнее печеночной ветви длиной около 4 мм очищали от соединительной ткани, помещали на биполярные Ag/AgCl электроды и защищали от высыхания каплей вазелинового масла. Электрическое раздражение периферического отрезка нерва производилось с помощью стимулятора ЭСЛ- 2 (Россия) прямоугольными электрическими импульсами (10В, 1мс, 8Гц) и продолжалось в течение 10 мин. В ряде контрольных опытов раздражение вагуса производилось после перерезки больших чревных нервов и перевязки обоих надпочечников.

Для избирательной стимуляции групп волокон субдиафрагмального блуждающего нерва варьировалась длительность и амплитуда электрических импульсов. Выбор параметров раздражения проводили, измеряя латентность вызванного потенциала (ВП), который регистрировали в шейном отрезке левого вагуса в ответ на раздражение субдиафрагмального участка нерва. Для этого шейный отрезок левого блуждающего нерва, разделенный на несколько пучков волокон, помещали на регистрирующие биполярные хлорированные серебряные электроды. Оба шейных ствола перевязывали краниальнее электродов. Участок левого вагуса ниже печеночной ветви помещали на

[Type here]

биполярный Ag/AgCl электрод. Раздражение проводили прямоугольными электрическими импульсами амплитудой 4-6 В и длительностью 0.05, 0.1 и 1.0 мс. Анод при этом располагали краниально. При длительности раздражающего стимула 0.05 мс и амплитуде 4.5 – 6 В регистрировались ВП в волокнах шейного отрезка нерва со средней скоростью проведения импульса 4.26 ± 0.06 м/с ($n=35$), которая соответствует группе волокон В. Увеличение длительности импульса до 0.1 мс и амплитуды до 6 В вызывало генерацию дополнительной волны ВП значительно большей амплитуды, возникавшей в волокнах со скоростью проведения 2.11 ± 0.07 м/с ($n=50$), классифицированных здесь как «быстро проводящая» популяция С-волокон (C1). Импульсы длительностью 1.0 мс стимулировали появление поздней волны ВП в волокнах со средней скоростью проведения 0.95 ± 0.09 м/с ($n=35$), характеризовавшей «медленно проводящую» популяцию С-волокон (C2). Дальнейшее увеличение длительности стимула не приводило к появлению новых волн ВП. После определения индивидуальных параметров раздражения групп волокон (В, В+С1 или В+С1+С2) левого субдиафрагмального вагуса для каждого препарата, полярность раздражающих электродов менялась и наносилось раздражение 10-минутной серией импульсов с частотой 8 Гц (Золотарев и др., 2002).

2.7 Оценка индекса поражения и относительной площади гиперемии СОЖ

По окончании эксперимента желудок изымали, вскрывали по большой кривизне и после очистки СОЖ смоченным в физиологическом растворе тампоном производили подсчет макроскопических поражений. Слабая ирритация, примененная в экспериментах не вызывает существенных повреждений СОЖ. Тем не менее наблюдавшиеся незначительные изменения эпителия попадали в шкалу поражений, предложенную Гутом соавт. (Guth et al., 1979). Повреждения по этой шкале оцениваются следующим образом:

[Type here]

точечное кровоизлияние - петехия (1 балл), эрозия <1 мм (2), эрозия 1-2 мм (3), эрозия 2-4 мм (4), и эрозия >5 мм (5). Сумма баллов, соответствующая обнаруженным изъянам на железистой части эпителия, является индексом поражения. К данной оценке добавлялось планиметрическое измерение относительной площади гиперемизированных участков СОЖ (Scion Image 4.0; Scion Corp., USA).

2.8. Используемые препараты

В экспериментах использовались нижеперечисленные препараты. Омепразол (Astra, Швеция; 10 мг/кг) инъекцировали дважды: внутривентрально (в.б.) за 16-18 часов до опыта, а также внутривенно (в.в.) за 50 мин до воздействия ирритантов. Индометацин (ИНД, 5 мг/кг) вводили в.в. за 50 мин до ирритации, N^ω-нитро-L-аргинин (L-NNA, 10 мг/кг) и 7-нитроиндазол (7-NI, 10 мг/кг), произведенные Sigma-Aldrich Co. (США), инъекцировали в.в. за 15 мин до воздействия. В отдельных опытах производили близкую внутриартериальную (в.а.) инъекцию препаратов ретроградно в чревную артерию в дозе 1 мг/кг (L-NNA либо 7-NI) и 0.5 мг/кг (ИНД). Нитропруссид натрия (SNP, Sigma-Aldrich Co., USA) инъекцировали в.а. в дозе 0.2 мг/кг за 15 мин до воздействия. Метиленовую синь (Santa-Cruz Biotechnology, USA) вводили за 15 мин до воздействия (0.2 мг/кг, в.а.), либо её раствором (2 мг/мл) перфузировали желудок в течение 10 мин. Блокатор карбоангидраз ацетазоламид (АЦТЗ, Sigma-Aldrich Co., USA) инъекцировали в.в. за 15 мин до ирритации в дозе 50 мг/кг. Блокатор анионных транспортеров 4,4'-диизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновой кислотой (DIDS; Sigma-Aldrich Co., USA) вводили в дозе 5 мг/кг за 15 мин до ирритации. Хлорид аммония (4 мМ, Sigma-Aldrich Co., USA) апплицировали внутрижелудочно (в.ж.) в течение 10 мин, начиная введение за 15 мин до ирритации. Химическая деструкция капсаицин-чувствительных нейронов достигалась с помощью подкожных (п.к.) инъекций капсаицина (50 мг/кг, Sigma-Aldrich Co., USA),

[Type here]

повторявшихся ежедневно в течение 3-х дней за неделю до эксперимента. Для инъекций капсаицин растворяли сначала в смеси Tween 80 и этиловом спирте (1:1) и затем в физиологическом растворе. Блокатор TRPV1 рецепторов капсазепин (Sigma-Aldrich Co., USA) вводили в течение 20 мин ретроградно в селезеночную артерию ($0.6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$, в.а.), начиная введение за 5 мин до ирритации. Блокатор ASIC амилорида гидрохлорид (Sigma-Aldrich Co., USA) добавлялся в течение 15 мин до ирритации в перфузионный раствор (в.ж.) в концентрации 0.2 mM.

Уретан, атропина сульфат и гексаметония гидрохлорид (Sigma-Aldrich Co., USA) растворяли в физиологическом растворе. Блокаторы NOS, ИНД, АЦТЗ, DIDS, ASIC и капсазепин растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO, Вектон, Россия), после чего доводили до нужной концентрации физиологическим раствором. Контрольные группы животных получали в.в. равный объем растворителя, 0.1% DMSO, эмульгированный в физиологическом растворе.

2.9 Представление данных, статистический анализ

Результаты экспериментов представлены как скорость секреции и продукция HCO_3^- , нормированные на сырой вес желудка. Базальная секреция рассчитывалась путем усреднения измерений в течение 5 мин перед началом раздражения СОЖ. Удельную продукцию вычисляли методом трапеций, как суммарную секрецию в течение заданного времени после начала раздражения за вычетом базального уровня. Относительная скорость кровотока рассчитывалась в процентах от базального уровня, принятого за 100%. Все данные представлены в виде средних арифметических и стандартных ошибок ($M \pm m$). Чтобы избежать наложения друг на друга планок погрешностей на кривых секреции, стандартную ошибку показывали только для каждого 10-го значения.

Величина выборки (n) соответствовала числу экспериментальных животных, поскольку к животному применялось только одно воздействие. Статистические сравнения эффектов блокаторов cNOS, ИНД и эффектов капсазепина проведены с помощью смешанного дисперсионного анализа (ANOVA). Результаты однофакторного ANOVA представлены в тексте, а результаты многофакторного анализа приведены в Приложении 1. Зависимой переменной в 3-х факторном анализе была скорость секреции на фоне ирритации (эффект ирритации), а в 2-х факторном – продукция бикарбонатов на фоне блокаторов cNOS. Последующие множественные сравнения производили, используя тест Фишера LSD. Дисперсия разности двух независимых величин рассчитывалась по формуле сложения дисперсий (Худсон, 1970). Различия признавались значимыми при $p < 0.05$. Для всех расчетов использован пакет программ Statistica 7.0 (StatSoft, Russia).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Влияние экзогенной кислоты и полостного осмотического давления в желудке на секрецию бикарбонатов и пепсиногена в зависимости от активности H^+,K^+ -АТФазы

В большинстве работ, сформировавших современное представление о действии химических раздражителей на желудочную секрецию бикарбонатов (Aihara et al., 2005a) и пепсиногена (Blandizzi et al., 1997), подавление секреции кислоты было обязательным условием эксперимента. Этот прием оказался необходимым в связи с ограничениями метода обратного титрования, предназначенного для измерения концентрации бикарбонатов в нейтральной среде. В то же время естественная ацидификация желудка существенно влияет на его функции, в частности, гастропротективные процессы протекают активнее, чем при искусственном увеличении кислотности (Phillipson et al., 2002).

В этом разделе описываются результаты экспериментов, в которых впервые желудочная секреция бикарбонатов, вызванная раздражением СОЖ, регистрировалась при сохраненной фоновой секреции кислоты (нормацидное состояние) у бодрствующих и наркотизированных животных. Измерение концентрации HCO_3^- в полостном желудочном перфузате, рассчитанное по показателям pH/P_{CO_2} , позволило выяснить роль эндогенной секреции кислоты в реакции СОЖ на химическое раздражение.

Примененные в работе химические воздействия на СОЖ были значительно слабее, чем у потенциально некротизирующих агентов, которые использовались в базовых исследованиях, раскрывших механизмы адаптивной гастропротекции (Robert et al., 1983; Takeuchi et al., 2001a). Такой подход показал, насколько химический фон близкий к естественному, возникающему в процессе пищеварения, а именно умеренная полостная

кислотность (рН 2.0) и осмотическое давление, способен запускать гастропротективные процессы, о чем ранее не было известно.

С полостной кислотностью в желудке тесно связана продукция пепсиногена и протеолитическая активность пепсина (Bladizzi et al., 1997; Smith, Torres, 1990). Поскольку пристеночный слой слизи создает малопроницаемый барьер для проникновения из полости желудка крупных молекул (Allen, Flemström, 2005), присутствию пепсина как агрессивного фактора в желудке ранее уделялось меньше внимания, чем действию кислоты.

3.1.1 Влияние слабой ирритации СОЖ на продукцию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена в желудке бодрствующих крыс; эффект омепразола

Данная серия экспериментов была проведена на бодрствующих крысах после 18-20-часового голодания при непрерывной перфузии полости желудка через двойной коаксиальный зонд, введенный в фистулу (Рис. 1Г). При перфузии изотоническим раствором NaCl (154 мМ, рН 4.0) в желудке стабильно регистрировалась значительная базальная кислотность (рН 2.4 - 3.0), которой соответствовала скорость секреции хлороводородной кислоты $3.53 \pm 0.23 \text{ мкмоль} \times \text{г}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$ (n=15). Базальная секреция бикарбонатов равнялась $1.41 \pm 0.08 \text{ мкмоль} \times \text{г}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$, а пепсиногена $2.25 \pm 0.18 \text{ мкг} \times \text{г}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$ (n=15).

Непродолжительная (10 мин) замена полостного перфузионного раствора на один из растворов слабых ирритантов (150 мМ NaCl, рН 2.0 либо 500 мМ NaCl, рН 4.0) приводила к угнетению секреции кислоты, причем аппликация гипертонического раствора низкой кислотности (рН 4.0) подавляла секрецию кислоты в большей степени, чем подкисленный изотонический раствор (тест Манна-Уитни, $p < 0.05$, n=8~7; Рис. 4В). Секреция бикарбонатов в ответ на действие слабых ирритантов, напротив, увеличивалась. Гипертонический раствор (рН 4.0) активировал продукцию HCO_3^- в большей мере, чем кислый

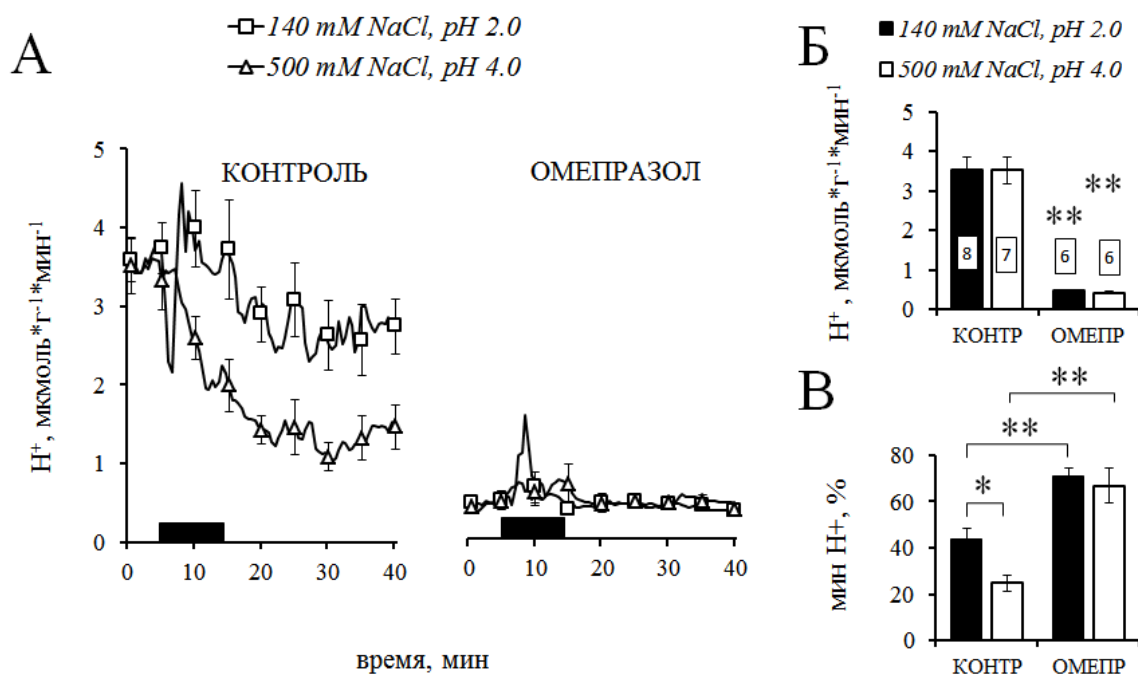


Рис. 4. Ослабление желудочной секреция кислоты у бодрствующих крыс в ответ на аппликацию на СОЖ растворов слабых ирритантов при сохраненной базальной секреции кислоты (КОНТР), либо после угнетения секреции кислоты омепразолом (ОМЕПР).

А) Скорость секреции. Б) Базальная секреция, усредненная в течение 5 мин до аппликации ирританта. В) Минимальная скорость секреции после ирритации по отношению к фоновому уровню, принятому за 100%.

Непрерывная перфузия полости желудка через хроническую фистулу изотоническим раствором (150 mM NaCl pH 4.0). Ирритацию СОЖ производили путем перфузии в течение 10 мин гипертоническим раствором сравнительно низкой кислотности (500 mM NaCl pH 4.0), либо изотоническим подкисленным раствором (140 mM NaCl pH 2.0). Период аппликации ирританта отмечен полосой на графике А. Омепразол (10 мг/кг, п.к.) инъектировали дважды в день в течение 3-х дней до эксперимента.

Статистические сравнения проведены с помощью теста Манна-Уитни: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Величина выборок указана на диаграмме Б.

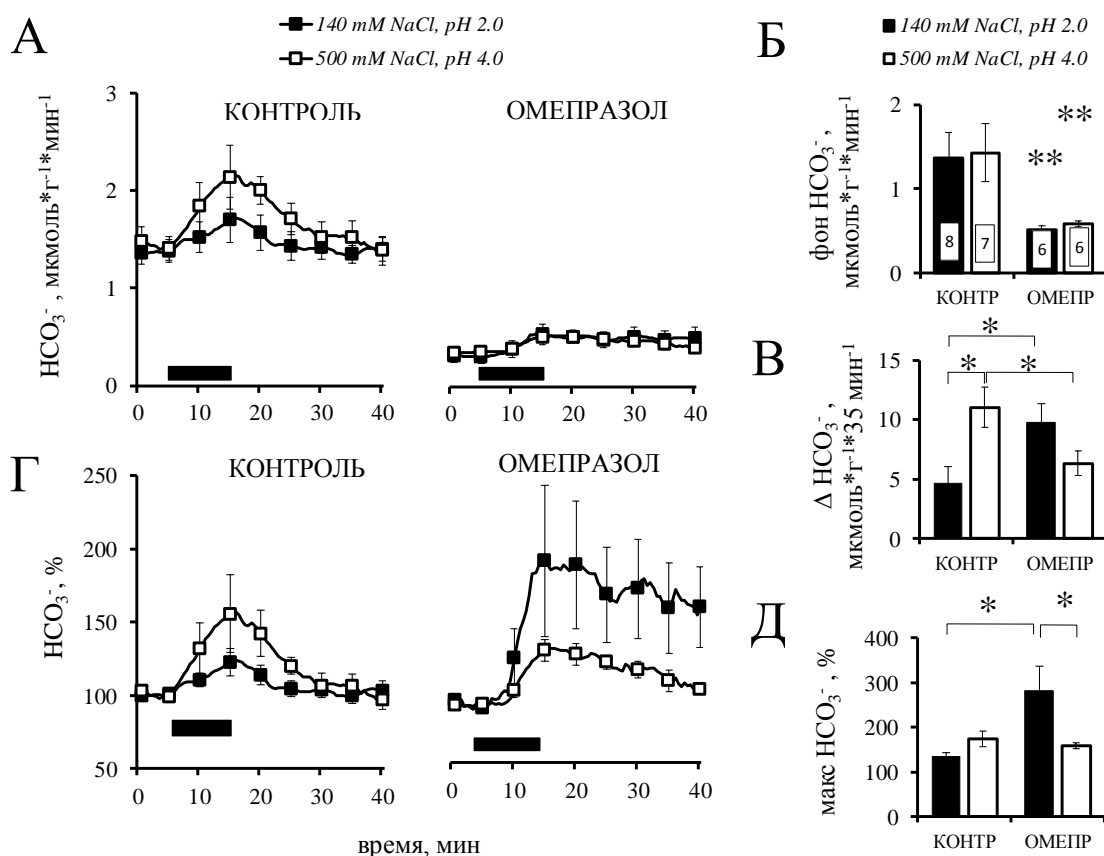


Рис. 5. Усиление желудочной секреции бикарбонатов у бодрствующих крыс в ответ на аппликацию на СОЖ растворов слабых ирритантов при сохраненной базальной секреции кислоты (КОНТР), либо после угнетения секреции кислоты омепразолом (ОМЕПР).

А) Скорость секреции. Б) Фоновая секреция, усредненная в течение 5 мин до аппликации ирританта. В) Удельная продукция. Г) Относительная скорость секреции. Д) Максимальная скорость секреции на фоне ирритации по отношению к фоновому уровню, принятому за 100%.

Непрерывная перфузия полости желудка через хроническую фистулу изотоническим раствором (150 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ путем перфузии в течение 10 мин гипертоническим раствором сравнительно низкой кислотности (500 mM NaCl pH 4.0) либо изотоническим подкисленным раствором (140 mM NaCl pH 2.0). Период аппликации ирританта отмечен полосой на графиках А и Г. Омепразол (10 мг/кг, п.к.) инъектировался дважды в день в течение 3-х дней до эксперимента.

Статистические сравнения проведены с помощью теста Манна-Уитни: *- $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Величина выборок указана на диаграмме Б.

изотонический ($p < 0.05$; $n = 8 \sim 7$; Рис 5 В). Ирритация вызывала двухфазное изменение секреции пепсиногена. За аппликацией ирританта следовало краткое, в течение 15 мин, ослабление секреции, после чего наблюдался рост вплоть до величин превосходящих базальные. В связи с этим в дальнейшем сравнивались значения суммарной секреции пепсиногена, рассчитанной как продукция в промежуток времени, начиная с момента введения ирританта. Такое сравнение не показало различий в действии гипертонического и подкисленного изотонического растворов на продукцию пепсиногена (Рис. 6 А, В).

Подавление эндогенной секреции кислоты омепразолом (ОМЕ) закономерно снижало базальную кислотность (рН 3.8-4.6), т.е. секреция уменьшалась до 0.44 ± 0.03 мкмоль \times мин⁻¹ \times г⁻¹ ($p < 0.0001$, $n = 12$; Рис. 4 Б). Кроме того, в присутствии ОМЕ значительно ослабевала фоновая секреция бикарбонатов до 0.55 ± 0.06 мкмоль \times мин⁻¹ \times г⁻¹ ($p < 10^{-4}$, $n = 12$; Рис 5 Б), но фоновая секреция пепсиногена не менялась (Рис. 6 А, Б).

Аппликация слабых ирритантов в присутствии ОМЕ достоверно не повлияла на низкий уровень кислотности в желудке. В то же время отмечены изменения непариетальной секреции, зависящие от характера раздражения СОЖ. Внутрижелудочное введение кислоты (140 mM NaCl, рН 2.0) на фоне ОМЕ стимулировало секрецию HCO_3^- в большей мере, чем гипертонический раствор относительно низкой кислотности (Рис. 5 Б, $p < 0.05$). Также достоверно увеличивалась относительная скорость секреции HCO_3^- (Рис. 5, В). Суммарная продукция пепсиногена на фоне ОМЕ при аппликации подкисленного изотонического раствора была больше примерно на 25%, чем при воздействии гипертонического раствора низкой кислотности (Рис. 6 В).

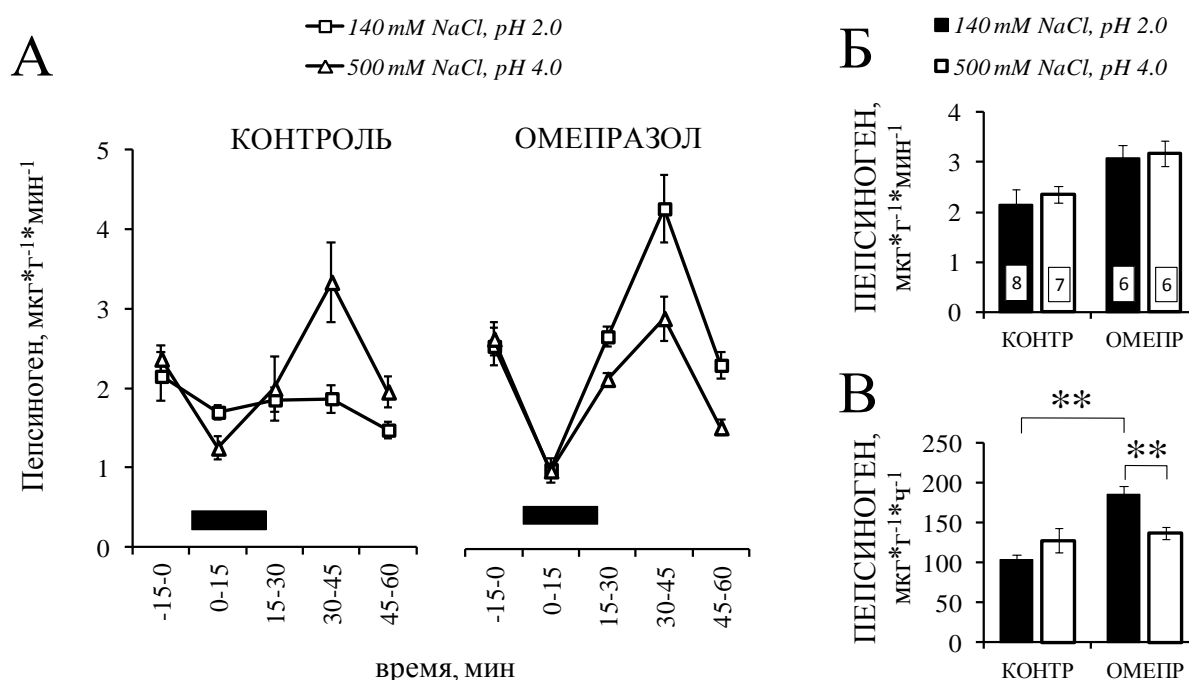


Рис. 6. Желудочная секреция пепсиногена у бодрствующих в ответ на аппликацию на СОЖ растворов слабых ирритантов при сохраненной базальной секреции кислоты (КОНТР), либо после угнетения секреции кислоты омепразолом (ОМЕПР). А) Скорость секреции. Б) Фоновая секреция, усредненная в течение 5 мин до аппликации ирританта. В) Продукция.

Непрерывная перфузия полости желудка через хроническую имплантированную фистулу изотоническим раствором (150 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ путем перфузии в течение 10 мин гипертоническим раствором сравнительно низкой кислотности (500 mM NaCl pH 4.0), либо изотоническим подкисленным раствором (140 mM NaCl pH 2.0). Аппликация ирританта отмечена полосой на графиках А и Г. Омепразол (10 мг/кг, п.к.) инъектировался дважды в день в течение 3-х дней до эксперимента.

Статистические сравнения проведены с помощью теста Манна-Уитни: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Величина выборок указана на диаграмме Б.

3.1.2 Продукция бикарбонатов и пепсиногена в желудке наркотизированных крыс зависимости от градиента кислотности в полости органа

Дальнейший анализ влияния полостной кислотности в желудке на продукцию бикарбонатов и пепсиногена проводился на наркотизированных животных после двусторонней субдиафрагмальной ваготомии при подавлении собственной базальной секреции кислоты с помощью ОМЕ (10 мг/кг в.б. за 18 час до эксперимента и в.в за 50 мин до введения ирританта).

В данной серии экспериментов полость органа перфузировали растворами ирритантов продолжительное время (40 мин), за которое достигался выход скорости секреции на плато либо регистрировался максимум и последующее снижение скорости секреции. Гипертоническое воздействие на СОЖ (500 mM NaCl, pH 4.0) не приводило к изменениям в секреции (Рис. 7, 8). В то же время уменьшение pH гипертонического раствора на 2 единицы стимулировало примерно 15% увеличение скорости секреции HCO_3^- , сохранявшееся на протяжении всего воздействия (Рис. 7А). Секреция пепсиногена после краткого ослабления в первые 15-мин усиливалась и через 30-45 мин превышала фоновые значения (Рис. 8А).

В ряде опытов полость желудка непрерывно перфузировали раствором повышенной кислотности (150 mM, NaCl pH 3.0), не вызывавшим, однако, достоверных изменений базальной секреции HCO_3^- и пепсиногена. На фоне такой перфузии уменьшение pH до 2 при одновременном гипертоническом воздействии сопровождалось меньшим ростом удельной продукции HCO_3^- (Критерий Манна-Уитни, $p < 0.05$, $n = 12 \sim 6$; Рис. 7В) и общей продукции пепсиногена ($p < 0.05$, $n = 12 \sim 6$; Рис. 8В), чем при смещении на pH на 2 единицы. Тем не менее, абсолютная и относительная скорость секреции HCO_3^- не менялась.

В целом данная серия экспериментов показала, что слабое химическое раздражение СОЖ, сопоставимое с физиологическим уровнем кислотности и

[Type here]

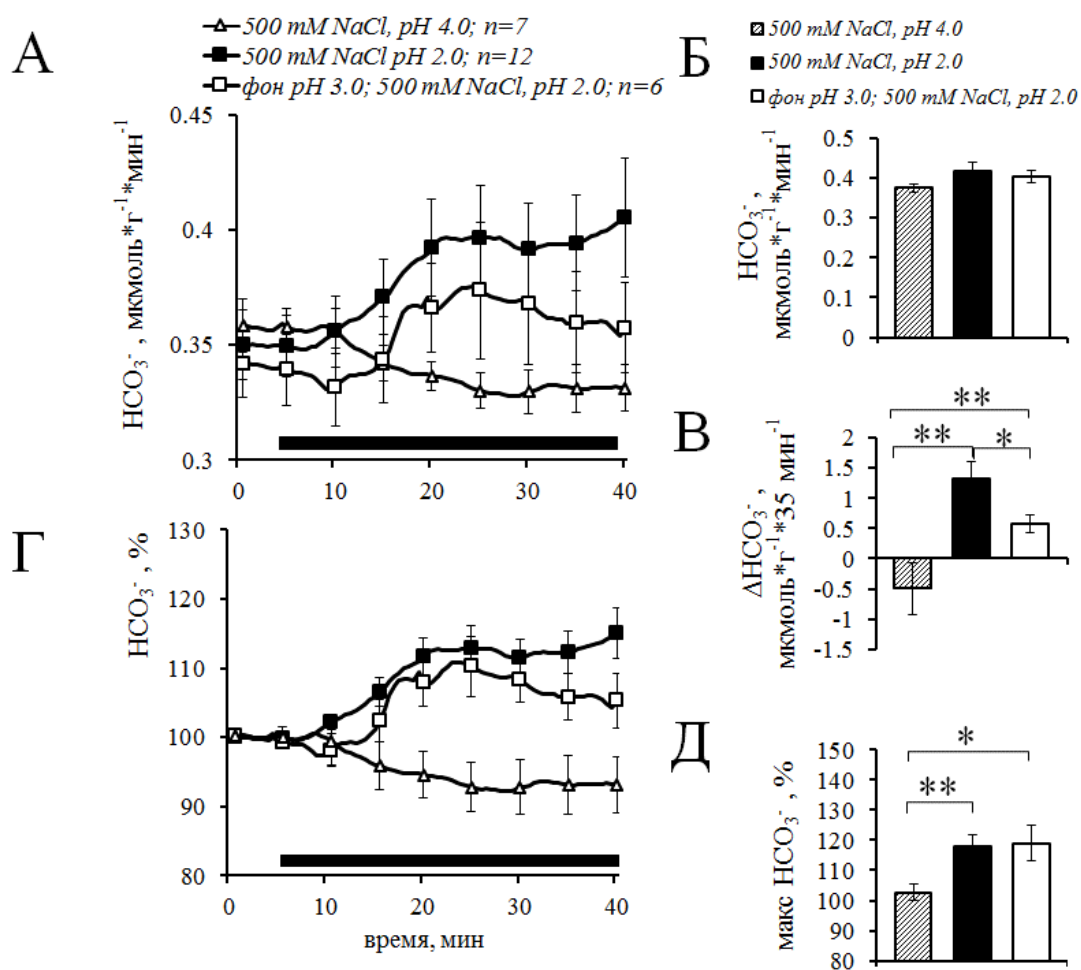


Рис. 7. Желудочная секреция бикарбонатов у наркотизированных крыс после двусторонней субдиафрагмальной ваготомии и инъекции омепразола. Полостная перфузия желудка растворами слабых ирритантов разной кислотности.

А) Скорость секреции. Б) Базальная секреция, усредненная в течение 5 мин до аппликации ирританта. В) Удельная продукция. Г) Относительная скорость секреции. Д) Максимальная скорость секреции по отношению к фоновому уровню, принятому за 100%.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (150 mM NaCl) pH 4.0 либо pH 3.0. Ирритация СОЖ в течение 40 мин гипертоническим раствором (500 mM NaCl), pH 4.0 или pH 2.0. Период аппликации ирританта отмечен полосой на графиках А и Г. Омепразол (10 мг/кг) инъектировался дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации ирританта (в.в.).

Статистические сравнения проведены с помощью критерия Манна-Уитни: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Величина выборок указана в легенде графика А.

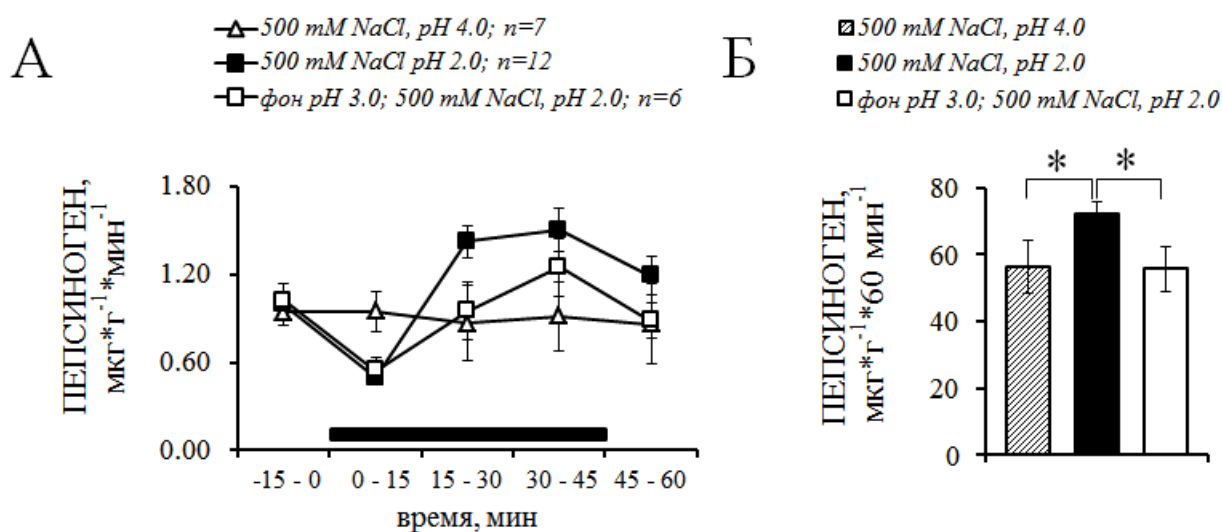


Рис. 8. Желудочная секреция пепсиногена у наркотизированных крыс после двусторонней субдиафрагмальной ваготомии и инъекции омепразола. Полостная перфузия желудка растворами слабых ирритантов разной кислотности. А) Скорость секреции. Б) Суммарная продукция.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (150 mM NaCl) pH 4.0 либо pH 3.0. Перфузия желудка в течение 40 мин гипертоническим раствором (500 mM NaCl), pH 4.0 или pH 2.0. Аппликация ирританта отмечена полосой на графиках А и Б. Омепразол (10 мг/кг) инъецировался дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации ирританта (в.в.).

Статистические сравнения проведены с помощью критерия Манна-Уитни: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Величина выборок указана в легенде графика А.

осмолярности в желудке во время пищеварения, способно активировать продукцию бикарбонатов и пепсиногена в желудке как бодрствующих, так и наркотизированных животных. Блокада собственной продукции кислоты у бодрствующих животных усиливает действие слабых ирритантов на секрецию бикарбонатов и пепсиногена. Доказано, что основной причиной такого усиления является увеличение градиента рН при раздражении СОЖ.

3.2 Действие избирательной и неизбирательной блокады изоформ конститутивной синтазы оксида азота на желудочную секрецию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена на фоне ирритации СОЖ; влияние простагландинов

Увеличение продукции эндогенного оксида азота в СОЖ, связанное с активностью cNOS, описывается как один из основных факторов адаптивной гастропротекции. Изоформы cNOS (eNOS и nNOS) неравномерно распределены в тканях желудка, что предопределяет их различное влияние на развитие эрозивных поражений (Hasebe et al., 2005; Quintana et al., 2004). Тем не менее особенности действия eNOS и nNOS на состояние защитного бикарбонатного барьера и продукцию пепсиногена в желудке до сих пор экспериментально не установлены. Поэтому в работе впервые оценивалось селективное влияние eNOS и nNOS на продукцию бикарбонатов и пепсиногена, вызванную непродолжительной ирритацией СОЖ при разных уровнях эндогенной секреции кислоты. Поскольку в известных исследованиях для угнетения NOS в желудке применялись только структурные аналоги L-Arg, в проведенных экспериментах также был использован неселективный блокатор конститутивных NOS - N ω -нитро-L-аргинин (L-NNA), что позволило корректно сопоставить полученные данные с литературными. Другой примененный здесь блокатор NOS – это селективный блокатор nNOS 7-нитроиндазол (7-NI) (Southan, Szabo, 1996), который ранее не использовался для оценки роли NO в регуляции желудочной секреции. Поскольку cNOS и

ЦОГ часто присутствуют в одних и тех же или в соседних клетках, и их активность взаимозависима (Kim, 2011), в этом разделе рассматривается взаимодействие нитрергической и простагландиновой системы при ирритации СОЖ, для чего эффективность 7-NI и L-NNA оценивается на фоне блокады синтеза ПГ индометацином.

3.2.1 Влияние L-NNA, 7-NI и омепразола на базальную секрецию кислоты и бикарбонатов в желудке

В экспериментах на наркотизированных крысах в условиях непрерывной полостной перфузии изотоническим раствором pH 4.0 базальная желудочная секреция кислоты и бикарбонатов (1.02 ± 0.23 и 0.41 ± 0.06 мкмоль \times мин $^{-1}\times$ г $^{-1}$, соответственно, n=8) регистрировалась после 40 мин стабилизации физиологических параметров. В результате системного введения блокаторов cNOS (L-NNA, 7-NI; оба 10 мг/кг в.в.), а также под действием OME отмечены существенные сдвиги в базальной секреции. Под действием L-NNA либо 7-NI базальной секреции H⁺ уменьшалась (на рисунке не показано; p<0.05, n=8; тест Фишера LSD). На фоне OME, когда базальная секреция H⁺ сокращалась более чем на 80%, оба использованных блокатора cNOS влияния не оказывали.

Базальная секреция бикарбонатов после системного введения блокаторов cNOS или OME существенно не изменялась, как это подтвердил 2-х факторный дисперсионный анализ (Приложение 2, Табл. 1Б). Тем не менее последующие множественные сравнения показали, что в нормацидном состоянии 7-NI угнетал базальную секрецию HCO₃⁻ (тест Фишера LSD; p<0.05, n=9; Рис. 9Б). OME в этих условиях не произвел существенного действия на базальную секрецию HCO₃⁻ (Рис. 9 Б; Приложение 2 Табл. 2Б).

Роль локальной нитрергической регуляции оценивали после двусторонней субдиафрагмальной ваготомии. Блокаторы NOS при этом инъецировали в селезеночную артерию ретроградно, ограничивая область их

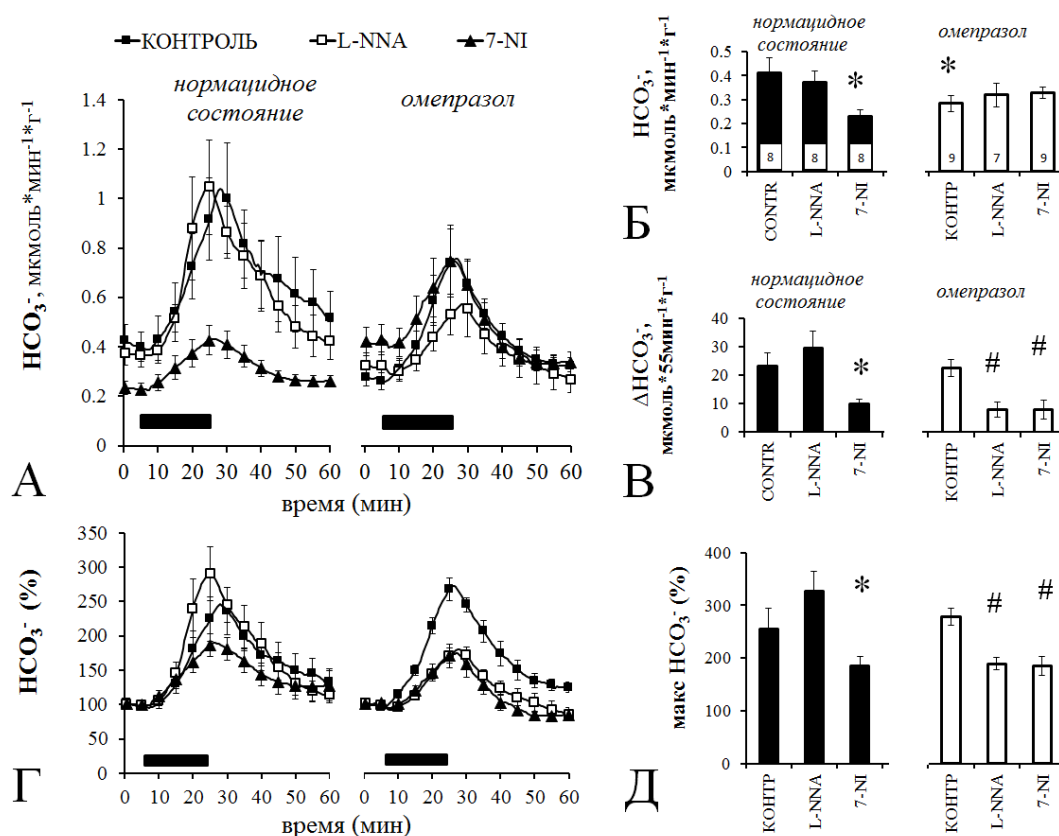


Рис. 9. Системное действие блокаторов конститутивной синтазы оксида азота, L-NNA и 7-NI, на секрецию бикарбонатов в желудке наркотизированных крыс, вызванную ирритацией СОЖ в нормальном состоянии либо после угнетения продукции кислоты омепразолом.

А) Скорость секреции. Б) Базальная секреция, усредненная в течение 5 мин до аппликации ирританта. В) Удельная продукция бикарбонатов. Г) Скорость секреции, нормированная на фоновый уровень, принятый за 100%. Д) Относительная максимальная скорость секреции в присутствии ирританта.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирритантов отмечено полосой на графиках А и Г. L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг в.в.) инъецировали за 15 мин до ирритации. Контрольным группам вводился в.в. DMSO. Омепразол (10 мг/кг) инъецировали дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации ирританта (в.в.). Результаты многофакторного дисперсионного анализа приведены в Приложении 2, Табл. 1.

Абсолютные величины нормированы на сырой вес желудка. Статистические сравнения с соответствующей контрольной группой проведены с помощью теста Фишера LSD; *, # - $p < 0.05$. Размеры выборок указаны на гистограмме Б.

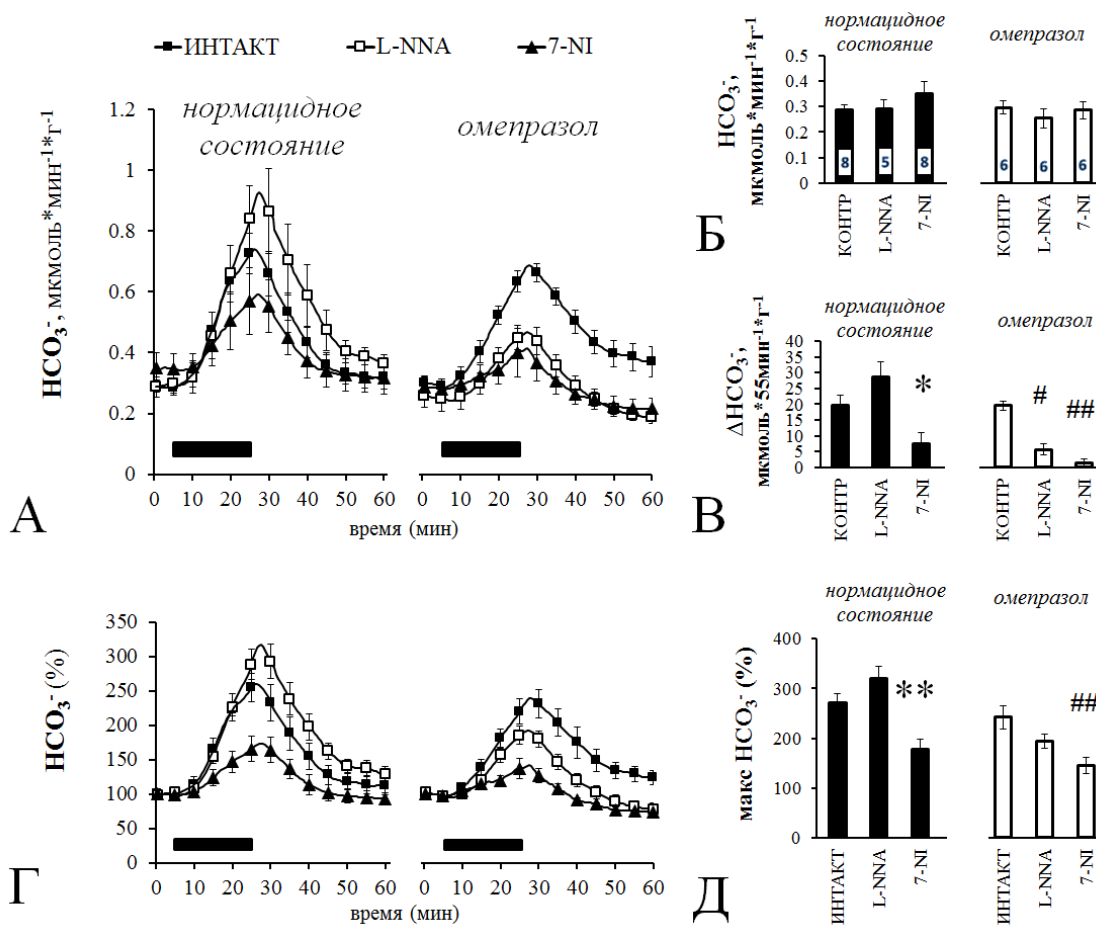


Рис. 10. Влияние близкого внутриартериального введения блокаторов конститутивной синтазы оксида азота, L-NNA и 7-NI, на секрецию бикарбонатов в желудке, вызванную ирритацией СОЖ в нормацидном состоянии, либо после угнетения продукции кислоты омепразолом. Наркотизированные крысы после двусторонней субдиафрагмальной ваготомии.

А) Скорость секреции. Б) Базальная секреция, усредненная в течение 5 мин до аппликации ирританта. В) Удельная продукция бикарбонатов. Г) Скорость секреции, нормированная на фоновый уровень, принятый за 100%. Д) Относительная максимальная скорость секреции под действием ирритантов.

Непрерывная полостная перфузия желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирритантов отмечено полосой на графиках А и Г. L-NNA и 7-NI (оба 1 мг/кг в.а.) инъецировали ретроградно в селезеночную артерию за 15 мин до ирритации. Контрольным группам вводили DMSO. Омепразол (10 мг/кг) инъецировали дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации ирританта (в.в.).

Абсолютные величины, нормированные на сырой вес желудка. Результаты многофакторного дисперсионного анализа представлены в Приложении 2, Табл. 2. Статистические сравнения с соответствующей контрольной группой проведены с помощью теста Фишера LSD; *, # - $p < 0.05$, **, ## - $p < 0.01$. Величины выборок указаны на гистограмме Б.

распространения сосудами верхних отделов брюшной полости. Важно отметить, что использовалась доза блокаторов на порядок меньше (1 мг/кг), чем при системном введении. Множественные сравнения показали, что после близкого в.а. введения 7-NI происходит ослабление базальной секреции кислоты (тест Фишера LSD, $p < 0.05$, $n=10$; на рисунке не показано). На базальную секрецию бикарбонатов локальная инъекция блокаторов cNOS в целом не влияла (Рис. 10 Б; Приложение 2, Табл. 2Б).

3.2.2 Влияние L-NNA, 7-NI и омепразола на желудочную секрецию бикарбонатов, вызванную слабой ирритацией слизистой оболочки органа

Полостная перфузия желудка наркотизированных крыс подкисленным гипертоническим раствором (1 М NaCl, pH 2.0) в течение 20 мин, которую проводили в условиях вагусной иннервации и сохраненной фоновой секреции кислоты, сопровождалась увеличением скорости секреции бикарбонатов до $255 \pm 39\%$ от базального уровня ($n=8$). Регистрация секреции продолжалась 60 мин, включая 5 мин до начала аппликации ирританта. Пик реакции приходился на 20-25-ю мин после начала раздражения СОЖ, затем в течение 30 мин реакция снижалась до исходного уровня (Рис. 9А). На секрецию кислоты полостная перфузия раствором ирританта достоверного действия не оказала (на рисунке не показано).

Блокада cNOS заметно изменила скорость стимулированной секреции и удельную продукцию HCO_3^- . Ранее неизвестным фактом стала демонстрация действия блокаторов в зависимости от уровня эндогенной секреции кислоты (Рис. 9 А, В; Приложение 2, Табл. 1 А, В). При сохраненной секреции кислоты системная инъекция 7-NI (10 мг/кг, в.в.) вызывает ослабление удельной продукции HCO_3^- примерно до 40% от контрольных значений, что подтверждено множественными сравнениями, (Рис. 9 В; $p < 0.05$, $n=8\sim 9$). С

другой стороны, после системного введения той же дозы L-NNA (10 мг/кг, в.в.) наблюдалось 20% увеличение удельной продукции HCO_3^- , которое, однако, не достигало уровня статистической достоверности (Рис. 9 В).

Кислотосупрессия не приводила к изменениям базальной продукции HCO_3^- и не влияла на эффект 7-NI. На фоне ОМЕ 7-NI сохранял свое угнетающее действие, что видно по снижению продукции HCO_3^- почти до 30% от контроля (Рис. 9В; $p<0.05$, $n=9$). В то же время эффект L-NNA менялся практически на противоположный. На фоне блокады эндогенной секреции кислоты L-NNA подавлял удельную продукцию HCO_3^- до 35% от соответствующего контрольного уровня (Рис. 9В; $p<0.001$, $n=7\sim9$).

С учетом разного уровня базальной секреции HCO_3^- в контроле и на фоне 7-NI были проведены дополнительные сравнения относительных величин секреции, полученных при нормировании абсолютных значений на базальный уровень (Рис. 9 Г, Д). Базальная секреция, рассчитанная как среднее значение за 5 мин, предшествовавших аппликации ирританта, принималась за 100%. Сравнение относительных показателей секреции HCO_3^- с помощью ANOVA в целом подтвердило результаты, полученные для абсолютных величин (Приложение 2, Табл. 1 Г, Д). В частности, системное введение 7-NI (10 мг/кг, в.в.) приводило к достоверному снижению максимальной относительной скорости секреции, вызванной ирритацией СОЖ, как в нормацидном состоянии ($p<0.05$, $n=8$), так и в присутствии ОМЕ (Рис. 9 Д; $p<0.05$, $n=9$). Под действием L-NNA (10 мг/кг, в.в.) уменьшение относительной максимальной секреции выявлено только после подавления эндогенной секреции кислоты (Рис. 9Д; $p<0.05$, $n=7\sim9$).

Субдиафрагмальная ваготомия не влияла на стимулированную ирритантами удельную продукцию HCO_3^- . В условиях вагусной децентрализации желудка локальная инъекция блокаторов cNOS в спланхнические кровотоки сопровождалась изменениями в продукции бикарбонатов, аналогичными тем, что наблюдались при системной инъекции

(Приложение 2, Табл. 2 А, В). А именно, в нормацидном состоянии 7-NI (1 мг/кг, в.а.) провоцировал >60% снижение продукции HCO_3^- по сравнению с контрольными величинами ($p < 0.05$, $n=8$), в то время как L-NNA (1 мг/кг, в.а.) вызывал 45% усиление продукции, не имевшее статистической достоверности. На фоне ОМЕ в.а. инъекции как 7-NI ($p < 0.01$, $n=8$), так и L-NNA ($p < 0.05$, $n=8$) приводили к статистически достоверному ослаблению удельной продукции бикарбонатов (Рис. 10 В).

В условиях вагусной децентрализации и близкого внутриартериального введения блокаторов cNOS различий между группами в базальной секреции HCO_3^- выявлено не было. Тем не менее, чтобы сделать результаты этой серии экспериментов полностью сопоставимыми с предыдущими, было произведено нормирование реакции на базальные значения, принятые за 100% (Рис. 10 Г, Д). Сравнение относительной скорости секреции и относительных пиковых значений на фоне ирритации подтвердили данные, полученные при сопоставлении абсолютных величин (Приложение 2, Табл. 2 Г, Д). В частности, относительные значения пиковой секреции в нормацидном состоянии и на фоне ОМЕ уменьшались после близкого внутриартериального введения 7-NI (Рис. 10 Д).

3.2.3 Влияние L-NNA, 7-NI, омепразола и ваготомии на секрецию пепсиногена на фоне слабой ирритации слизистой оболочки органа

При сохраненной парасимпатической иннервации желудка непродолжительная полостная аппликация подкисленного гипертонического раствора (1 М NaCl pH 2.0) вызывала резкое снижение секреции пепсиногена до 25-30% от базального уровня. Эта реакция проявлялась и в нормацидном состоянии, и после кислотосупрессии (Рис. 11А). По окончании ирритации секреция пепсиногена восстанавливалась до базального уровня в течение 30 мин, но достоверно его не превышала.

Трех- и 2-х-факторный дисперсионный анализ подтвердил, что секреция и суммарная продукция пепсиногена зависят от действия ирритантов, ОМЕ и блокаторов cNOS. Отмечено достоверное взаимодействие этих факторов (Приложение 2 Табл. 3 А-В). В частности, показано, что блокада конститутивных NOS ослабляла базальную секрецию пепсиногена (Рис. 11Б). У контрольной группы в нормацидном состоянии секреция пепсиногена возвращалась к исходным значениям через 30 мин после окончания ирритации. В то же время на фоне как L-NNA, так и 7-NI секреция пепсиногена за это время полностью не восстанавливалась, о чем свидетельствует уменьшение суммарной продукции (Рис. 11В). В присутствии ОМЕ базальная секреция существенно не менялась, но ослабевало действие блокаторов cNOS и скорость секреции пепсиногена на фоне L-NNA и 7-NI возвращалась к фоновым значениям уже спустя 15 мин после окончания аппликации ирритантов (Рис. 11 А, Б).

В условиях парасимпатической децентрализации желудка и локальной инъекции блокаторов cNOS в спланхнический кровоток эффекты ОМЕ и блокаторов cNOS значительно сокращались (Приложение 2, Табл. 4). В частности, не выявлялось действие этих факторов на базальную секрецию HCO_3^- . Суммарная продукция угнеталась 7-NI только на фоне ОМЕ (Рис. 12 Б, В)

3.2.4 Действие блокаторов cNOS на секрецию бикарбонатов на фоне неселективного подавления активности циклооксигеназ

Возможность взаимодействия cNOS и ЦОГ при управлении секрецией HCO_3^- *in vivo* была впервые исследована в данной работе путем оценки эффекта L-NNA, либо 7-NI (оба 10 мг/кг, в.в.) на фоне неселективной блокады ЦОГ индометацином (ИНД, 5 мг/кг, в.в.). Последний вводили за 50 мин до ирритации. Собственная секреция кислоты в этой серии экспериментов

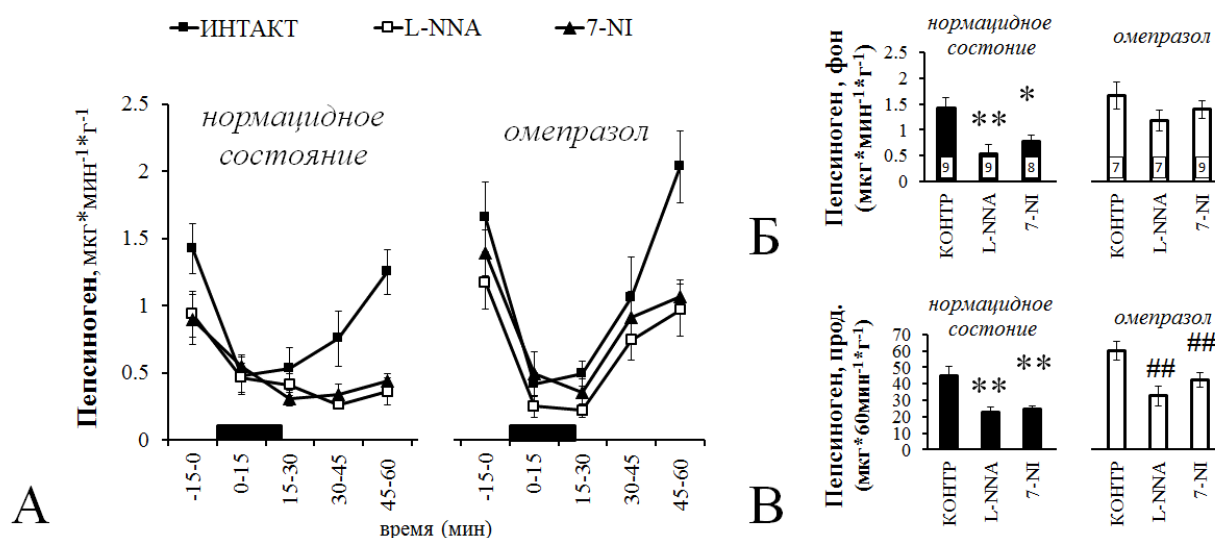


Рис. 11. Влияние блокаторов конститутивной синтазы оксида азота, L-NNA и 7-NI, на секрецию пепсиногена в желудке наркотизированных крыс при ирритации СОЖ в нормационном состоянии, либо после блокады продукции кислоты омепразолом.

А) Скорость секреции. Б) Базальная секреция, усредненная в течение 15 мин до аппликации ирританта. В) Суммарная продукция пепсиногена после аппликации ирританта.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Период аппликации ирритантов отмечен полосой на графике А. L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг в.в.) инъецировали за 15 мин до ирритации. Контрольным группам вводился в.в. DMSO. Омепразол (10 мг/кг) инъецировали дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации ирританта (в.в.).

Все величины нормированы на сырой вес желудка. Результаты многофакторного дисперсионного анализа представлены в Приложении 1, Табл. 3. Статистические сравнения с соответствующей контрольной группой проведены с помощью теста Фишера LSD; * - $p < 0.05$; ** ## - $p < 0.01$. Размеры выборок указаны на диаграмме Б.

подавлялась ОМЕ. Дисперсионный анализ подтвердил влияние ИНД на эффекты ирритации и блокады cNOS в (Приложение 2 Табл. 5А; Рис. 13 А). Множественные сравнения показали, что ИНД, не вызвав существенных сдвигов в базальной секреции HCO_3^- (Рис. 13Б), заметно повлиял на удельную продукцию HCO_3^- , стимулированную ирритацией (Приложение 2, Табл. 5 Б, В). При интактной cNOS введение ИНД приводило к 50% сокращению продукции HCO_3^- ($p < 0.05$, $n = 8 \sim 9$). L-NNA, введенный на фоне ИНД, уже не вызывал уменьшения продукции HCO_3^- , напротив, наблюдалось 4-х кратное увеличение реакции по сравнению с ответом на фоне только L-NNA ($p < 0.01$, $n = 7 \sim 10$). В то же время 7-NI в присутствии ИНД не влиял на удельную и относительную продукцию бикарбонатов (Рис. 13 В-Д).

3.2.5 Действие блокаторов cNOS на секрецию пепсиногена на фоне неселективного подавления активности циклооксигеназ

Совместное действие изоформ конститутивной NOS и ЦОГ на секрецию пепсиногена оценивали с использованием того же экспериментального протокола, что при изучении секреции бикарбонатов (п. 3.2.4). Трехфакторный ANOVA подтвердил достоверное увеличение скорости секреции под действием ИНД, а также взаимодействие эффектов ИНД и блокаторов cNOS (Рис. 14 А; Приложение 2, Табл. 6А). Блокада ЦОГ не влияла на базальную секрецию пепсиногена в контрольных группах, получавших в.в. вместо блокаторов cNOS эмульсию 0.1% DMSO в физиологическом растворе, но заметно увеличивала базальную секрецию в присутствии блокаторов NOS, как L-NNA, так и 7-NI (Рис. 14, А, Б. Приложение 2, Табл. 6Б). В контрольных условиях ИНД не влиял на суммарную продукцию пепсиногена на фоне ирритации СОЖ, но в равной мере потенцировал секрецию в присутствии L-NNA и 7-NI (Рис. 14В. Приложение 2, Табл. 6В).

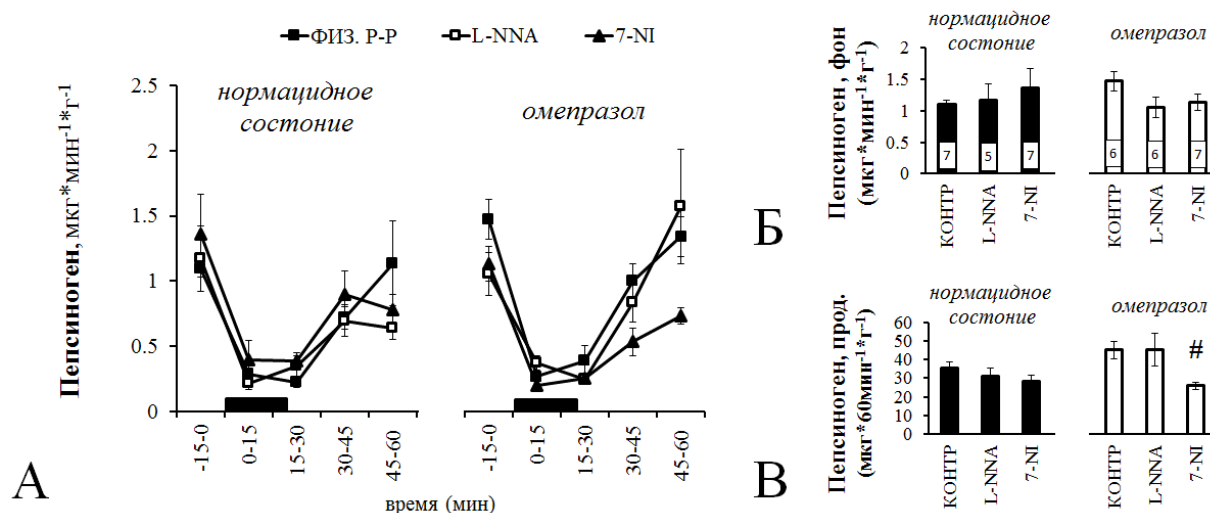


Рис. 12. Влияние блокаторов конститутивной синтазы оксида азота, L-NNA и 7-NI, на секрецию пепсиногена в желудке наркотизированных крыс при ирритации СОЖ в условиях парасимпатической децентрализации в норме или после блокады секреции кислоты омепразолом.

А) Скорость секреции. Б) Базальная секреция, усредненная в течение 15 мин до аппликации ирританта. В) Суммарная продукция пепсиногена с начала аппликации ирританта.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Период аппликации ирритантов отмечен полосой на графике А. L-NNA и 7-NI (оба 1 мг/кг в.а.) инъецировали за 15 мин до ирритации. Контрольным группам вводился DMSO. Омепразол (10 мг/кг) инъецировали дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации ирританта (в.в.).

Все величины нормированы на сырой вес желудка. Результаты многофакторного дисперсионного анализа представлены в Приложении 1, Табл. 4. Статистические сравнения с соответствующей контрольной группой проведены с помощью теста Фишера LSD; # - $p < 0.05$. Размеры выборок указаны на диаграмме Б.

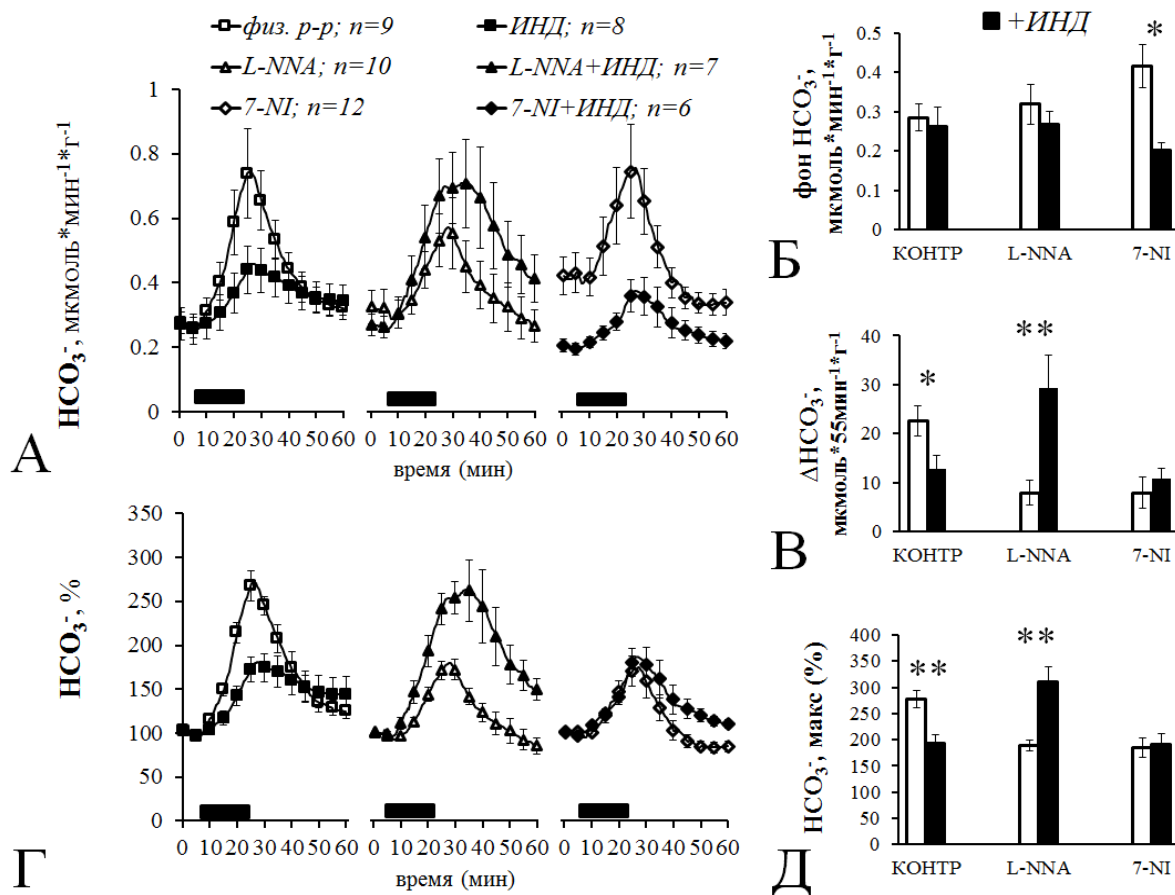


Рис. 13. Действие блокаторов конститутивной синтазы оксида азота (L-NNA и 7-NI) на желудочную секрецию бикарбонатов, вызванную ирритацией СОЖ у наркотизированных крыс. Реакция на фоне подавления активности циклооксигеназ индометацином (ИНД)

А) Скорость секреции. Б) Базальная секреция. В) Удельная продукция. Г) Скорость секреции, нормированная на фоновый уровень, принятый за 100%. Д) Относительная максимальная скорость секреции.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1M NaCl, pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирритантов отмечено полосой на графиках А и Г. L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг в.в.) инъецировали за 15 мин, ИНД (5 мг/кг, в.в.) – за 50 мин до ирритации. Контрольным группам (КОНТР) вводился DMSO (0.1 %, в.в.). Омепразол (10 мг/кг) инъецировали за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин (в.в.) до аппликации ирританта.

Абсолютные величины нормированы на сырой вес желудка. Статистические сравнения проведены с помощью 3-х и 2-х факторного дисперсионного анализа (Приложение 2 Табл. 5). Множественные сравнения проведены с помощью теста Фишера LSD: * - $p < 0.05$, ** - $P < 0.01$. Размер выборок (n) указан в легенде графика А.

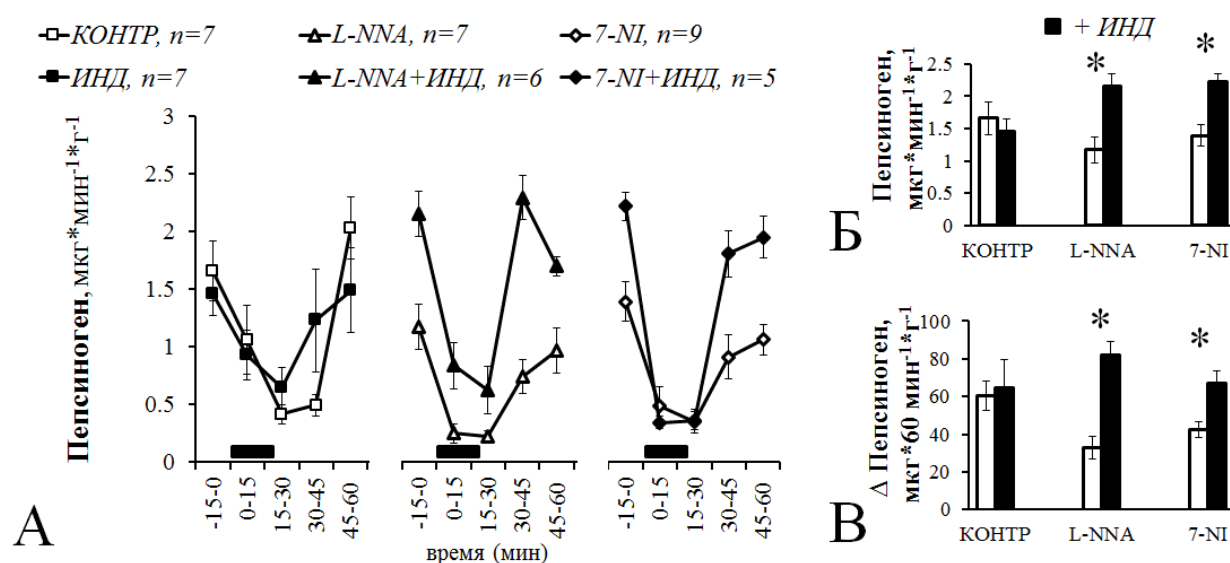


Рис. 14. Влияние блокаторов конститутивной синтазы оксида азота (L-NNA и 7-NI) на фоне подавления активности циклооксигеназ индометацином (ИНД) на желудочную секрецию пепсиногена при ирритации СОЖ у наркотизированных крыс.

А) Скорость секреции. Б) Базальная секреция. В) Суммарная продукция пепсиногена.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1M NaCl, pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирритантов отмечено полосой на графике А. L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг в.в.) инъецировали за 15 мин, ИНД (5 мг/кг, в.в.) – за 50 мин до ирритации. Контрольным группам (КОНТР) вводился DMSO (0.1 %, в.в.). Омепразол (10 мг/кг) инъецировали за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин (в.в.) до аппликации ирританта.

Абсолютные величины нормировались на сырой вес желудка. Статистические сравнения проведены с помощью 3-х и 2-х факторного дисперсионного анализа (Приложение 2 Табл. 6). Множественные сравнения проведены с помощью теста Фишера LSD: *- $p < 0.05$. Размер выборок (n) указан в легенде графика А

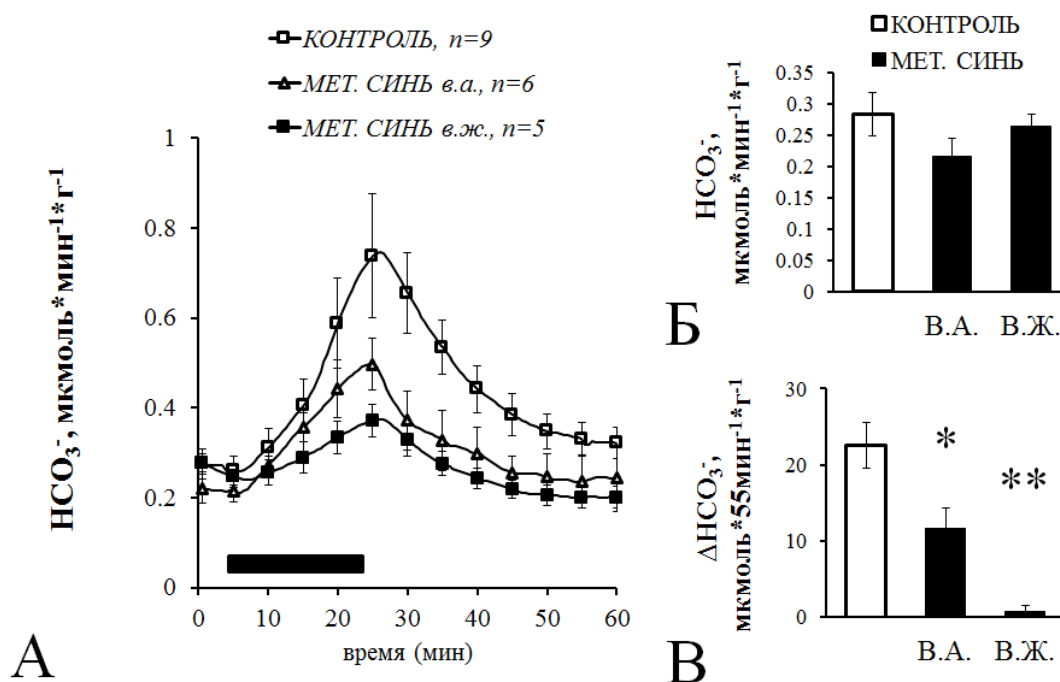


Рис. 15. Влияние метиленовой сини на желудочную секрецию бикарбонатов, вызванную слабой ирритацией СОЖ у наркотизированных крыс.

А) Скорость секреции. Б) Базальная секреция. В) Удельная продукция бикарбонатов.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1M NaCl, pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирритантов отмечено полосой на графике А. Метиленовая синь инъецировалась за 15 мин до ирритации либо в чревную артерию (0.2 мг/кг в.а.), либо внутривентрикулярно (2 мг/мл, 10 мин). Секреция кислоты была подавлена омепразолом (10 мг/кг), введенным за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин (в.в.) до аппликации ирританта.

Статистические сравнения с контрольной группой проведены с помощью теста Манна-Уитни; * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Размер выборок (n) указан в легенде графика А.

3.2.6 Влияние метиленовой сини и нитропрусида натрия на желудочную секрецию HCO_3^- , вызванную слабой ирритацией слизистой оболочки

Описанные в этом разделе эксперименты были проведены в условиях подавления омепразолом собственной секреции кислоты. Блокатор растворимой ГЦ-I метиленовую синь (МС) апплицировали в полость желудка (2 мг/мл) либо в течение 10 мин вводили в спланхнический кровоток (0.2 мг/кг в.а.). При обоих способах введения МС не влияла на базальную секрецию бикарбонатов (Рис. 15 А, Б). В то же время вызванная ирритацией СОЖ удельная продукция HCO_3^- после в.а. инъекции МС уменьшалась почти на 50%, по сравнению с контрольными значениями, а после в.ж. аппликации МС снижение удельной продукции было более заметным - до ~3% от контроля (Рис. 15В; тест Манна-Уитни, $p < 0.05 \sim 0.01$, $n = 5 \sim 9$).

Влияние нитропрусида натрия (SNP) на секрецию бикарбонатов и пепсиногена оценивалось также при подавленной собственной секреции кислоты. SNP вводили в чревную артерию (0.2 мг/кг в.а.) за 10 мин до аппликации ирританта либо вместе с полостным перфузионным раствором (2 мг/мл в.ж.) в течение 10 мин до аппликации. Оба воздействия проводили в присутствии (L-NNA, 10 мг/кг в.в.). В отдельных экспериментах аппликации SNP кроме инъекции L-NNA предшествовало введение ИНД (5 мг/кг, в.в.).

Абсолютные значения базальной, а также стимулированной ирритантами секреции бикарбонатов не изменялись после введения SNP на фоне L-NNA (Рис. 16 А-В). Аналогичные результаты были получены и при сравнении относительных величин секреции (Рис. 16 Г, Д). В то же время в присутствии L-NNA и ИНД близкое в.а. введение SNP приводило к подавлению стимулированной ирритантами секреции HCO_3^- (Рис. 17 А, В; $p < 0.01$, $n = 7$).

3.2.7 Влияние нитропруссид натрия на желудочную секрецию пепсиногена на фоне слабой ирритации слизистой оболочки

После инъекции SNP (оба способа введения) базальная секреция пепсиногена заметно увеличивалась по сравнению с секрецией на фоне только L-NNA (Рис. 18 А, Б). В то же время не отмечено достоверного действия SNP на суммарную продукцию пепсиногена в условиях ирритации (Рис. 18 В). Предварительное введение ИНД, как это описано выше, приводило к увеличению базальной секреции и усилению суммарной продукции пепсиногена в присутствии L-NNA. На фоне ИНД и L-NNA локальное введение SNP в спланхнический кровоток вызывало ослабление базальной секреции и суммарной продукции пепсиногена ($p < 0.05$ $n = 7 \sim 5$; тест Манна-Уитни; Рис. 19).

В целом представленные в разделе 3.2 данные сводятся к следующему.

- 1) Базальная желудочная секреция HCO_3^- у крыс под наркозом не зависит от вагусной иннервации, секреции эндогенной кислоты и активности ЦОГ. В то же время она связана с локальной активностью nNOS, в частности подавляется при селективной блокаде nNOS с помощью 7-NI. Совместная блокада обеих изоформ cNOS с помощью L-NNA не оказывает статистически достоверного действия на базальную секрецию HCO_3^- , как в случае локальной, так и при системной аппликации блокатора.
- 2) Слабая ирритация СОЖ подкисленным гипертоническим раствором стимулирует секрецию HCO_3^- независимо от вагусной иннервации и эндогенной секреции кислоты. Секреция, вызванная ирритацией, в значительной мере обеспечивается локальным синтезом NO, влияние которого полностью опосредуется ГЦ/цГМФ. Экзогенный NO (аппликация SNP) подавляет стимулированную ирритацией продукцию HCO_3^- .

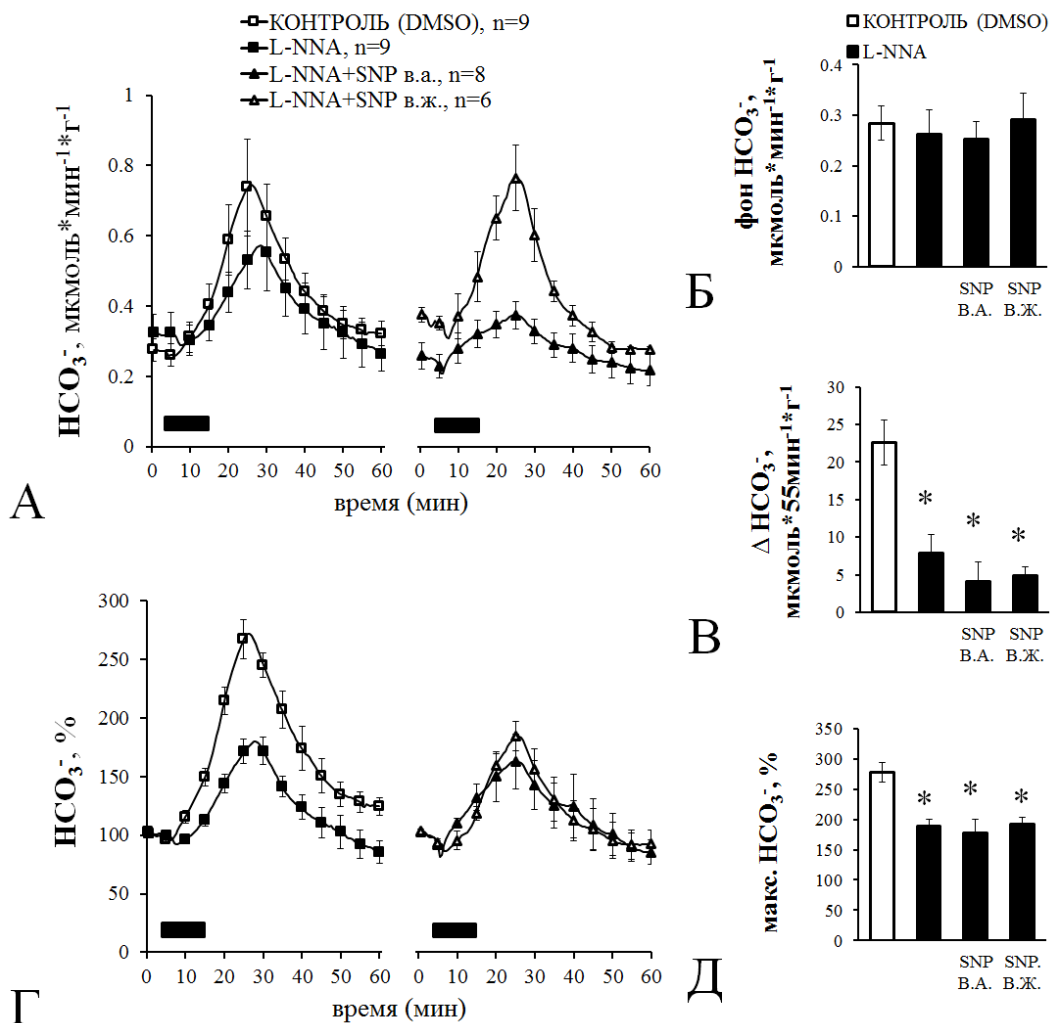


Рис. 16. Влияние донора оксида азота нитропрусида натрия (SNP) на желудочную секрецию бикарбонатов, вызванную слабой ирритацией СОЖ у наркотизированных крыс.

А) Скорость секреции. Б) Фоновая секреция. В) Удельная продукция бикарбонатов. Г) Скорость секреции, нормированная на фоновый уровень, принятый за 100%. Д) Относительная максимальная скорость секреции.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ производилась гипертоническим подкисленным раствором (1M NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирритантов отмечено полосой на графиках А и Г. SNP за 10 мин до ирритации инъецировали ретроградно в селезеночную артерию (0.2 мг/кг, в.а.), либо вводили в желудочный полостной перфузат в течение 10 мин до начала ирритации (2 мг/мл в.ж.); L-NNA (10 мг/кг, в.в.) вводили за 15 мин до ирритации. Секретция кислоты подавлена омепразолом (10 мг/кг), инъецированным за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации ирританта (в.в.).

Статистические сравнения с контрольной группой проведены с помощью теста Манна-Уитни, *- $p < 0.05$. Размер выборок (n) указан на графике А.

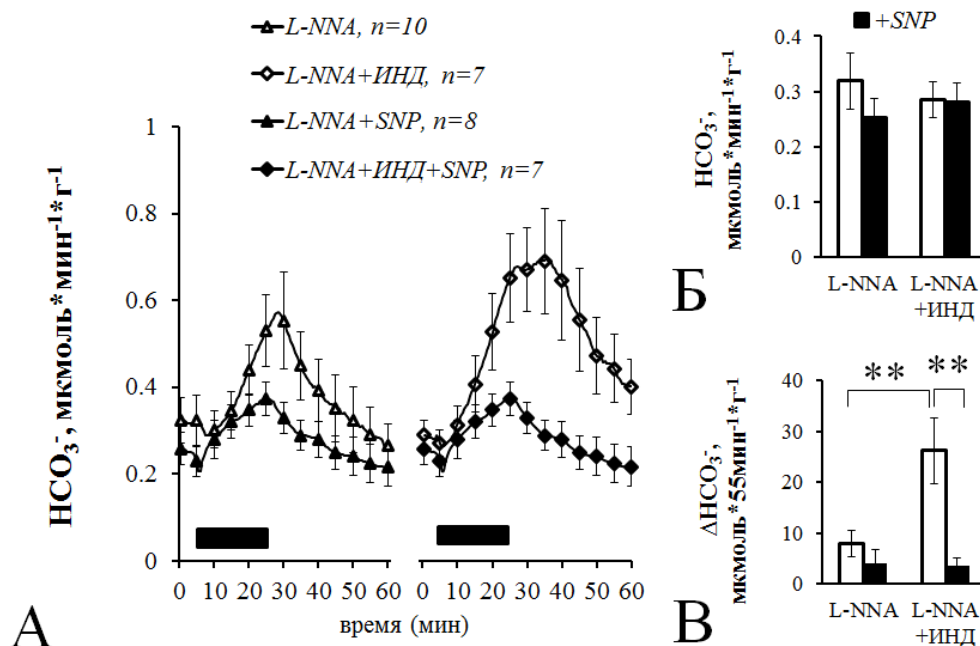


Рис. 17. Влияние донора оксида азота, нитропрусида натрия (SNP) на желудочную секрецию бикарбонатов, вызванную слабой ирритацией СОЖ у наркотизированных крыс на фоне подавленной активности ЦОГ.

А) Скорость секреции. Б) Фоновая секреция. В) Удельная продукция бикарбонатов.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ производилась гипертоническим подкисленным раствором (1M NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирритантов отмечено полосой на графике А. SNP (0.2 мг/кг, в.а.) инъецировали за 10 мин до ирритации, L-NNA (10 мг/кг) и ИИД (5 мг/кг) вводили в.в. за 15 и 50 мин до ирритации, соответственно. Секреция кислоты подавлена омепразолом (10 мг/кг), инъецированным за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации ирританта (в.в.). Все величины нормированы на сырой вес желудка.

Статистические сравнения с контрольной группой проведены с помощью теста Манна-Уитни, **- $p < 0.01$. Размер выборок (n) указан на графике А.

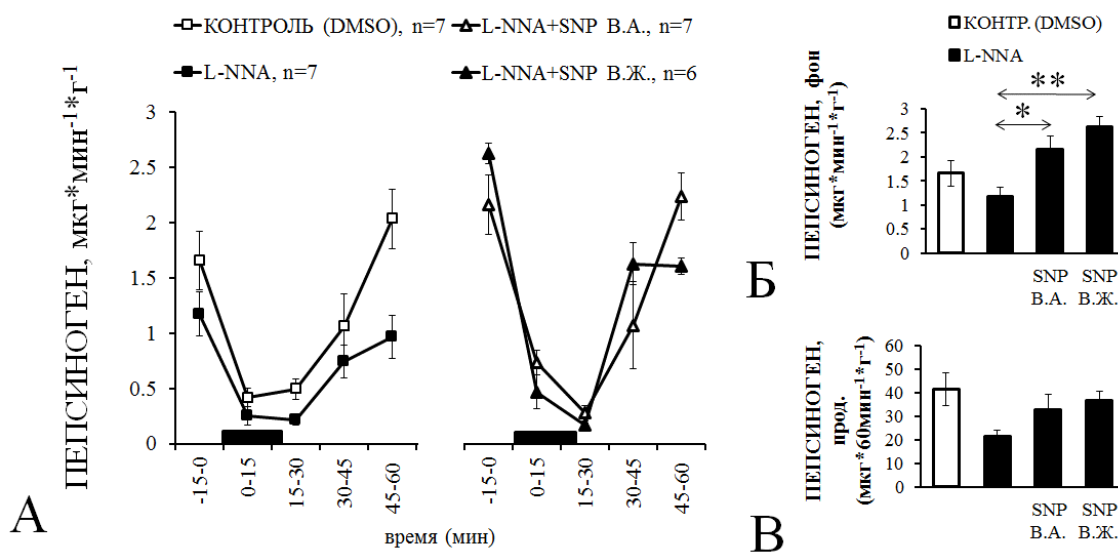


Рис. 18. Влияние донора оксида азота, нитропруссид натрия (SNP), на желудочную секрецию пепсиногена на фоне слабой ирритации слизистой оболочки.

А) Скорость секреции. Б) Фоновая секреция. В) Суммарная продукция бикарбонатов.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ производилась гипертоническим подкисленным раствором (1M NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирритантов отмечено полосой на графике А. SNP инъецировали ретроградно в селезеночную артерию (0.2 мг/кг, в.а.) за 10 мин до ирритации, либо вводили в желудочный полостной перфузат в течение 10 мин до начала ирритации (2 мг/мл в.ж.); L-NNA (10 мг/кг, в.в.) вводили за 15 мин до ирритации. Секретция кислоты подавлялась омепразолом (10 мг/кг), инъецированным за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации ирританта (в.в.). Все величины нормированы на сырой вес желудка.

Статистические сравнения с контрольной группой проведены с помощью теста Манна-Уитни, *- $p < 0.05$, ** - $P < 0.01$. Размер выборок (n) указан на графике А.

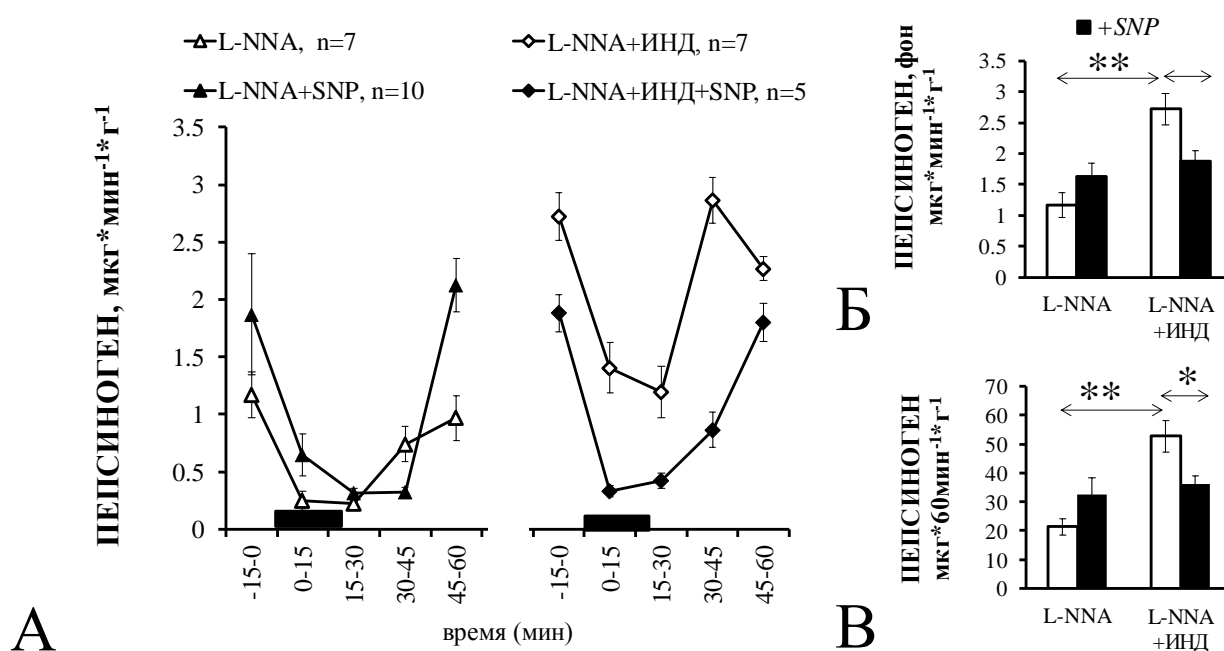


Рис. 19. Влияние донора оксида азота, нитропруссид натрия (SNP), на желудочную секрецию пепсиногена на фоне слабой ирритации слизистой оболочки на фоне подавленной активности ЦОГ.

А) Скорость секреции. Б) Фоновая секреция. В) Суммарная продукция бикарбонатов.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Ирритация СОЖ производилась гипертоническим подкисленным раствором (1M NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирритантов отмечено полосой на графике А. SNP (0.2 мг/кг, в.а.) инъецировали за 10 мин до ирритации, L-NNA (10 мг/кг) и ИНД (5 мг/кг) вводили в.в. за 15 и 50 мин до ирритации соответственно. Секреция кислоты подавлялась омепразолом (10 мг/кг), инъецированным за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации ирританта (в.в.). Все величины нормированы на сырой вес желудка.

Статистические сравнения с контрольной группой проведены с помощью теста Манна-Уитни, *- $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Размер выборок (n) указан на графике А.

- 3) Блокада изоформ cNOS по-разному влияет на стимулированную секрецию HCO_3^- . Впервые установлено, что периферическая nNOS опосредует усиление секреции HCO_3^- в ответ на ирритацию. Одновременная блокада обеих изоформ cNOS с помощью L-NNA не приводит к статистически достоверному эффекту. Последнее наблюдение хорошо согласуется с ранее опубликованными данными о влиянии L-NAME (Takeuchi et al., 1993, 1994a, 1996; Lamarque et al., 1997).
- 4) Существенным результатом этой серии экспериментов стала демонстрация зависимости эффекта L-NNA от эндогенной секреции кислоты. После блокады H^+ , K^+ -АТФазы омепразолом L-NNA угнетает продукцию HCO_3^- , чего не происходит на фоне нормальной базальной секреции H^+ .
- 5) Вызванная ирритацией продукция HCO_3^- в желудке сокращается при неселективной блокаде ЦОГ с помощью ИНД. В гипоацидном состоянии на фоне ИНД неселективный cNOS блокатор L-NNA потенцирует вызванную ирритацией продукцию HCO_3^- . С другой стороны, 7-NI, селективный *in vivo* блокатор nNOS, на фоне ИНД не влияет на продукцию HCO_3^- .
- 6) Системное, но не локальное, введение блокаторов L-NNA и 7-NI подавляет базальную секрецию пепсиногена в нормацидном состоянии при сохраненной фоновой секреции кислоты. Аппликация донора NO, напротив, вызывает усиление базальной секреции пепсиногена. Ирритация СОЖ сопровождается резким ослаблением секреции пепсиногена, которая после прекращения действия ирританта восстанавливается до исходного уровня в короткий промежуток времени. Системная аппликация L-NNA и 7-NI угнетает продукцию пепсиногена, как в нормацидном, так и гипоацидном состоянии. ИНД не влияет на базальную и вызванную ирритацией секрецию пепсиногена, но ослабляет действие 7-NI и L-NNA.

3.3 Зависимость секреции бикарбонатов и пепсиногена от концентрации бикарбонатов в желудочном кровотоке

В соответствии с поставленными задачами была изучена роль изоформ cNOS в регуляции транспорта бикарбонатов из подслизистого слоя на поверхность эпителия. Для этого оценивалось влияние искусственного алкалоза (NaHCO_3 в.в.) на желудочную продукцию бикарбонатов и пепсиногена в отсутствии воздействий на СОЖ и в условиях ирритации.

Цитоплазматическая карбоангидраза эпителиальных клеток желудка не способна синтезировать количество бикарбонатов достаточное для насыщения преэпителиальной слизи, поэтому основной объем HCO_3^- , выделяемый эпителиоцитами на поверхность СОЖ, транспортируется из зоны собственной пластинки, куда поступает с кровотоком (Allen et al., 1993; Takeuchi et al., 1982). Резерв HCO_3^- в сосудах подслизистого слоя непостоянен, он увеличивается при временном алкалозе, так называемом «щелочном приливе», сопровождающем секрецию кислоты (Phillipson, 2004). Следовательно, изоформы cNOS в силу их локализации могут по-разному влиять на доступность резерва HCO_3^- для трансэпителиального переноса. Эта гипотеза была подтверждена на модели щелочного прилива в условиях слабой ирритации СОЖ. Дополнительно анализировалось взаимодействие pNOS и eNOS с циклооксигеназами (ЦОГ) и оценивалась активность базолатеральных и апикальных транспортеров поверхностных эпителиальных клеток, а также роль карбоангидраз. Методической задачей, решенной в этом разделе, было адекватное моделирование щелочного прилива у наркотизированных крыс, что до сих пор актуально, т.к. в доступной литературе расчеты необходимой дозы NaHCO_3 для в.в. инъекции не приводятся.

3.3.1 Базальная секреция кислоты, бикарбонатов и пепсиногена на фоне внутривенной инфузии NaHCO_3

Расчёт дозы NaHCO_3 , имитирующей колебания концентрации бикарбонатов в подслизистом слое, сопровождающие пищеварение, был произведен на основе данных о базальной ($<5 \text{ мкмоль} \times \text{г}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$) и стимулированной электрическим раздражением вагуса ($\sim 40 \text{ мкмоль} \times \text{г}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$) продукции кислоты у наркотизированных крыс (Золотарев и др., 2002). Очевидно, что при моделировании щелочного прилива в.в. доза NaHCO_3 должна создавать в сосудах желудка концентрацию бикарбонатов сопоставимую с продукцией H^+ , поскольку обкладочные клетки выделяют в подслизистый слой количество молей HCO_3^- , эквивалентное количеству протонов, секретируемых в полость желудка (Teorell, 1951). В расчётах было использовано эмпирическое отношение для вычисления объема распределения бикарбонатов в организме человека $V = (0.4 + 2.6/[\text{HCO}_3^-]) \times \text{BW}$, где $[\text{HCO}_3^-]$ – концентрация бикарбонатов в плазме крови, взятая в мЭкв, а BW- масса тела в кг (Fernandez et al., 1989). Также было учтено, что кровоток в желудке крысы под наркозом в 50 раз меньше, чем в аорте (Lippe, Holzer, 1992; Brun-Pascaud et al., 1982). Таким образом, для крысы со средним весом желудка 2 г доза, которая увеличит концентрацию HCO_3^- в подслизистом слое в указанном выше диапазоне, будет в пределах $5\text{--}45 \text{ ммоль} \times \text{кг}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$. В результате использовалась инфузия, создающая удвоенный базальный уровень NaHCO_3 , а именно $10 \text{ ммоль} \times \text{кг}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$.

Инфузия раствора бикарбонатов в бедренную вену продолжалась 20 мин. Общий объем вводимой жидкости равнялся 2 мл. Животным контрольных групп в течение 20 мин в.в. инфузировали 2 мл физиологического раствора. Часть животных предварительно в течение суток получала ОМЕ по принятой здесь схеме. Регистрацию параметров секреции начинали за 5 мин до инфузии NaHCO_3 и затем продолжали в течение 55 мин (Рис. 20).

Инфузия NaHCO_3 не произвела существенного действия на базальную секрецию кислоты ни в нормацидном состоянии, ни после того, как в присутствии ОМЕ продукция кислоты сократилась вдвое (Рис. 20 А, Б). Искусственный алкалоз не сказался на базальной секреции бикарбонатов ни в контроле, ни на фоне ОМЕ (Рис. 20 В, Г). На секрецию пепсиногена в.в. введение NaHCO_3 также не влияло, независимо от уровня секреции кислоты в желудке (Рис. 20 Д, Е).

3.3.2 Влияние внутривенной инфузии NaHCO_3 на секрецию бикарбонатов и пепсиногена при ирритации СОЖ

Внутривенная инфузия NaHCO_3 при сохраненной базальной секреции кислоты в желудке существенно не влияла на продукцию бикарбонатов, вызванную ирритацией СОЖ. Когда же собственная продукция кислоты подавлялась ОМЕ, инфузия NaHCO_3 отчетливо потенцировала продукцию HCO_3^- . На фоне подавленной собственной секреции кислоты после в.в. нагрузки NaHCO_3 удельная продукция HCO_3^- увеличивалась более чем в 2 раза ($p < 0.01$; Рис. 21В; Приложение 2, Табл. 7В). Статистические сравнения (абсолютные значения) подтвердили зависимость влияния алкалоза от ОМЕ, а также зависимость эффекта ирритации от инфузии NaHCO_3 и ОМЕ (Рис. 21А; Приложение 2, Табл. 7А). Сравнение относительных скоростей секреции дало аналогичные результаты, и, кроме того, подтвердило статистически значимый эффект ОМЕ (Рис. 21Г; Приложение 2, Табл. 7Г). В присутствии ОМЕ отмечено увеличение относительной (в % от базального уровня) пиковой секреции HCO_3^- более чем на 1/4 ($p < 0.05$; Рис. 21Д; Приложение 2, Табл. 7Д).

Оценка секреции пепсиногена в зависимости от в.в. инфузии NaHCO_3 также производилась и в нормацидном состоянии, и после кислотосупрессии. Статистические сравнения подтвердили, что алкалоз не влиял на секрецию на фоне ирритации, а также на суммарную продукцию пепсиногена (Рис. 22. Приложение 2, Табл. 8).

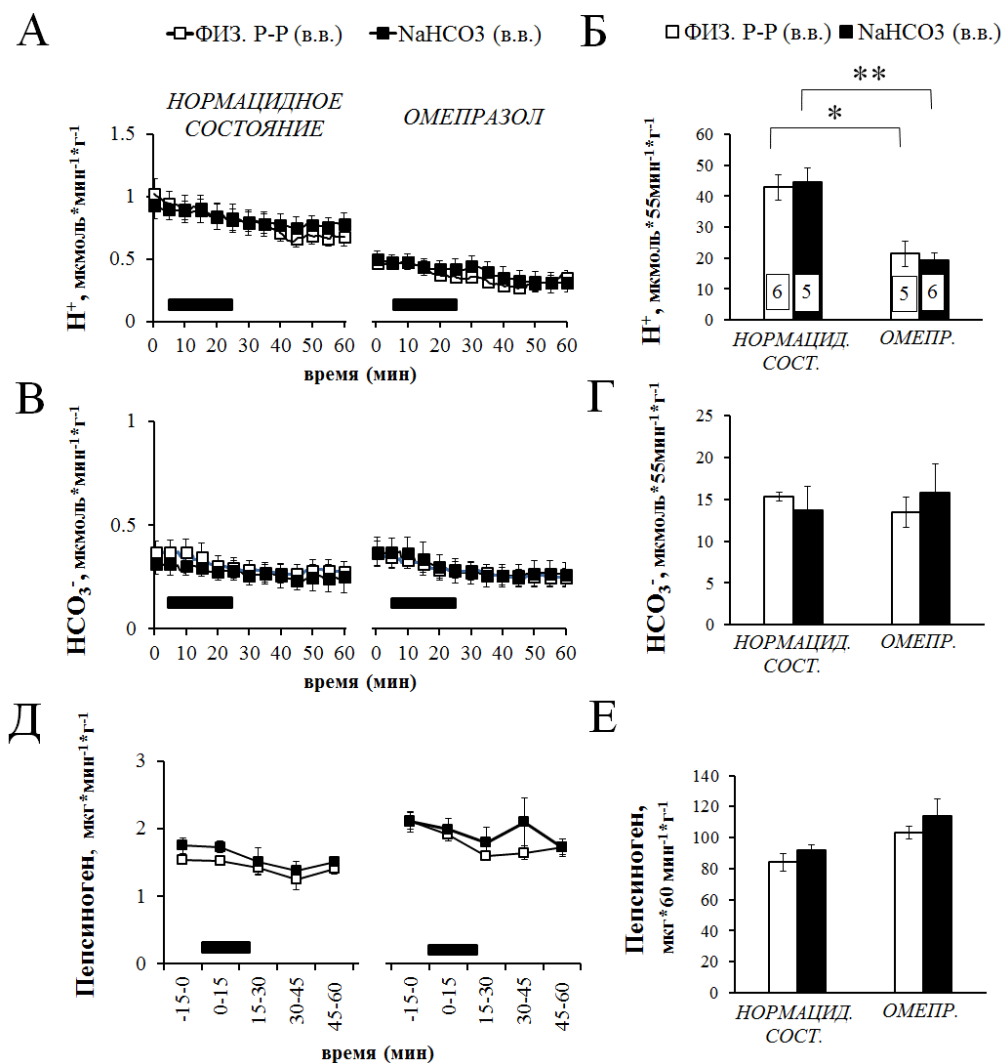


Рис. 20. Влияние внутривенной инфузии NaHCO₃ (10 ммоль \times кг⁻¹ \times ч⁻¹, 20 мин) на базальную секрецию и суммарную продукцию кислоты (А,Б), бикарбонатов (В,Г) и пепсиногена (Д,Е) в желудке крысы под наркозом при нормальной секреции кислоты и в присутствии омепразола (ОМЕПР). На графиках слева – скорость секреции, справа – суммарная продукция в течение 55 мин после начала инфузии NaHCO₃.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Период введения NaHCO₃ отмечен полосой над осью абсцисс. Омепразол (10 мг/кг) инъектировали дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до инфузии бикарбонатов (в.в.). Контрольным животным вместо NaHCO₃ вводили равный объем физиологического раствора. Статистические сравнения производили с помощью теста Манна-Уитни: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Величины выборок указаны на столбцах гистограммы Б

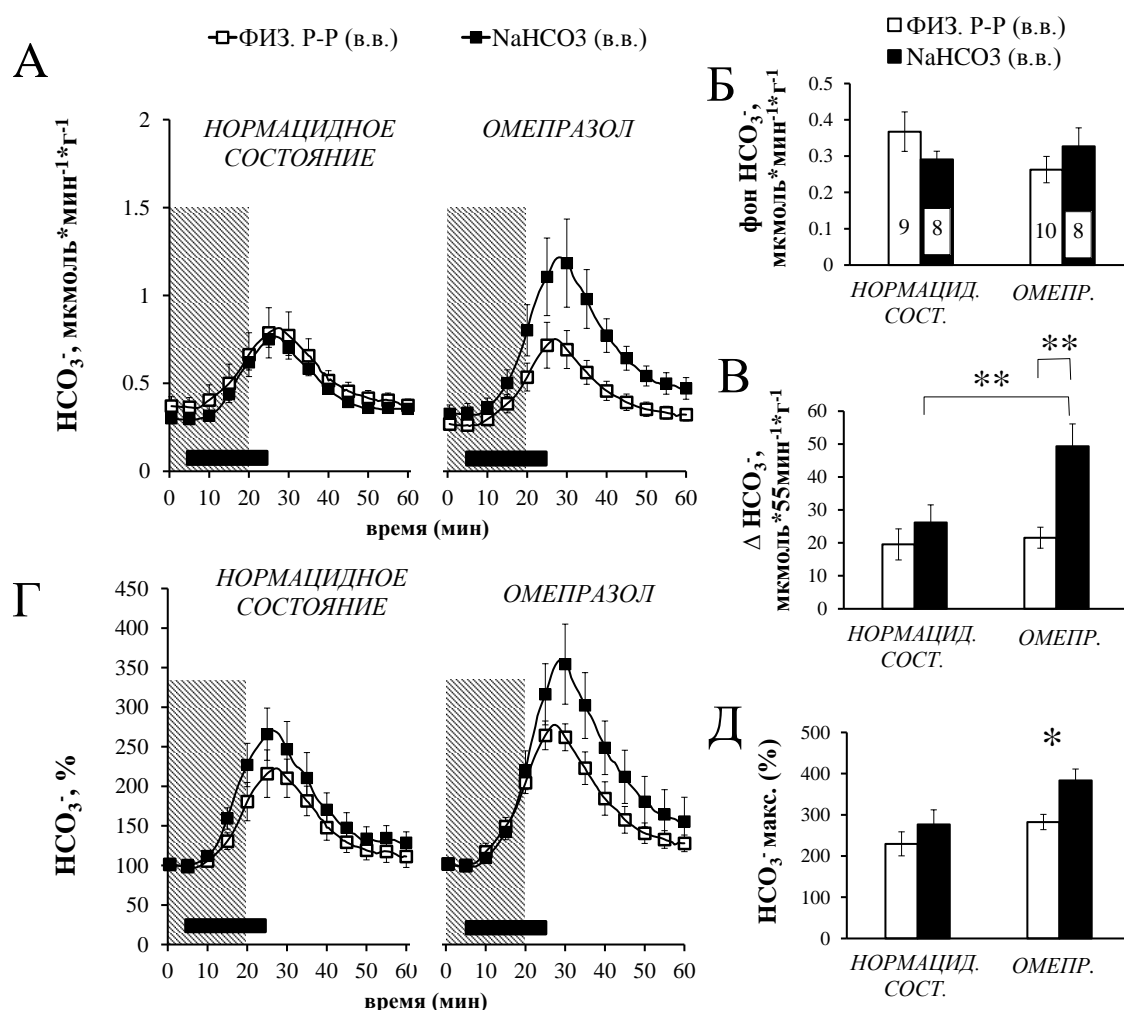


Рис. 21. Влияние внутривенной инфузии NaHCO₃ (10 ммоль×кг⁻¹×ч⁻¹, 20 мин) на секрецию бикарбонатов в желудке наркотизированных крыс, вызванную ирритацией СОЖ. Сравнение реакций при сохраненной базальной секреции кислоты и после инъекции омепразола (ОМЕПР) в условиях двухсторонней субдиафрагмальной ваготомии.

А) Скорость секреции. Б) Базальная секреция, усредненная в течение 5 мин до аппликации ирританта. В) Удельная продукция бикарбонатов. Г) Скорость секреции, нормированная на базальный уровень, принятый за 100%. Д) Максимальная относительная скорость секреции на фоне ирритации.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Период в.в. инфузии NaHCO₃ либо равного объема (2 мл) физиологического раствора отмечен на графиках А и Г заштрихованным прямоугольником. Ирритация СОЖ с помощью гипертонического подкисленного раствора (1 M NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирритантов отмечено полосой на графиках А и Г. ОМЕПР (10 мг/кг) инъектировали дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин (в.в.) до аппликации ирританта. Статистические сравнения проведены с помощью 2-х и 3-х-факторного дисперсионного анализа (См. Приложение 2, Табл. 7). Для множественных парных сравнений использован тест Фишера LSD: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Величина выборок показана на диаграмме Б.

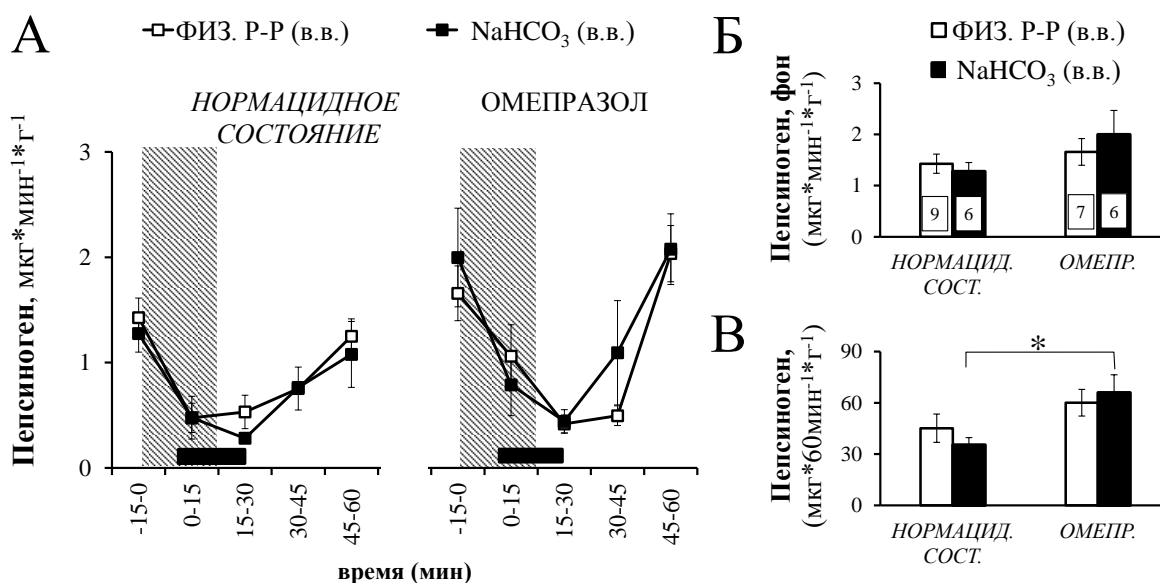


Рис. 22. Влияние внутривенной инфузии NaHCO_3 ($10 \text{ ммоль} \times \text{кг}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$, 20 мин) на секрецию пепсиногена в желудке наркотизированных крыс на фоне ирритации СОЖ в условиях двухсторонней субдиафрагмальной ваготомии. Сравнение реакций при нормальной секреции кислоты и после инъекции омепразола (ОМЕПР).

А) Скорость секреции. Б) Базальная секреция в течение 15 мин до аппликации ирританта. В) Суммарная продукция пепсиногена в течение 60 мин после начала ирритации.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Период в.в. инфузии NaHCO_3 либо равного объема (2 мл) физиологического раствора отмечен на графике А заштрихованным прямоугольником. Ирритация СОЖ путем перфузии гипертоническим подкисленным раствором (1 NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирритантов отмечено полосой на графике А. ОМЕПР (10 мг/кг) инъектировался дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации ирританта (в.в.). Статистические сравнения проведены с помощью 2-х и 3-х-факторного дисперсионного анализа (См. Приложение 2, Табл. 8). Для множественных парных сравнений использован тест Фишера LSD: * - $p < 0.05$. Величина выборок указана на столбцах диаграммы Б.

3.3.3 Действие L-NNA, 7-NI на желудочную секрецию бикарбонатов и пепсиногена на фоне внутривенной инфузии NaHCO_3

Все эксперименты этой серии проведены после двусторонней субдиафрагмальной ваготомии. Поскольку эксперименты проводились в присутствии ОМЕ, в этом разделе не рассматривается влияние блокаторов на секрецию кислоты.

Если концентрация бикарбонатов в желудочном кровотоке оставалась на базальном уровне, оба блокатора cNOS (7-NI и L-NNA, 10 мг/кг в.в.) вызывали значительное и примерно равное ослабление секреции HCO_3^- , стимулированной ирритацией СОЖ. При увеличении концентрации бикарбонатов в кровотоке в результате 20-минутной инфузии NaHCO_3 действие блокаторов NOS на скорость секреции и удельную продукцию HCO_3^- изменялось (Рис. 23 А, В. Приложение 2, Табл. 9 А,В). На фоне в.в. инфузии NaHCO_3 ингибиторное влияние L-NNA на продукцию HCO_3^- сменялось слабым потенцирующим действием, хотя статистически недостоверным (Рис. 23 В; $p < 0.05$, $n = 10 \sim 7$). В то же время селективный *in vivo* блокатор nNOS, 7-NI, на фоне в.в. инфузии NaHCO_3 сохранял угнетающее действие (Рис. 23 В; $p < 0.01$, $n = 10 \sim 6$). Эффекты L-NNA и 7-NI подтвердились при сопоставлении относительных пиковых значений секреции (Рис. 23 Д). Вместе с тем блокаторы cNOS на фоне инфузии NaHCO_3 не оказали существенного влияния на базальную секрецию HCO_3^- (Рис. 23 Б, Приложение 2, Табл. 9Б).

Суммарная секреция пепсиногена при ирритации СОЖ сокращалась в присутствии блокаторов cNOS (L-NNA и 7-NI), но инфузия NaHCO_3 не влияла на эту реакцию (Рис. 24; Приложение 2, Табл. 10).

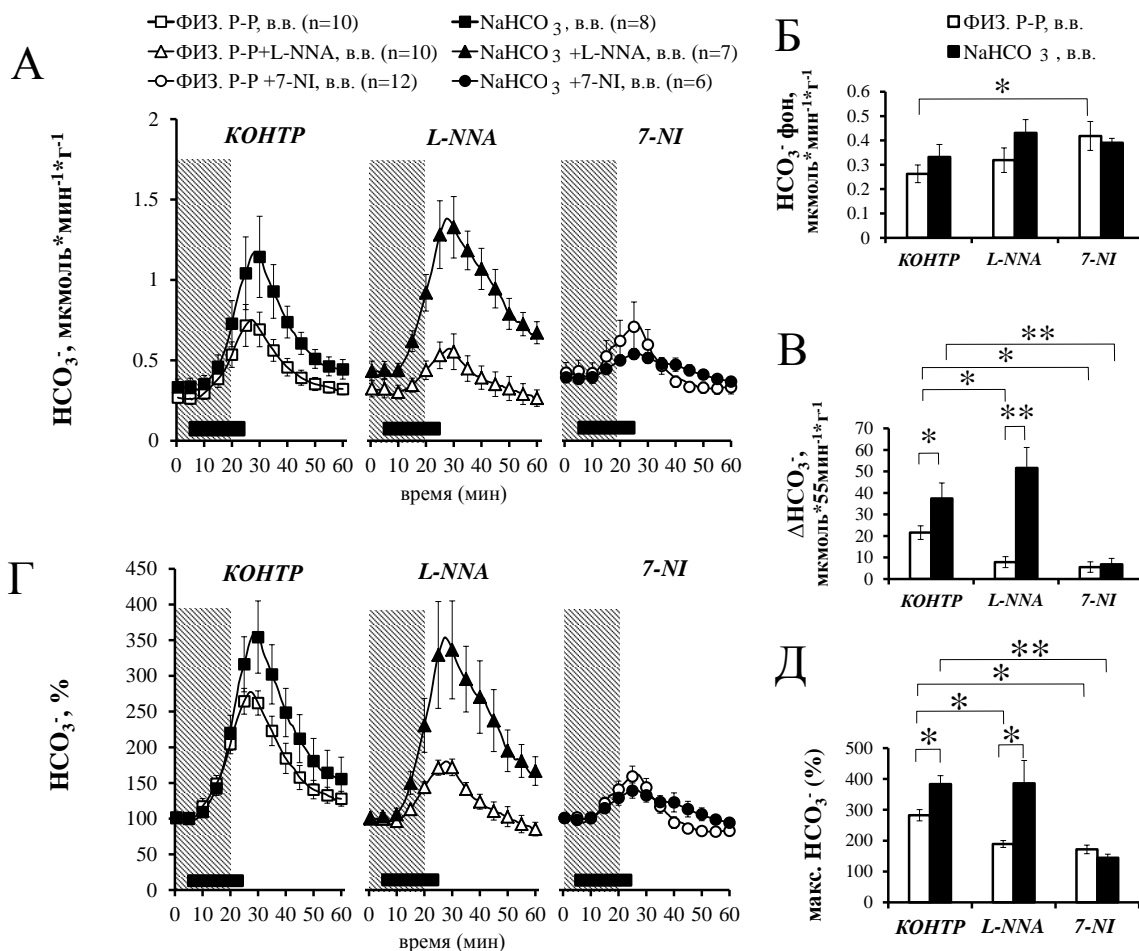


Рис. 23. Потенциация желудочной секреции бикарбонатов, вызванной ирритацией СОЖ, при внутривенной инфузии NaHCO₃ (10 ммоль×кг⁻¹×ч⁻¹, 20 мин). Реакция на фоне блокады изоформ cNOS в условиях субдиафрагмальной двусторонней ваготомии и угнетения секреции кислоты омепразолом.

А) Скорость секреции. Б) Скорость базальной секреции, усредненная в течение 5 мин до аппликации ирританта. В) Удельная продукция бикарбонатов. Г) Скорость секреции, нормированная на базальный уровень, принятый за 100%. Д) Пиковая относительная скорость секреции.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Период в.в. инфузии NaHCO₃ либо равного объема (2 мл) физиологического раствора отмечен на графиках А и Г заштрихованным прямоугольником. Ирритация СОЖ с помощью подкисленного гипертонического раствора (1 NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирритантов отмечено полосой на графиках А и Г. Блокаторы cNOS, L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг в.в.), инъецировали за 15 мин до ирритации. Контрольным группам вводился DMSO (0.1%, 0.3 мл, в.в.). Омепразол (10 мг/кг) инъецировался дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации ирританта (в.в.).

Статистические сравнения проведены с помощью 2-х и 3-х-факторного дисперсионного анализа (См. Приложение 2, Табл. 9). Для множественных сравнений применен тест Фишера LSD: * - p<0.05, ** - p<0.01. Величина выборок указана на графике А.

3.3.4 Влияние экзогенного NO на желудочную секрецию HCO_3^- на фоне в.в. инфузии NaHCO_3

Эксперименты этой серии проведены при подавленной с помощью ОМЕ секреции кислоты. Донор оксида азота, SNP, вводили внутривенно (2 мг/мл) в течение 10 мин, начиная за 5 мин до инфузии ирританта либо локально в чревную артерию (0.2 мг/кг в.в.) за 10 мин до ирритации. Аппликации SNP предшествовало введение блокатора cNOS (L-NNA, 10 мг/кг, в.в.) за 15 мин до ирритации. Внутривенную инфузию NaHCO_3 проводили, как и в предыдущих экспериментах, в течение 20 мин, начиная ее за 5 мин до ирритации.

На рисунке 25 показано, что локальная инъекция SNP в спланхнический кровоток вызывала значительное уменьшение абсолютной и относительной скорости секреции, а также и удельной продукции HCO_3^- . Полостная аппликация раствора SNP в желудок, тем не менее, не произвела существенного действия на продукцию HCO_3^- , вызванную ирритацией СОЖ.

3.3.5 Взаимное влияние блокады cNOS и ЦОГ при регуляции желудочной секреции бикарбонатов на фоне в.в. инфузии NaHCO_3

Эксперименты этой серии проведены в условиях двусторонней субдиафрагмальной ваготомии на фоне блокады секреции кислоты с помощью ОМЕ. Неселективный блокатор ЦОГ, индометацин (5 мг/кг), вводили внутривенно за 50 мин до аппликации ирритантов. Блокаторы cNOS, L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг, в.в.), инъектировали за 15 мин до начала ирритации. Во всех экспериментах этой серии производили 20-ти минутную внутривенную инфузию NaHCO_3 , начинавшуюся за 5 мин до аппликации ирритантов.

Рисунок 26 демонстрирует влияние L-NNA и 7-NI на секрецию HCO_3^- при интактной ЦОГ (контроль) и после неселективного ингибирования ЦОГ с помощью ИНД. Трехфакторный дисперсионный анализ в целом подтвердил,

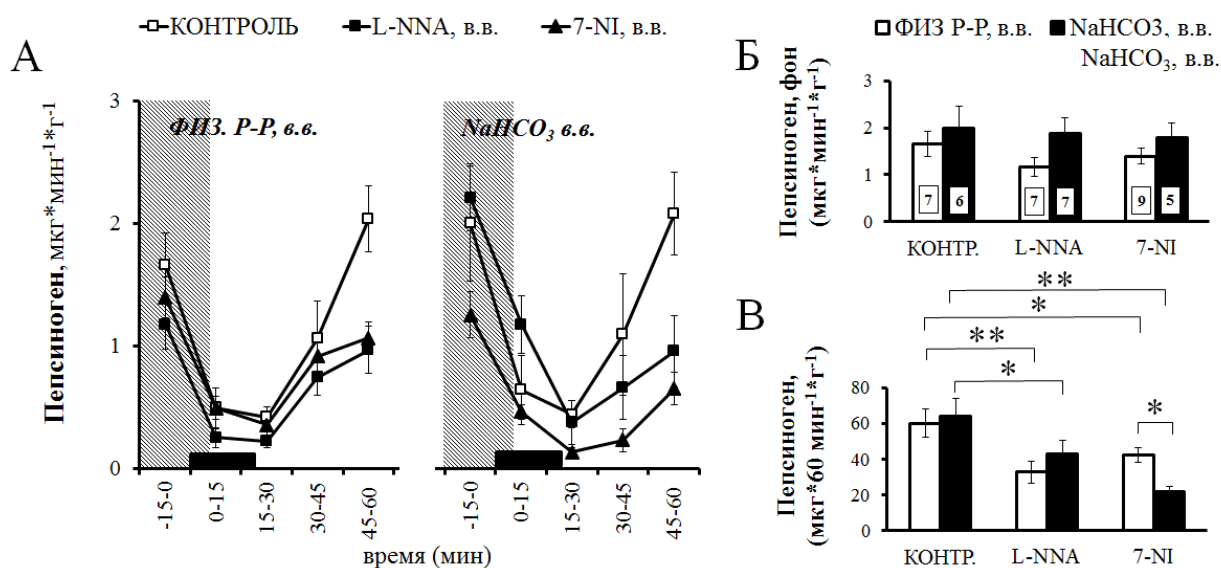


Рис. 24. Секретция пепсиногена на фоне внутривенной инфузии NaHCO₃ (10 ммоль×кг⁻¹×ч⁻¹, 20 мин) в зависимости от блокады cNOS. Реакции при раздражении СОЖ в условиях субдиафрагмальной двусторонней ваготомии и угнетения секреции кислоты омепразолом.

А) Скорость секреции. Б) Скорость базальной секреции, усредненная в течение 5 мин до аппликации раздражителя. В) Суммарная продукция пепсиногена, рассчитанная с начала раздражения.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Период в.в. инфузии NaHCO₃ либо равного объема (2 мл) физиологического раствора отмечен на графике А заштрихованным прямоугольником. Раздражение СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение раздражителей отмечено полосой на графике А. Блокаторы cNOS, L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг в.в.), инъектировали за 15 мин до раздражения. Контрольным группам вводился DMSO (0.1%, 0.3 мл, в.в.). Омепразол (10 мг/кг) инъектировался дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации раздражителя (в.в.).

Статистические сравнения проведены с помощью 2-х и 3-х-факторного дисперсионного анализа (Приложение 2, Табл. 10). Последующие множественные сравнения проведены с помощью теста Фишера LSD: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Величина выборок указана на гистограмме Б.

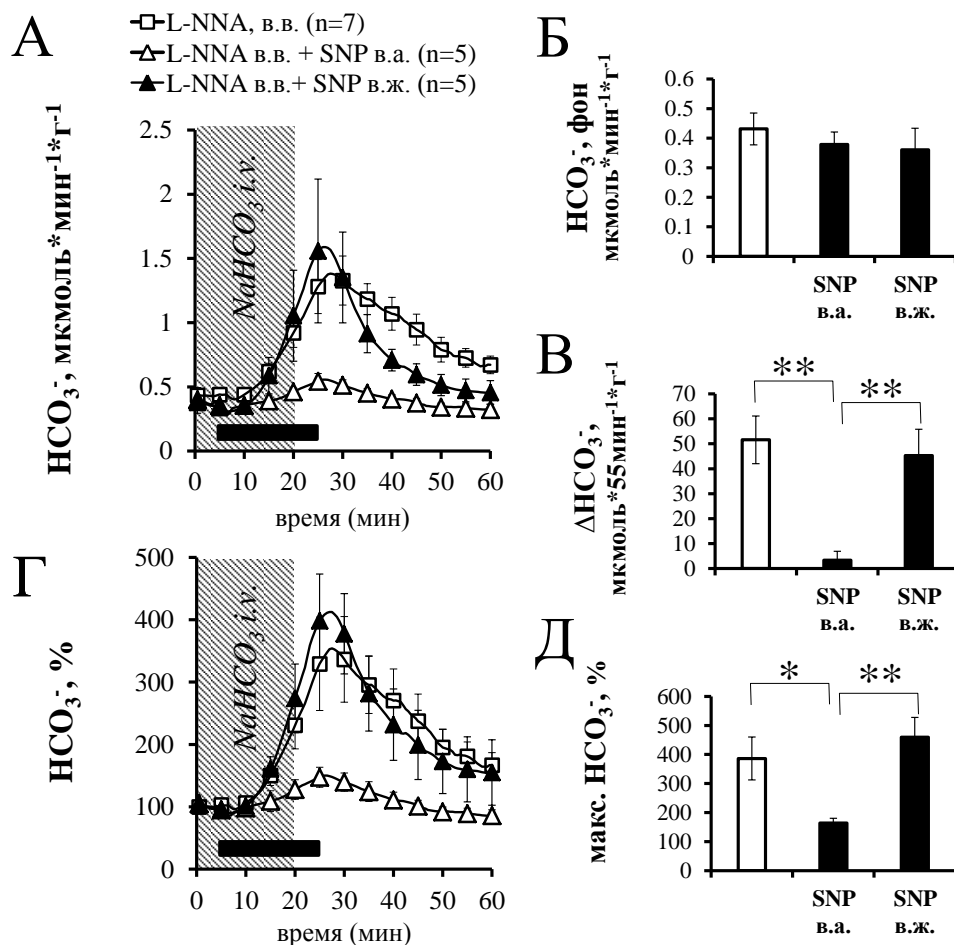


Рис. 25. Секретция бикарбонатов, вызванная раздражением СОЖ, на фоне внутривенной инфузии NaHCO_3 ($10 \text{ ммоль} \times \text{кг}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$, 20 мин) в зависимости от в.в. или в.ж. аппликации нитропрусида натрия (SNP) Реакции в условиях субдиафрагмальной двусторонней ваготомии и угнетения секреции кислоты омепразолом.

А) Скорость секреции. Б) Скорость базальной секреции, усредненная в течение 5 мин до аппликации раздражителя. В) Удельная продукция бикарбонатов. Г) Скорость секреции, нормированная на фоновый уровень, принятый за 100%. Д) Пиковая относительная скорость секреции.

Непрерывная полостная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl , pH 4.0). Период в.в. инфузии NaHCO_3 отмечен на графиках А и Г заштрихованным прямоугольником. Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Внутрижелудочное введение раздражителей отмечено полосой на графиках А и Г. L-NNA (10 мг/кг в.в.) инъецировали за 15 мин до ирритации. SNP вводили либо внутрижелудочно (2 мг/мл , 10 мин), начиная введение за 5 мин до введения раздражителя, либо локально в чревную артерию (0.2 мг/кг в.а.) за 10 мин до ирритации. Омепразол (10 мг/кг) инъецировался дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации раздражителя (в.в.).

Статистические сравнения проведены с помощью теста Манна-Уитни: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Величина выборок указана на графике А.

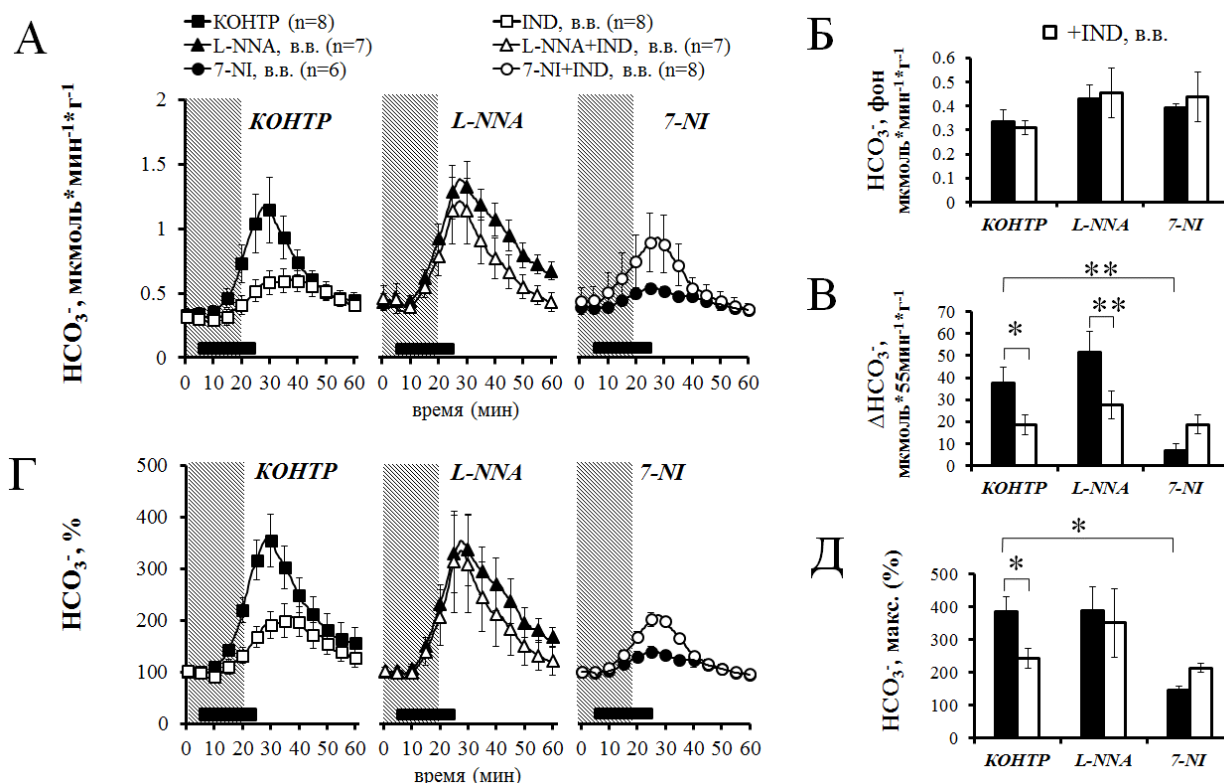


Рис. 26. Секретция бикарбонатов, вызванная раздражением СОЖ на фоне внутривенной инфузии NaHCO_3 ($10 \text{ ммоль} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$, 20 мин), в зависимости от блокады cNOS и ЦОГ. Реакции в условиях субдиафрагмальной двусторонней ваготомии и угнетения секреции кислоты омепразолом.

А) Скорость секреции. Б) Скорость базальной секреции, усредненная в течение 5 мин до аппликации раздражителя. В) Удельная продукция бикарбонатов. Г) Скорость секреции, нормированная на фоновый уровень, принятый за 100%. Д) Пиковая относительная скорость секреции.

Непрерывная полостная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl , pH 4.0). Период в.в. инфузии NaHCO_3 отмечен на графиках А и Г заштрихованными прямоугольниками. Раздражение СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение раздражителей отмечено полосой на графиках А и Г. Блокаторы cNOS, L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг в.в.), инъецировали за 15 мин до раздражения. Блокатор ЦОГ индометацин (IND, 5 мг/кг , в.в.) вводили за 50 мин до аппликации раздражителя. Контрольным группам вводился DMSO (0.1% , 0.3 мл , в.в.). Омепразол (10 мг/кг) инъецировался дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации раздражителя (в.в.).

Статистические сравнения проведены с помощью 2-х и 3-х-факторного дисперсионного анализа (См. Приложение 2, Табл. 11). Последующие множественные сравнения проведены с помощью теста Фишера LSD: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Величина выборок указана на графике А.

что при ирритации СОЖ угнетающее действие ИНД по отношению к абсолютной и относительной секреции HCO_3^- в целом не зависело от блокады cNOS (Приложение 2, Табл. 11 А, Г). Парные сравнения показали, что на фоне на фоне ИНД и повышенной концентрации HCO_3^- в органном кровотоке блокада cNOS с помощью L-NNA не влияет на удельную желудочную продукцию HCO_3^- , но прекращается действие 7-NI (Рис. 26 В).

3.3.6 Влияние DIDS, хлорида аммония и ацетазоламида на секрецию бикарбонатов, вызванную ирритацией СОЖ на фоне в.в. инфузии NaHCO_3

Перенос бикарбонатов из подслизистого слоя в цитоплазму эпителиальных клеток через базолатеральную мембрану и последующее их выведение в полость желудка через апикальную мембрану осуществляется несколькими анионными транспортерами, которые различаются структурно и функционально. В качестве основного апикального переносчика HCO_3^- описан белок AE4 (SLC4A9), неэлектрогенный $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменник. Кроме него в апикальной мембране присутствует электрогенный $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ обменный белок SLC26A9 (Demitrack et al., 2010; Xu et al., 2003). Главным элементом электрогенного импорта HCO_3^- из тканевой жидкости в поверхностные эпителиальные клетки определены базолатеральные $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ котранспортеры NBCe1 и NBCe2 (Seidler et al., 2000).

Функциональная особенность большинства транспортеров HCO_3^- связана их чувствительностью к производным дисульфонового стильбена (DIDS), которые блокируют анионный обмен, осуществляемый NBCe1, NBCe2 и SLC26A9. В то же время белок AE4 практически нечувствителен к DIDS. Перенос анионов белком SLC26A9, кроме того, тормозится ионами аммония (Romero et al., 2013; Xu et al., 2003). Скорость трансмембранного переноса HCO_3^- , в котором участвуют транспортеры AE4 и SLC26A9 зависит от концентрации субстратов (Peña-Münzenmayer et al., 2016). Возможно также

влияние на транспортные белки со стороны тесно взаимодействующих с ними карбоангидраз (Bonar, Casey, 2008).

Описанные в этом разделе эксперименты проведены на фоне подавленной с помощью ОМЕ эндогенной продукции кислоты. Влияние блокады анионных транспортеров с помощью DIDS или NH_4Cl на вызванную ирритацией секрецию HCO_3^- оценивалось как в условиях физиологической нормы под наркозом, так и при повышенной концентрации субстрата (HCO_3^-) в подслизистом слое.

Под действием DIDS происходило значительное уменьшение (до 20% от контрольного уровня) секреции HCO_3^- , вызванной ирритацией СОЖ. Такое ослабление реакции, как показало сравнение величин удельной продукции HCO_3^- , не зависело от концентрации NaHCO_3 в кровотоке (Тест Манна-Уитни, $p < 0.01$, $n = 5 \sim 10$). Внутрижелудочная аппликация NH_4Cl (4 mM) в течение 10 мин, начинавшаяся за 15 мин до ирритации, не влияла на продукцию HCO_3^- (Рис. 27 А, Б). Неселективный блокатор карбоангидраз ацетазоламид также не имел заметного действия на базальную и на стимулированную ирритантами секрецию бикарбонатов, как в контроле, так и при в.в. инфузии NaHCO_3 (Рис. 27 В, Г).

По материалам раздела 3.3 можно сформулировать следующие основные результаты экспериментов.

1) У наркотизированных крыс моделирование щелочного прилива с помощью непродолжительной в.в. инфузии NaHCO_3 приводит к усилению желудочной секреции HCO_3^- , вызванной ирритацией СОЖ, но не оказывает влияния на базальную секрецию. Эффект щелочного прилива проявлялся на фоне ослабленной с помощью ОМЕ собственной секреции кислоты в желудке, но не наблюдался в нормацидном состоянии.

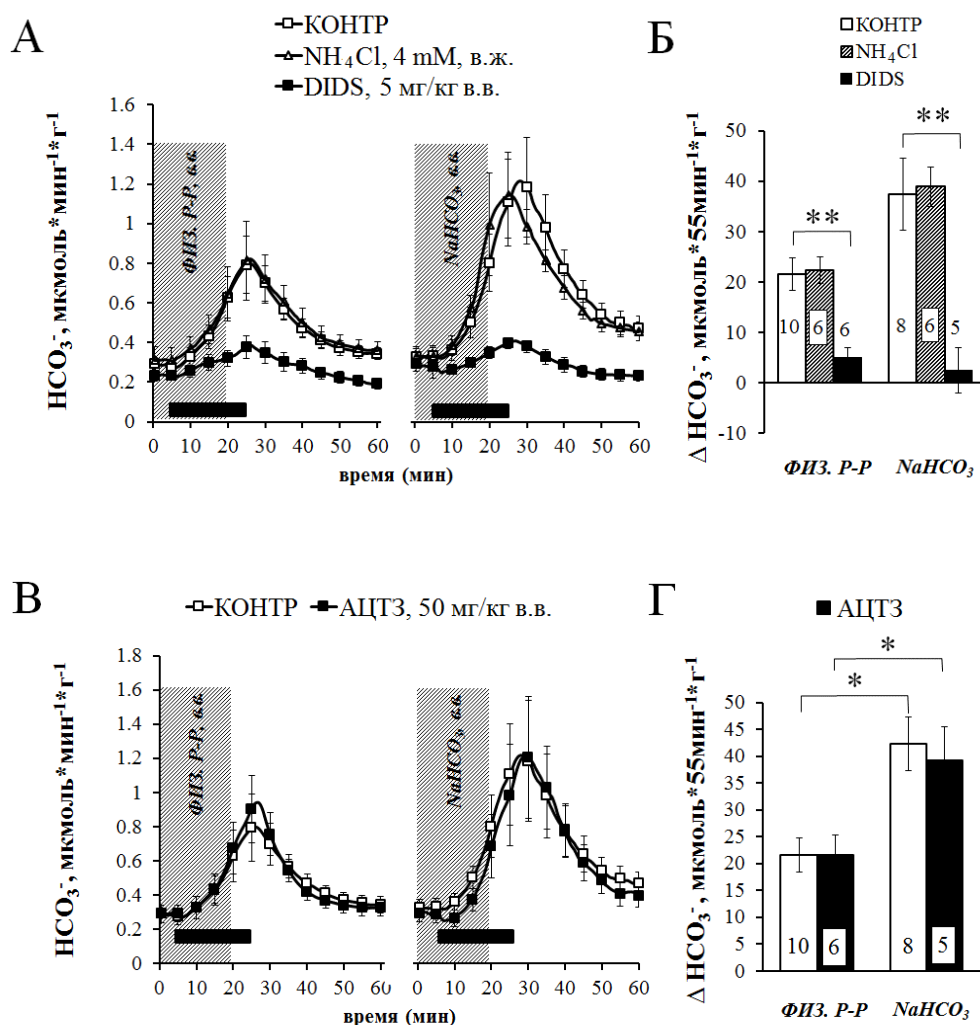


Рис. 27. Влияние блокаторов анионных транспортеров (DIDS и NH_4Cl), либо блокатора карбоангидраз ацетазоламида (АЦТЗ) на вызванную раздражением СОЖ желудочную секрецию бикарбонатов на фоне внутривенной инфузии NaHCO_3 (10 ммоль \cdot кг $^{-1}$ \cdot ч $^{-1}$, 20 мин). А, В) Скорость секреции. Б, Г) Удельная продукция бикарбонатов.

Воздействия проведены в условиях субдиафрагмальной двусторонней ваготомии и угнетения секреции кислоты омепразолом. Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl pH 4.0). Период в.в. инфузии NaHCO_3 или физиологического раствора отмечен на графиках А и В заштрихованным прямоугольником. Введение раздражителя (1 M NaCl pH 2.0) в течение 20 мин отмечено полосой на графиках А и В. Омепразол (10 мг/кг) инъектировали дважды: за 18 ч до эксперимента (в.б.) и за 50 мин до аппликации раздражителя (в.в.). DIDS (5 мг/кг в.в.) инъектировали за 15 мин до раздражения, NH_4Cl (4 mM) вводили внутримышечно в течение 10 мин, начиная за 15 мин до раздражения. Контрольным (КОНТР) группам вводился DMSO (0.1%, 0.3 мл, в.в.).

Статистические сравнения проведены с использованием теста Манна-Уитни: * - $p < 0.01$; ** - $p < 0.001$. Величина выборок указана на столбцах диаграмм Б и Г.

- 2) Сохранение активности базолатеральных транспортеров NBCe1,2 является необходимым условием секреция бикарбонатов при ирритации СОЖ, а равно и потенциации секреции при экспериментальном алкалозе. Блокада апикального транспортера SLC26A9 с помощью NH_4Cl не влияет на секрецию HCO_3^- . Также на секрецию бикарбонатов не оказал влияния неселективный блокатор карбоангидраз ацетазоламид.
- 3) Влияние в.в. инфузии NaHCO_3 на желудочную секрецию бикарбонатов, стимулированную ирритацией СОЖ, сокращалось в присутствии селективного блокатора nNOS 7-NI. При одновременной блокаде обеих изоформ cNOS с помощью L-NNA потенцирующий эффект в.в. NaHCO_3 не менялся. Данный результат получен на фоне ослабленной с помощью ОМЕ секреции к-ты.
- 4) При повышенной концентрации бикарбонатов в желудочном кровотоке блокада синтеза ПГ (с помощью ИНД) угнетала продукцию HCO_3^- в контроле, но не влияла на эффект L-NNA и 7-NI. Влияние ИНД оценивалось при ослабленной с помощью ОМЕ собственной секреции к-ты в желудке.
- 5) Системный алкалоз, вызванный непродолжительной в.в. инфузией NaHCO_3 , не влиял на секрецию пепсиногена в базальных условиях и на фоне ирритации СОЖ.

3.4 Изменение кровотока в желудке под действием блокаторов cNOS и на фоне ирритации СОЖ

Концентрация бикарбонатов в подслизистом слое пропорциональна скорости кровотока в желудке. Известно, что первичная реакция на ирритацию СОЖ связана с изменениями в эндотелии кровеносных сосудов, которые возникают в течение нескольких минут после действия раздражающего фактора. Реакция эндотелия приводит к увеличению кровотока в подслизистом слое, уменьшению эндоваскулярных поражений и агрегации

тромбоцитов и лейкоцитов, вследствие чего меняются барьерные функции СОЖ (Szabo et al., 2012).

Задачей экспериментов, результаты которых представлены в этом разделе, было выяснить, насколько примененное слабое химическое раздражение СОЖ способно менять кровоток, и как блокаторы cNOS влияют на локальный кровоток в желудке и системную гемодинамику.

3.4.1 Изменение объемного кровотока в стенке желудка при системном и локальном введении блокаторов cNOS

Объемный кровоток в передней стенке тела желудка регистрировали у наркотизированных животных после субдиафрагмальной ваготомии при сохраненной фоновой секреции кислоты. Системная инъекция L-NNA (10 мг/кг, в.в.) привела к резкому ослаблению кровотока почти до 40% от базальных значений, что подтвердил однофакторный дисперсионный анализ ($F(19, 171)=11.04$; $p<0.01$). Парные сравнения с базальной скоростью кровотока, зарегистрированной перед введением блокатора, показали, что статистически достоверная реакция развивалась уже через 2 мин после инъекции, а минимум приходился на 5-ую минуту ($p<0.01$, $n=10$; тест Фишера LSD). После этого кровоток стабилизировался и оставался на низком уровне более 20 мин (Рис. 28 А). Системное ведение L-NNA вызывало кроме того кратковременный подъем артериального давления (АД), достигавший пика в $129.3\pm 13.4\%$ от базального к 3-ей минуте ($F(19, 95)=2.28$, $p<0.01$). Возвращение АД к исходному уровню происходило также быстро уже на 6-ой мин после введения блокатора (Рис. 28 Б). Сердечный ритм при этом ослабевал на непродолжительное время, однако, реакция имела статистическую значимость ($F(19, 114)=2.18$, $p<0.01$; Рис. 28 В).

На порядок меньшая доза L-NNA (1 мг/кг), инъецированная ретроградно в селезеночную артерию, вызывала сходные изменения кровотока в стенке

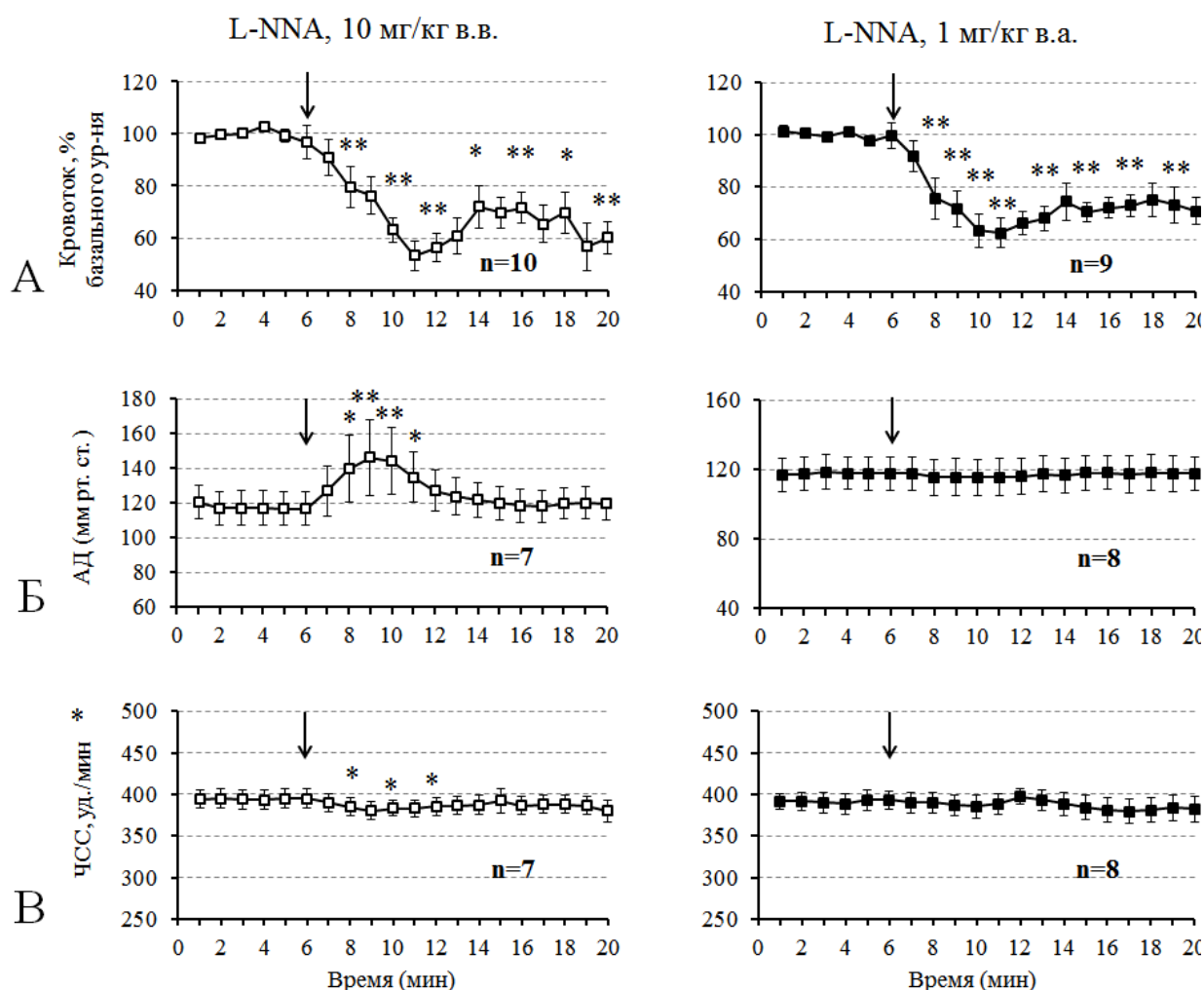


Рис. 28. Влияние блокады cNOS с помощью внутривенного (в.в.) либо близкого внутриартериального (в.а.) введения L-NNA на желудочный кровоток и показатели гемодинамики.

А) Допплеровское лазерное измерение объемного кровотока в передней стенке тела желудка в % от базального уровня. Б) Системное артериальное давление. В) Частота сердечных сокращений.

Стрелкой отмечен момент в.в. аппликации дозы 10 мг/кг, либо ретроградной инъекции в селезеночную артерию 1 мг/кг блокатора. Величина выборки указана на графиках. Статистические сравнения проведены с помощью однофакторного дисперсионного анализа (см. п. 3.4.1). Для сравнения с базальным уровнем, зарегистрированным в момент введения блокатора, использован тест Фишера LSD; ** - $p < 0.01$, * - $p < 0.05$.

желудка, а именно быстрое уменьшение почти до 50% от базального уровня ($F(19, 152)=1.32$, $p<0.01$) с последующим выходом на плато, соответствующим 70% от базального уровня ($p<0.01$, $n=9$; Рис. 28 А). В то же время после локального введения блокатора статистически достоверных изменений АД и ЧСС не происходило (Рис. 28 Б, В).

Селективная *in vivo* блокада nNOS (7-NI, 10 мг/кг, в.в.), течение 1 мин снижала скорость кровотока до 80% от фоновых значений ($F(19,95)=1.84$, $p<0.05$). Уже через 10 мин после инъекции кровоснабжение возвращалось к исходному уровню (Рис. 29 А). Системное введение 7-NI приводило к продолжавшемуся 5 мин уменьшению АД ($F(19, 114)=2.04$, $p<0.05$), но не влияло на ЧСС (Рис. 29 Б, В). Введение 7-NI в спланхнический кровоток (1 мг/кг, в.а.) не вызвало статистически значимых сдвигов ни в объемном кровотоке в теле желудка, ни в показателях системной гемодинамики (Рис. 29).

3.4.2 Изменение объемного кровотока в стенке желудка при слабой ирритации СОЖ

Перфузия полости желудка в течение 20 мин подкисленным гипертоническим раствором (1 М NaCl, pH 2.0) сопровождалась увеличением объемного кровотока в передней стенке его тела ($F(29,174)=3.39$, $p<0.01$). Статистическая достоверность реакции выявлялась уже на 10-ой мин, а максимальное значение, $179\pm 25\%$ от базального уровня, регистрировали на 14-19-ой мин после начала аппликации ирританта (Рис. 30). Ингибиторы конститутивных синтаз оксида азота, L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг, в.в.), в равной мере подавляли эту реакцию (Рис. 30 А). Сходным образом действовала в.в. инъекция 5 мг/кг ИНД (Рис. 30 Б).

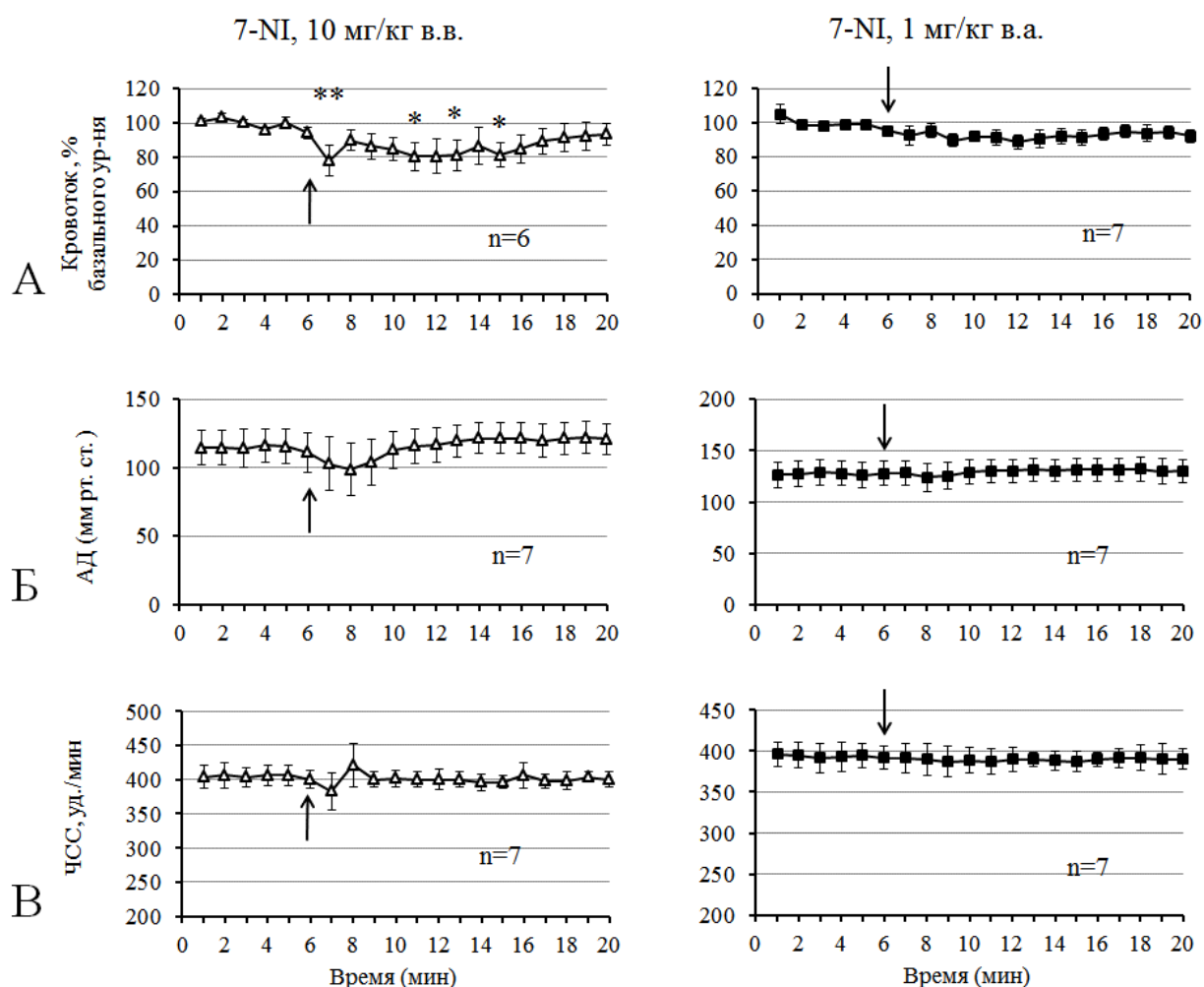


Рис. 29. Влияние блокады nNOS с помощью внутривенного (в.в.) либо близкого внутриартериального (в.а.) введения 7-NI на желудочный кровоток и показатели гемодинамики.

А) Объемный кровоток в передней стенке тела желудка в % от базального уровня. Б) Системное артериальное давление. В) Частота сердечных сокращений.

Стрелкой отмечен момент болюсного в.в. введения 10 мг/кг либо ретроградной инъекции в селезеночную артерию 1 мг/кг блокатора. Величина выборки указана на графиках. Статистические сравнения проведены с помощью однофакторного дисперсионного анализа (см. текст). Сравнения с реакцией в момент введения блокатора проведены с помощью теста Фишера LSD; ** - $p < 0.01$, * - $p < 0.05$.

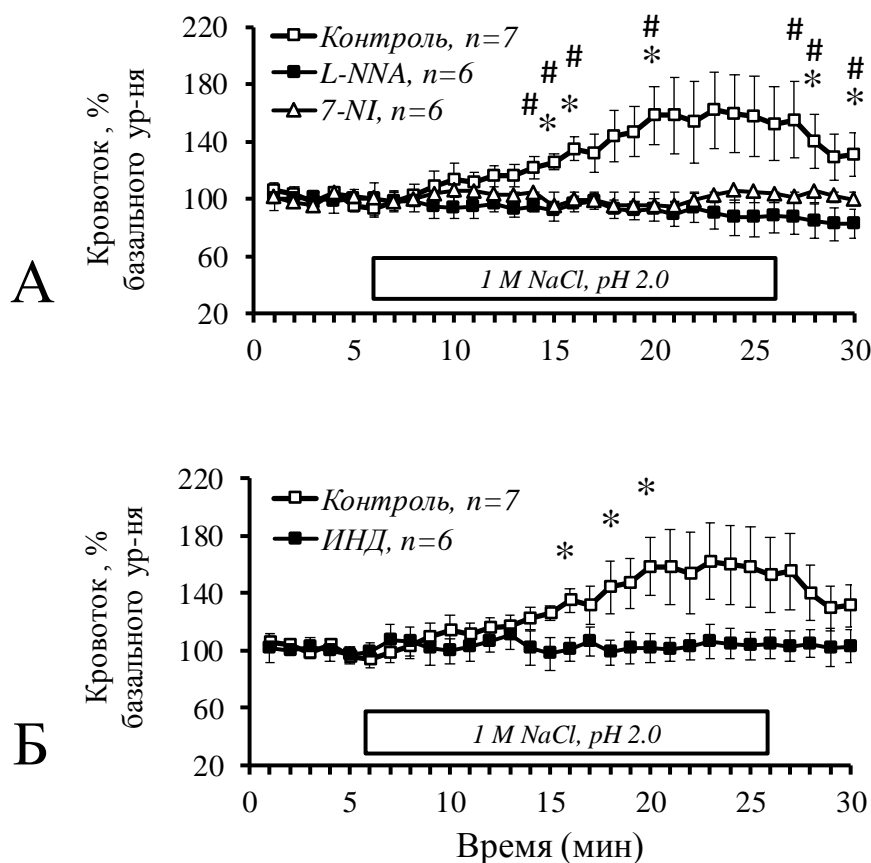


Рис. 30. Влияние блокаторов сNOS (А) и ЦОГ (Б) на объемный кровоток в передней стенке тела желудка на фоне слабой ирритации СОЖ.

Регистрация объемного кровотока с помощью лазерной доплеровской флоуметрии. Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 M NaCl, pH 2.0) в течение 20 мин (отмечена полосой на графиках). Блокаторы NOS, L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг в.в.), инъектировали за 15 мин до ирритации. ИНД (5 мг/кг в.в.) инъектировали за 50 мин до ирритации. Контрольным группам вводился DMSO (0.1%, 0.3 мл, в.в.).

Парные сравнения проведены с помощью теста Манна-Уитни: сравнение контроля с эффектом L-NNA или ИНД - * - $p < 0.05$; сравнение с эффектом 7-NI - # - $p < 0.05$.

3.4.3 Влияние L-NNA, 7-NI, ИНД и омепразола на эрозивные поражения и площадь гиперемизированных участков СОЖ

Слабая ирритация по определению не приводит к разрушению желудочного эпителия (Robert et al., 1983). Тем не менее действие ирритантов сопровождалось макроскопическими изменениями СОЖ. Спустя 40 мин после аппликации подкисленного гипертонического раствора в полость желудка, обследование СОЖ выявляло поражения, представленные в основном единичными точечными кровоизлияниями и реже мелкими эрозиями (<1 мм). Расчёт индекса поражения описан в разделе Методика (п. 2.7). На препаратах СОЖ также были обнаружены обширные участки умеренной гиперемии с интенсивной розовой окраской. В нормацидном состоянии 7-NI либо ИНД вызывали существенное (30-40%) уменьшение индекса поражения СОЖ, хотя статистической значимости данный эффект достигал только под действием ИНД ($p < 0.05$; тест Манна-Уитни). Кроме того, совместное действие 7-NI и ИНД приводило к сокращению площади гиперемии вплоть до 0 ($p < 0.05$ для 7-NI; $p < 0.01$ для ИНД). Неселективная блокада обеих изоформ cNOS с помощью L-NNA не влияла на индекс поражения СОЖ (Табл. 1).

На фоне ОМЕ индекс поражения существенно уменьшался ($p < 0.05$), но относительная площадь гиперемии при этом не менялась (Табл. 1). В этом случае L-NNA вызывал более чем двукратное увеличение индекса поражения ($p < 0.05$), но не площади гиперемии. На фоне омепразола 7-NI либо ИНД не оказывали влияния на индекс поражения. В то же время ИНД вызывал сильное сокращение зоны гиперемии ($p < 0.05$). Совместное действие L-NNA и ИНД также приводило к значительному сокращению зон гиперемии ($p < 0.05$) по сравнению с соответствующим контролем, но не оказывало влияния на индекс поражения СОЖ. При совместной аппликации 7-NI и ИНД отмечено двукратное увеличение индекса поражений ($p < 0.05$) и уменьшение гиперемии СОЖ до нуля ($p < 0.01$; Табл. 1).

Итог изучения сосудистых реакций на ирритацию СОЖ (раздел 3.4) может быть представлен следующим образом.

1) Слабая ирритация СОЖ, имитирующая физиологическое действие химуса при пищеварении, приводит к относительно быстрому усилению кровотока в стенке желудка, опережающему транспорт бикарбонатов на поверхность желудочного эпителия. При этом выявилось слабое поражение СОЖ, представленное в основном точечными кровоизлияниями и умеренной гиперемией.

Таблица 1. Влияние L-NNA, 7-NI, ИНД и омепразола на индекс поражения и относительную площадь гиперемии СОЖ после слабой ирритации*.

Воздействие	Нормацидное состояние			Анацидное состояние (омепразол)		
	n	Индекс поражения СОЖ	Площадь гиперемии СОЖ (%)	n	Индекс поражения СОЖ	Площадь гиперемии СОЖ (%)
1 Контроль	8	24.3±3.7 ^{а,б}	56.2±7.8 ^{в,и}	8	9.3±5.2 ^{б,г}	51.6±15.0 ^е
2 L-NNA	8	20.2±9.7	59.2±11.2	12	22.9±4.7 ^г	43.0±10.1 ^ж
3 7-NI	8	16.0±6.7	23.1±9.1 ^в	10	11.5±1.8	38.1±12.7 ^{кк}
4 IND	6	13.6±2.0 ^а	00.0 ^и	9	9.3±1.5 ^д	12.0±8.2 ^{е,з}
5 L-NNA+IND				6	12.7±2.7	14.3±8.3 ^ж
6 7-NI+IND				7	22.9±9.7 ^д	00.0 ^{з,кк}

*Ирритация СОЖ у наркотизированных крыс была вызвана 20-минутной аппликацией в полость желудка подкисленного гипертонического раствора (1 М NaCl, pH 2.0) с последующей 40-мин отмывкой изотоническим раствором. L-NNA и 7-NI (10 мг/кг, в.в.) вводились за 15 до ирритации, IND (5 мг/кг, в.в.) - за 50 мин. Омепразол (10 мг/кг) вводили дважды: за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до ирритации СОЖ (в.в.). Статистические сравнения между величинами, отмеченными одинаковыми надстрочными буквами, проведены с помощью теста Манна-Уитни: а-з – $p < 0.05$; ии, кк – $p < 0.01$.

2) Местное действие L-NNA связано с длительным ослаблением базального кровотока в желудке, в то время как 7-NI такого влияния не оказывает. Локальное действие L-NNA и 7-NI в пределах спланхического кровеносного русла, а также системная аппликация ИНД блокировали усиление желудочного кровотока, вызванное слабой ирритацией СОЖ.

3) Результаты макроскопического анализа поражений СОЖ после ирритации в значительной мере согласуются с данными об изменении объемного кровотока в стенке желудка. Под действием 7-NI, а также ИНД сокращалась зона гиперемии слизистой оболочки, на которую L-NNA влияния не оказывал. Влияние L-NNA на индекс поражения СОЖ проявлялось только в присутствии ОМЕ.

3.5 Роль капсаицин-чувствительных афферентных окончаний в секреторном ответе на ирритацию СОЖ; значение TRPV1 рецепторов

Активация nNOS и eNOS в ответ на увеличение кислотности в полости желудка, как напрямую, так и опосредованно связана с возбуждением капсаицин-чувствительных первичных афферентных окончаний в подслизистом слое органа. Вместе с тем известно, что блокада основных сайтов связывания протонов на плазматической мембране капсаицин-чувствительных первичных афферентов (КЧПА), ванилоидных рецепторов переменного потенциала 1-го типа (TRPV1), не влияет на желудочную секрецию HCO_3^- и гиперемическую реакцию, вызванные действием кислоты на СОЖ (Aihara et al., 2005a; Sasaki et al., 2009; Tashima et al., 2002). С учетом разнонаправленного действия eNOS и nNOS на секрецию HCO_3^- , описанного выше (раздел 3.2), задачей данной серии экспериментов было выяснить, в какой мере TRPV1 вовлечены в регуляцию eNOS- или nNOS-зависимой секреции HCO_3^- и кровотока при раздражении СОЖ. Дополнительно анализировалась роль TRPV1 в управлении секрецией пепсиногена.

3.5.1 Влияние блокады TRPV1 и ASIC, а также десенситизации капсаицин-чувствительных первичных афферентов на желудочную секрецию HCO_3^- в базальных условиях и на фоне ирритации СОЖ

Для блокады TRPV1 рецепторов была использована ретроградная инфузия в селезеночную артерию их конкурентного антагониста капсазепина (КПЗП, $0.6 \text{ мг} \times \text{кг}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$), которую начинали за 5 мин до раздражения СОЖ, после чего продолжали еще 15 мин. Реакция кислоточувствительных рецепторов (ASIC) подавлялась с помощью амилорида (АМЛР), который вводили внутривентрикулярно вместе с перфузионным раствором в концентрации 0.2 mM. Химическую десенситизацию КЧПА производили с помощью подкожных инъекций капсаицина (КАПС, 50 мг/кг), повторявшихся в течение 3-х дней за неделю до эксперимента. Развитие десенситизации С-афферентов после введения КАПС контролировали перед началом эксперимента по утрате роговичного хемосенсорного рефлекса.

Аппликация КПЗП, АМЛР и десенситизация КЧПА не влияли на базальный уровень кислоты (на рисунке не показано), но каждое из веществ существенно ослабляло базальную секрецию бикарбонатов (Рис. 31 А, Б; $F(3, 15)=4.44$, $p<0.05$). Кроме того, десенситизация КЧПА практически полностью устраняла секрецию бикарбонатов, вызванную ирритацией СОЖ ($F(3, 15)=7.74$, $p<0.05$; Рис. 31 В). Однако ни КПЗП, ни АМЛР, не влияли на удельную продукцию HCO_3^- , стимулированную ирритантами (Рис. 31В).

Изменения секреции HCO_3^- на фоне близкой в.а. инфузии КПЗП далее анализировались в условиях блокады изоформ cNOS с помощью L-NNA или 7-NI (оба 10 мг/кг, в.в.) (Рис. 32). Трехфакторный дисперсионный анализ подтвердил статистическую достоверность действия как блокаторов cNOS, так и КПЗП, и их взаимное влияние. Тем не менее парные сравнения показали, что на фоне КПЗП аппликация L-NNA и 7-NI не оказывали статистически

достоверного действия на базальную секрецию (Рис. 32 А, Б; Приложение 2, Табл. 12 А, Б).

Аппликация КПЗП не влияла на удельную продукцию HCO_3^- у животных с интактной NOS и оказалась неэффективной на фоне 7-NI. Однако совместное действие КПЗП и L-NNA сопровождалось статистически достоверным снижением удельной продукция HCO_3^- более, чем на 50% ($p < 0.05$, $n = 7 \sim 8$; Рис. 32 А, В; Приложение 2, Табл. 12В). Сравнение относительных показателей секреции HCO_3^- на фоне блокады TRPV1 и cNOS представлено на рисунке 32 Г, Д. Статистически достоверного влияния КПЗП, а также взаимодействия КПЗП с блокаторами конститутивных синтаз NO при этом не было выявлено (Приложение 1, Табл. 12 Г, Д).

3.5.2 Влияние блокады TRPV1 и ASIC, а также десенситизации КЧПА на желудочную секрецию пепсиногена на фоне ирритации СОЖ; взаимодействие КПЗП и блокаторов cNOS

Близкая внутриартериальная инфузия КПЗП приводила к уменьшению базальной секреции пепсиногена почти на половину (тест Манна-Уитни, $p < 0.05$, $n = 7 \sim 8$). Такой же эффект отмечен после десенситизации первичных афферентов с помощью КАПС ($p < 0.01$, $n = 5 \sim 7$). Блокатор кислоточувствительных рецепторов АМЛР не оказывал заметного действия (Рис. 33 А, Б).

Ирритация СОЖ, как сообщалось выше, вызывала непродолжительное угнетение секреции пепсиногена на протяжении 15-30 мин. Аппликация КПЗП усугубляла эту реакцию, значительно сокращая продукцию пепсиногена (Рис. 33, А, В; Тест Манна-Уитни, $p < 0.05$, $n = 7 \sim 8$). Амилорид не влиял на продукцию пепсиногена после введения ирританта. В то же время, после субхронического введения КАПС происходило достоверное увеличение продукции пепсиногена по сравнению с контрольной реакцией (Рис. 33 А, В; $p < 0.05$, $n = 7 \sim 5$). Аппликация блокаторов NOS, L-NNA и 7-NI, на фоне КПЗП

[Type here]

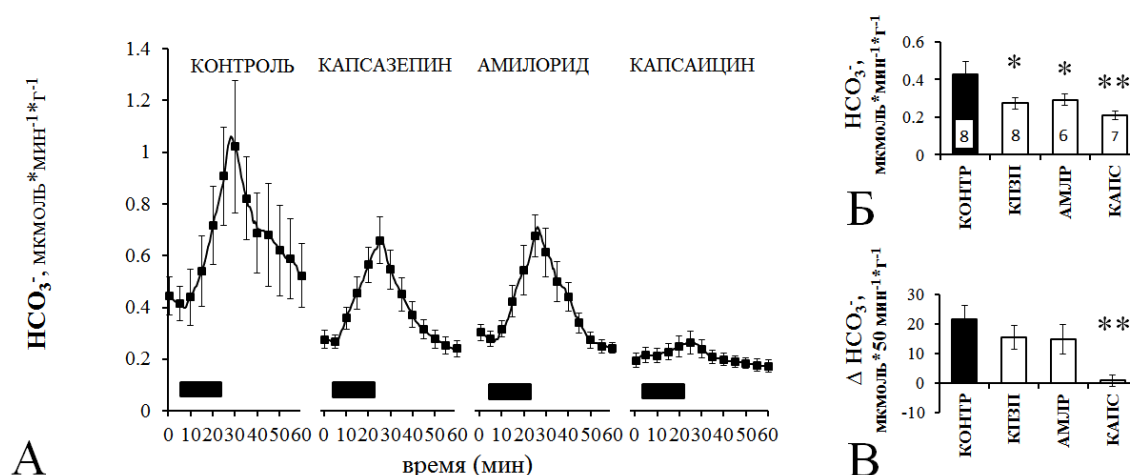


Рис. 31. Влияние капсазепина (КПЗП), амилорида (АМЛР) и десенситизации первичных афферентов с помощью капсаицина (КАПС) на желудочную секрецию бикарбонатов, вызванную раздражением СОЖ. Сравнение с контрольными воздействиями (КОНТР).

А) Скорость секреции бикарбонатов. Б) Базальная секреция HCO_3^- . В) Удельная продукция HCO_3^- .

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl, pH 4.0). Раздражение СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение раздражителя отмечено полосой на графике А. КПЗП ($0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, в.а.) инфузирова́ли в течение 20 мин, начиная за 5 мин до раздражения. АМЛР (0.2 mM, в.ж.) - в течение 15 мин до раздражения. КАПС (50 мг/кг, в.б.) вводили ежедневно в течение 3-х дней, начиная за 7 дней до эксперимента. Контрольной группе вводился DMSO (0.1%, 0.3 мл, в.в.).

Статистические сравнения (Б, В) проведены с помощью однофакторного дисперсионного анализа (см. п. 4.5.1). Для последующих множественных сравнений использован тест Фишера LSD: * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$. Величины выборок указаны на столбцах диаграммы Б.

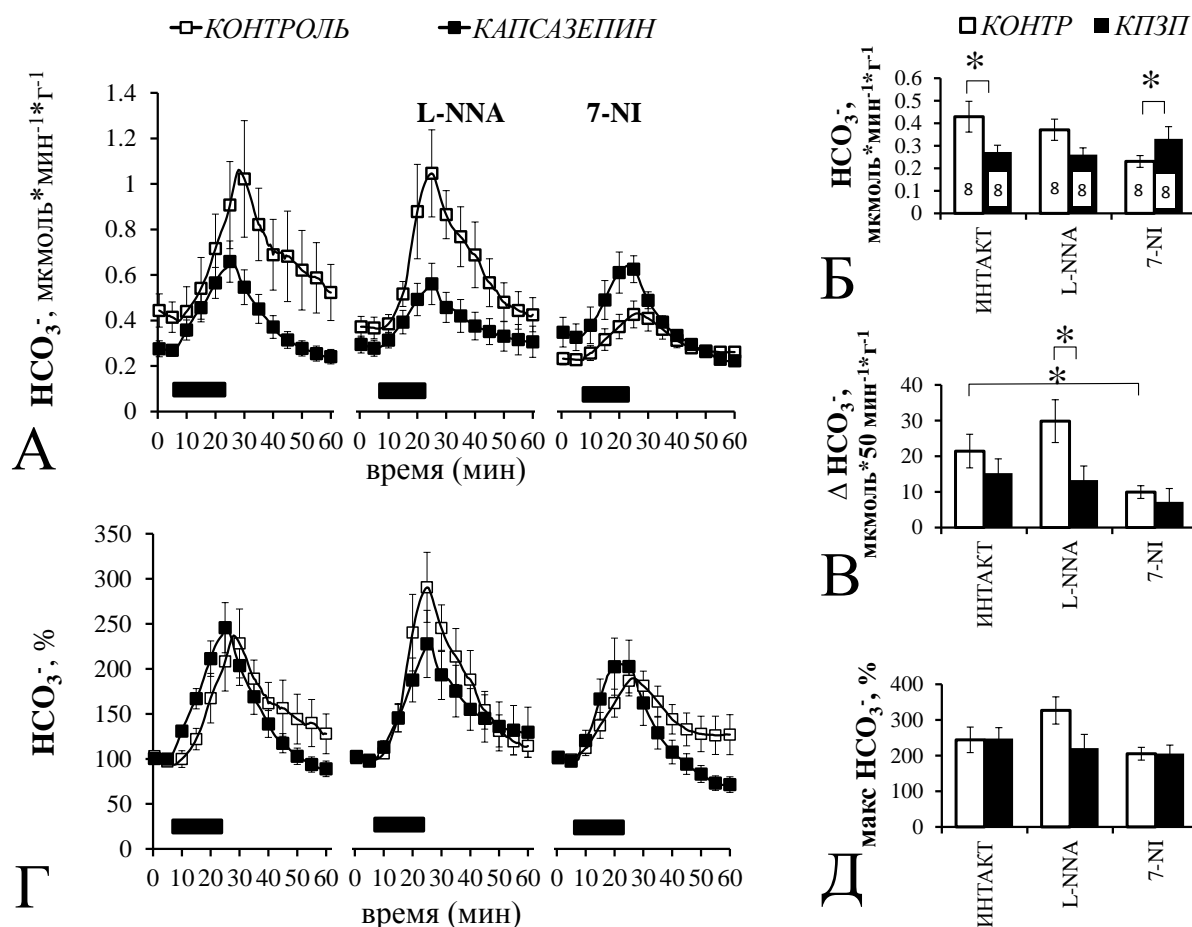


Рис. 32. Секретия бикарбонатов, вызванная раздражением СОЖ, на фоне блокады изоформ cNOS и TRPV1.

А) Скорость секреции. Б) Базальная секреция. В) Удельная продукция, стимулированная введением раздражителей. Г) Скорость секреции, нормированная на фоновый уровень, принятый за 100%. Д) Максимальная относительная скорость секреции.

Непрерывная полостная перфузия желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl, pH 4.0). Раздражение СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение раздражителей отмечено полосой на графиках А и Г. Блокаторы cNOS, L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг в.в.), инъектировали за 15 мин до раздражения. Капсазепин (КПЗП) инфузирова в.в. в течение 20 мин в дозе $0.6 \text{ мг} \times \text{кг}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$, начиная введение за 5 мин до раздражения. Контрольным группам (КОНТР) вводился DMSO (0.1%, 0.3 мл, в.в.).

Статистические сравнения проведены с помощью 3-х и 2-х-факторного дисперсионного анализа (Приложение 2, Табл. 12). Для множественных сравнений использован тест Фишера LSD: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Величина выборок указана на гистограмме Б.

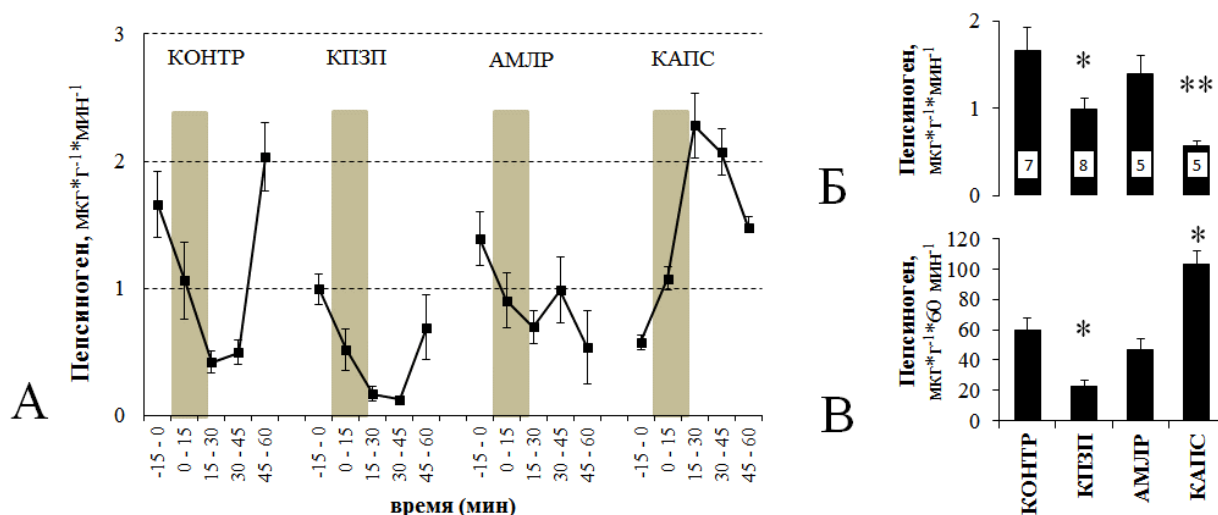


Рис. 33. Влияние капсазепина (КПЗП), амилорида (АМЛР) и десенситизации первичных афферентов с помощью капсаицина (КАПС) на секрецию пепсиногена в желудке на фоне ирритации СОЖ. Сравнение с контрольными воздействиями (КОНТР).

А) Скорость секреции пепсиногена. Б) Базальная секреция. В) Продукция в течение 60 мин после начала ирритации СОЖ.

Непрерывная перфузия полости желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl, pH 4.0). Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 NaCl pH 2.0) в течение 20 мин. Введение ирританта отмечено прямоугольником на графике А. КПЗП ($0.6 \text{ мг} \times \text{кг}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$, в.а.) инфузировали в течение 20 мин, начиная за 5 мин до ирритации. АМЛР (0.2 мМ , в.ж.) - в течение 15 мин до ирритации. КАПС (50 мг/кг , в.б.) вводили ежедневно в течение 3-х дней, начиная за 7 дней до эксперимента.

Статистические сравнения с контрольными значениями (Б, В) проведены с помощью теста Манна-Уитни: * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$. Величины выборок указаны на столбцах диаграммы Б.

не приводила к дополнительным изменениям продукции пепсиногена по сравнению с реакцией в присутствии одного только КПЗП (на рисунке не показано).

3.5.3 Влияние блокады TRPV1 на объемный кровоток в желудке на фоне ирритации СОЖ

Скорость базального кровотока в стенке желудка сокращалась на фоне ретроградной инфузии КПЗП в селезеночную артерию ($0.6 \text{ мг} \times \text{кг}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$), начиная с 5-ой мин введения ($F(29, 145)=3.34, p<0.01$). Минимальное значение кровотока при этом равнялось $78.5 \pm 6.4\%$ от базального уровня (Рис. 34 А). Ирритация СОЖ подкисленным гипертоническим раствором сопровождалась увеличением объемного кровотока. Данная реакция ослабевала в присутствии КПЗП, хотя 2-х факторный дисперсионный анализ не подтвердил эффект, но выявил зависимость эффекта ирритации от КПЗП (Рис. 34Б; Приложение 2, Табл. 13).

Описанная в этом разделе серия экспериментов показала принципиальное влияние КЧПА на секрецию и кровоток в желудке в условиях ирритации СОЖ.

1) У наркотизированных животных базальная секреция кислоты не зависела от активности периферических КЧПА, действия КПЗП и АМЛР действия. С другой стороны, базальная продукция HCO_3^- и пепсиногена подавлялись в присутствии КПЗП и после десенситизации капсаином. Десенситизация КЧПА и влияние КПЗП также ослабляли базальный кровоток в желудке.

2) Усиление секреции HCO_3^- , равно как и увеличение кровотока в стенке желудка на фоне ирритации СОЖ полностью обеспечивалось периферической активацией КЧПА. Реакция КЧПА на ирритацию также провоцировала непродолжительное снижение секреции пепсиногена.

[Type here]

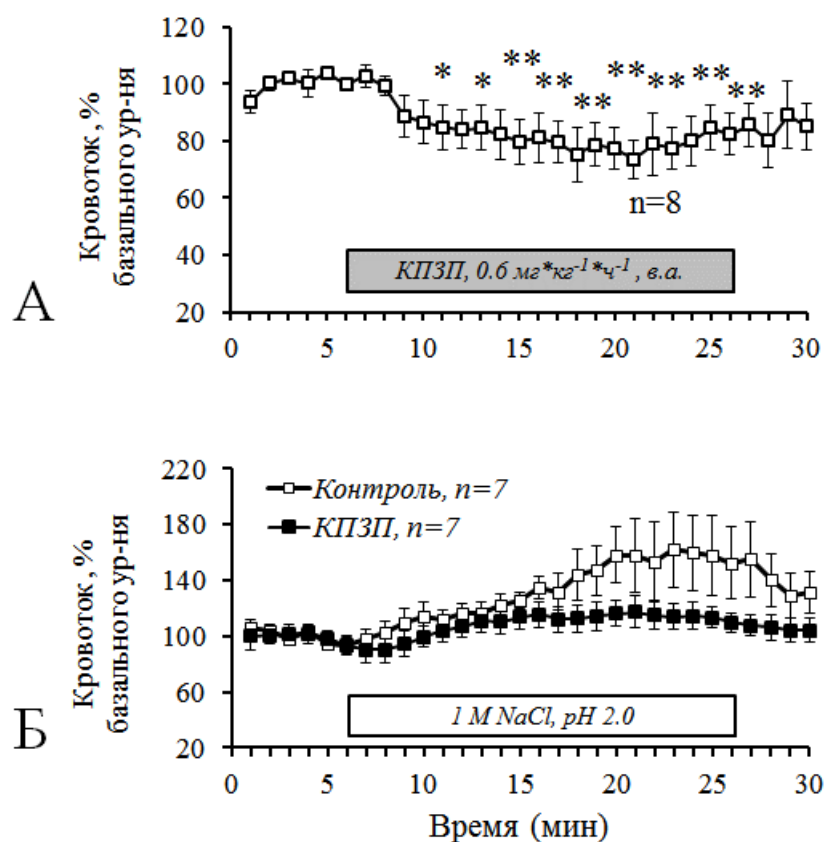


Рис. 34. Влияние блокады TRPV1 капсазепином (КПЗП) на базальный и стимулированный ирритацией СОЖ объемный кровоток в передней стенке тела желудка.

А) Базальный кровоток. Б) Кровоток, вызванный внутрижелудочной инфузией подкисленного гипертонического раствора (1M NaCl, pH 2.0).

КПЗП инъецировали в спланхический кровоток ретроградно через селезеночную артерию ($0.6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) в течение 20 мин. Период инфузии КПЗП или аппликации ирританта отмечен прямоугольником. Инфузия КПЗП (график Б) начиналась за 5 мин до аппликации ирританта. Статистическая достоверность влияния КПЗП на базальный кровоток (график А) оценивалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа (см. текст). Сравнения с реакцией в момент введения блокатора проведены с помощью теста Фишера LSD; ** - $p < 0.01$, *- $p < 0.05$. Влияние КПЗП (график Б) оценивалось с помощью 2-х факторного дисперсионного анализа (приложение 2; Табл. 13). Величины выборок указаны на графиках.

- 3) Активация наиболее вероятного сенсора протонов в подслизистом слое желудка, а именно TRPV1 рецептора, не является достаточным сигналом для усиления секреции HCO_3^- при слабой ирритации СОЖ.
- 4) Влияние L-NNA на удельную продукцию HCO_3^- , вызванную ирритацией, зависело от активности TRPV1 рецепторов, в то время как подавление реакции с помощью 7-NI не зависело от TRPV1.

3.6 Парасимпатические воздействия на желудочную секрецию на фоне слабой ирритации слизистой оболочки; роль нитрергической и простагландиновой системы

Парасимпатические волокна в составе блуждающего нерва, достигающие клеток межмышечного и подслизистого нервных сплетений, активируют желудочную секрецию ульцерогенных факторов, кислоты и пепсиногена. С другой стороны, ваго-вагальные рефлексy являются центральным звеном реакций адаптивной гастропротекции, включая продукцию ПГ и секрецию бикарбонатов. В осуществлении этих реакций задействованы как эфферентные, так и афферентные проводники блуждающего нерва. Описанные ниже эксперименты проведены для оценки недостаточно изученного ранее влияния ирритации СОЖ на вагусные секреторные эффекты в желудке, включая действие афферентов.

3.6.1 Роль холинергического, гистаминового и гастринового опосредования в регуляции желудочной секреции кислоты, бикарбонатов и пепсиногена

Использованная экспериментальная модель подтвердила, что действие блуждающего нерва на желудочную секрецию полностью зависит от холинергической синаптической передачи. Электрическое раздражение периферического отрезка левого субдиафрагмального ствола вагуса (10 В, 1 мс, 8 Гц), длившееся 10 мин, не оказало влияния на ЧСС и АД животного, но

[Type here]

вызвало значительные сдвиги показателей желудочной секреции. В частности, скорость секреции кислоты увеличивалась в 70 раз по сравнению с базальным уровнем, а максимальные значения секреции бикарбонатов и пепсиногена превышали базальный уровень в 1.5 раза (Рис. 35). Секреторные ответы достигали максимума к 10-12 минуте после начала раздражения нерва, а затем возвращались к исходным значениям в течение 20-25 мин. Внутривенная инъекция М-холиноблокатора атропина (30-100 мкг/кг) вызывала непродолжительное (в течение 10 мин) снижение АД на 10-15 мм рт. ст. и увеличение ЧСС. В условиях ваготомии атропинизация не влияла на базальные значения желудочной секреции. В то же время атропин в дозе 100 мкг/кг блокировал все секреторные ответы на раздражение нерва. Введение Н-холиноблокатора гексаметония (10 мг/кг в.в.) также полностью прекращало вагусную секрецию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена (Рис. 35), и, кроме того, приводило к уменьшению АД (на рисунке не показано). Дополнительно проведенная хирургическая десимпатизация желудка посредством перевязки обоих чревных нервов и надпочечников не имела статистически значимых последствий для секреторной реакции.

Полученные результаты также подтвердили известный феномен гистаминового опосредования холинергических и гастриновых влияний на париетальные клетки. Инъекция блокатора H_2 гистаминовых рецепторов циметидина (10-50 мг/кг, в.в.) не вызвала существенных изменений базальной желудочной секреции и гемодинамики, но значительно ослабляла стимулированную вагусом секрецию кислоты и пепсиногена (Рис. 36 А, Б, Д, Е). Максимальный эффект циметидина отмечен при использовании дозы 30 мг/кг, введенной за 10 мин до начала раздражения нерва. Как показано на рисунке 36 Б, Е, удельная продукция кислоты при этом уменьшилась почти на 90% ($p < 0.01$, $n = 11 \sim 9$), а продукция пепсиногена - на 35% ($p < 0.05$, $n = 11 \sim 9$). Тем не менее на вагусную продукцию HCO_3^- циметидин влияния не оказал.

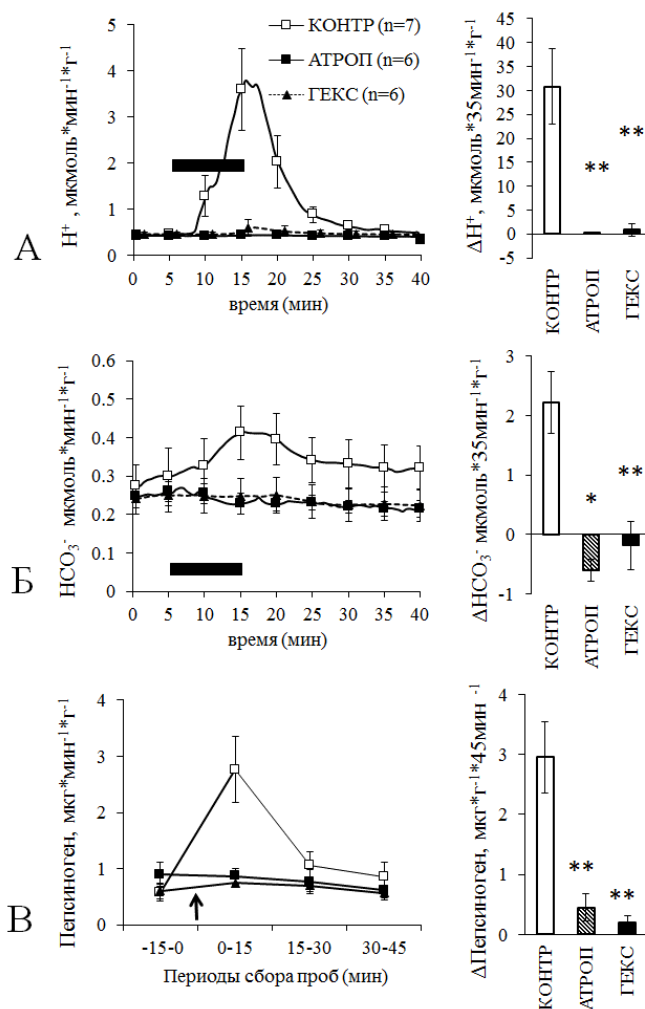


Рис. 35. Секреция кислоты, бикарбонатов и пепсиногена в желудке наркотизированных крыс в ответ на электрическое раздражение периферического отрезка левого поддиафрагмального блуждающего нерва. Влияние Н- и М-холиноблокады.

На графиках слева – скорость секретиции кислоты (А), бикарбонатов (Б) и пепсиногена (В); справа – удельная продукция. Раздражение нерва (отмечено полосой на графиках А и Б) производилось прямоугольными электрическими импульсами (10 В, 1 мс, 8 Гц) в течение 10 мин. На графике В начало раздражения нерва показано стрелкой. Представлены реакции в контрольных условиях (КОНТР), а также спустя 10 мин после в.в. введения 0,1 мг/кг атропина (АТРОП), либо 10 мг/кг гексаметония (ГЕКС).

Статистические сравнения с контролем проведены с помощью теста Манна-Уитни: * - $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Величина выборок указана на графике А.

Подкожное введение гистамина (0.5 мг/кг) приводило к увеличению секреции кислоты, продолжавшемуся более 35 мин. Пик секреции кислоты ($\leq 210\%$ от базального уровня) был отмечен через 10-15 минут после введения. Данная реакция полностью подавлялась циметидином. В то же время влияния гистамина на секрецию бикарбонатов и пепсиногена не проявилось (Рис. 36).

Синтетический пептидный аналог активной части гормона гастрина – пентагастрин (10-100 мкг/кг в.в.) дозозависимо активировал желудочную секрецию кислоты и пепсиногена. Пик секреции кислоты в ответ на введение супрамаксимальной дозы пентагастрина (70 мкг/кг) достигал 180% от базального уровня, а скорость секреции пепсиногена увеличивалась до 190% (Рис. 36 А, Д). При этом пентагастрин во всем диапазоне исследованных доз не влиял на секрецию HCO_3^- , а также на регистрируемые параметры гемодинамики. Предварительная (за 10 мин до введения пентагастрина) инъекция циметидина (30 мг/кг, в.в.) подавляла секрецию кислоты. В противоположность этому секреция пепсиногена, вызванная введением пентагастрина, не изменялась. Циметидин также не влиял на секрецию HCO_3^- (Рис. 36).

3.6.2 Избирательная регуляция желудочной секреции кислоты, бикарбонатов и пепсиногена С-волоками желудочных ветвей субдиафрагмального блуждающего нерва

Субдиафрагмальная часть блуждающего нерва содержит в основном немиелинизированные афферентные С-волокна. На долю миелинизированных проводников приходится лишь 0.3-0.5 %. Вполне очевидно, что электрическое раздражение ствола блуждающего нерва вызывает не только ортодромно распространяющиеся по эфферентным волокнам возбуждение, но и антидромное возбуждение афферентов. На уровне диафрагмы выявлены значительные вариации диаметра С-волокон от 0.1 до 1.6 мкм, что позволило достаточно давно предположить функциональные различия групп нервных

проводников (Berthoud, 1996). Тем не менее эта гипотеза не получила достаточных экспериментальных подтверждений, хотя известно, что волокна в составе вагуса характеризуются различным набором медиаторов и оканчиваются в желудочном энтеральном сплетении на нейронах разной медиаторной специфичности (Schubert, 2000; Qian et al., 1996).

Все это обосновало проведение специальной серии экспериментов для выяснения влияния отдельных популяций волокон в желудочных ветвях блуждающего нерва на секрецию желудочных желез и эффект антидромного раздражения вагусных афферентов. Эти опыты были проведены при правосторонней субдиафрагмальной ваготомии, на фоне перерезки больших чревных нервов и перевязки обоих надпочечников. Порядок стимуляции групп волокон субдиафрагмального вагуса, различающихся по скорости проведения импульса, описан в разделе 2.6.

Избирательная стимуляция В-волокон в составе желудочной ветви левого субдиафрагмального блуждающего нерва не влияла на секрецию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена в желудке (Рис. 37). Совместное раздражение волокон группы В и быстро проводящей популяции С волокон (С1) импульсами длительностью 0.1 мс стимулировало продукцию H^+ близкую к максимальной. Увеличение длительности импульса до 1.0 мс, при котором одновременно возбуждались В, С1 волокна и медленно проводящая группа волокон С2, не приводило к дальнейшему росту продукции кислоты (Рис. 37), показывая, что на секрецию обкладочных клеток влияет в основном «быстро проводящая» популяция С-волокон желудочных ветвей нерва. Активация В- и С1-волокон также вызывала усиление секреции бикарбонатов примерно на 25% от базального уровня. Увеличение длительности стимула до 1.0 мс, сопровождавшееся дополнительной активацией «медленно проводящей» группы С2-волокон, увеличивало скорость секреции HCO_3^- до 150% по сравнению с базальным уровнем (Рис. 37А). Статистическая достоверность этих сдвигов подтвердилась при сравнении удельной продукции HCO_3^- (Рис.

37Б). Стимуляция «быстро проводящей» группы С волокон (C1) субдиафрагмального вагуса вызывала усиление секреции пепсиногена до 200% по сравнению с базальным уровнем. Суммарное же раздражение C1 и C2 групп волокон (наряду с В) не привело к статистически достоверному увеличению реакции (Рис. 37 А, Б), что свидетельствует о преимущественном влиянии на главные клетки популяции «быстро проводящих» С волокон желудочной ветви вагуса.

3.6.3 Влияние десенситизации первичных афферентов с помощью КАПС на секреторную реакцию желудка, вызванную электрическим раздражением блуждающего нерва

Электрическое раздражение ветвей блуждающего нерва неизбежно сопровождается возбуждением афферентных волокон, антидромное распространение потенциала действия по которым может вызвать сдвиги как в передаче нервного импульса в интрамуральных ганглиях, так и в реакции эффекторных тканей, что происходит вследствие выделения нейропептидов из периферических сенсорных окончаний. При этом на долю капсаицин-чувствительных первичных афферентов (КЧПА) в желудочных ветвях вагуса приходится 10-30% немиелинизированных С-волокон (Berthoud et al., 1997; Blackshaw et al., 2000).

В данной серии экспериментов десенситизацию желудочных афферентов производили с помощью перивагальной аппликации нейротоксина капсаицина. У млекопитающих аппликация КАПС на нерв в миллимолярной концентрации вслед за кратковременным возбуждением приводит к временной десенситизации С- и отчасти А δ -волокон, а затем к блокаде проведения группы С-волокон (Золотарев, Ноздрачев, 2001).

Десенситизация А- и отчасти С-волокон относительно непродолжительное явление, проведение импульса восстанавливается в среднем через 90 мин (Marsh et al., 1987; Waddel, Lawson, 1989). Последующий

[Type here]

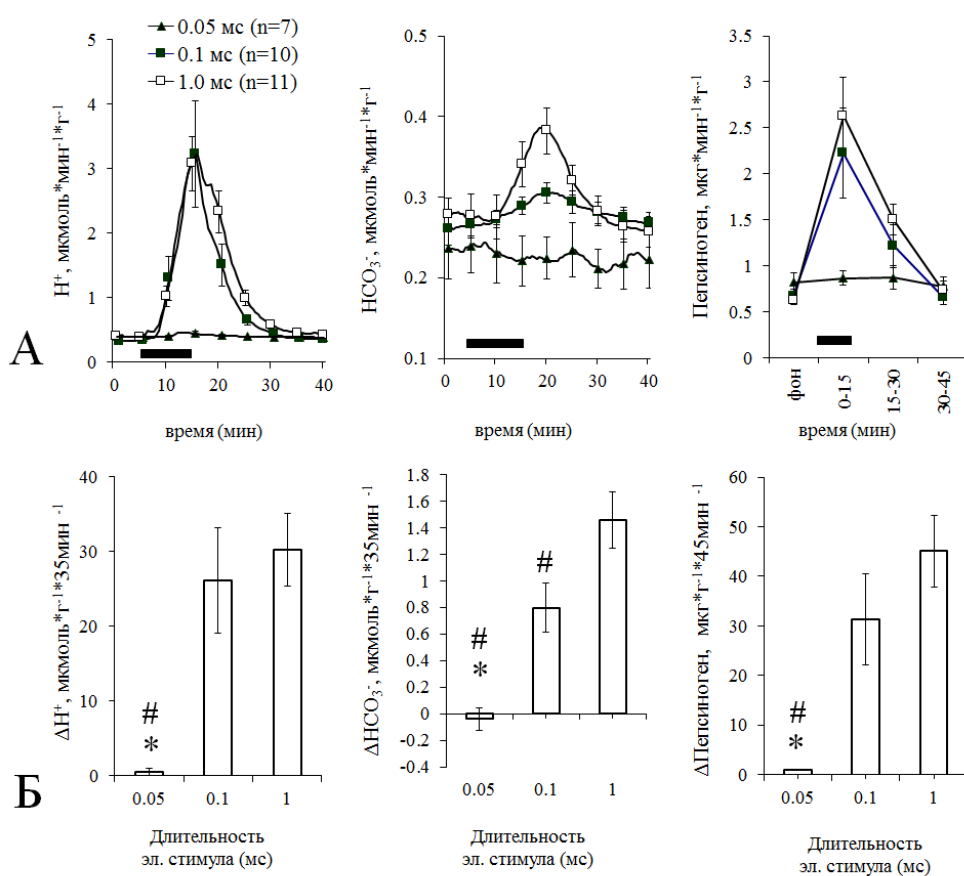


Рис. 37. Скорость секреции (А) и удельная продукция (Б) кислоты, бикарбонатов и пепсиногена в желудке наркотизированных крыс в ответ на стимуляцию периферического отрезка блуждающего нерва электрическими импульсами длительностью 0.05, 0.1 и 1.0 мс, амплитудой 6В и частотой 8 Гц в течение 10 мин.

Период раздражения отмечен полосой на графиках А. Удельная продукция рассчитана как превышение секреции над базальным уровнем в течение 35 мин (45 мин для пепсиногена) после начала стимуляции нерва. Статистические сравнения проведены с помощью критерия Манна-Уитни. Сравнение с реакцией на импульсы длительностью 0.1 мс: * - $p < 0.05$; сравнение с реакцией на импульсы длительностью 1.0 мс: # - $p < 0.05$.

блок проведения охватывает 60-70% С-волокон и сохраняется значительно дольше, по-видимому, обладая селективностью по отношению к С-афферентам (Chen et al., 1999; Gibson et al., 1982; Lin et al., 2013).

В проведенных опытах после контрольной стимуляции левого субдиафрагмального блуждающего нерва на его желудочную ветвь каудальнее раздражающих электродов апплицировали раствор КАПС (33 мМ, 10% Tween-этанол, 10 мин). По окончании аппликации участок нерва, подвергшийся воздействию, промывали физиологическим раствором при 37 °С. После этого в течение 35 мин изменений базальной секреции H^+ , HCO_3^- и пепсиногена не происходило (Рис. 38, 39). Затем при повторной стимуляции нерва импульсами длительностью 0.1 либо 1.0 мс наблюдалось ослабление секреции H^+ и HCO_3^- , что подтверждено статистическими сравнениями удельной продукции. Спустя 90 мин после действия КАПС, вагусная секреция кислоты и пепсиногена независимо от длительности раздражающего стимула восстанавливалась полностью, т.к. удельная продукция достоверно не отличалась от контрольных величин. Через 90 мин после отмывки КАПС вагусная продукция HCO_3^- , вызванная стимуляцией «быстро проводящей» группы С-волокон желудочной ветви вагуса, не восстанавливалась по сравнению с контрольными значениями ($p < 0.01$, $n = 10 \sim 6$; Рис. 38 Б). Однако в этот период наблюдалось частичное восстановление удельной продукции HCO_3^- , вызванной активацией «быстро» и «медленно проводящих» С-волокон вагуса (В+С1+С2). Полного восстановления секреторной реакции не происходило, и удельная продукция HCO_3^- равнялась примерно 50% от контрольных значений ($p < 0.05$, $n = 11 \sim 7$; Рис. 39 Б).

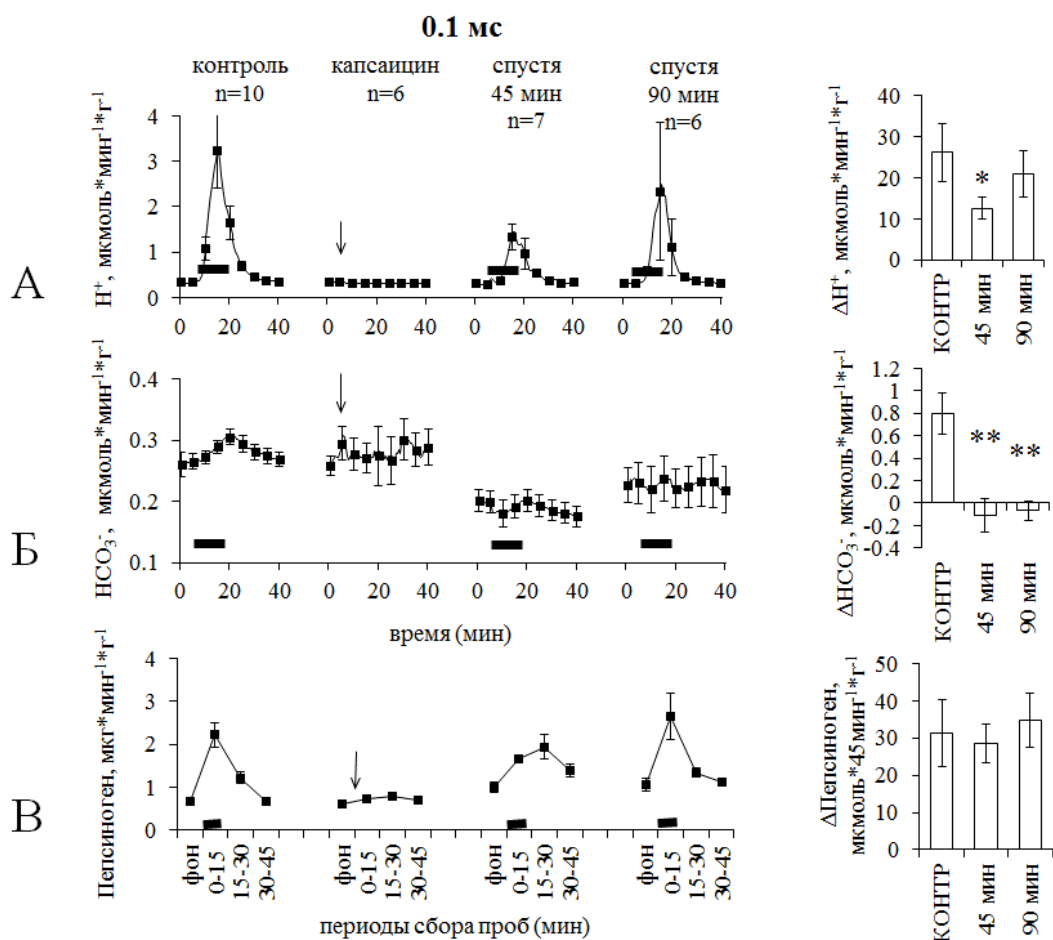


Рис. 38. Влияние блокады проведения нервного импульса в С-волокнах с помощью капсаицина на вызванную электрическим раздражением (0.1 мс, 6 В, 8 Гц, 10 мин) левого субдиафрагмального блуждающего нерва желудочную секрецию кислоты (А), бикарбонатов (Б) и пепсиногена (С). Регистрация секреторной реакции в контроле (КОНТР), а также спустя 45 и 90 мин после перивагальной аппликации капсаицина.

Слева на фрагментах – скорость секреции, справа – удельная продукция. Период раздражения нерва отмечен полосой на графиках, начало аппликации капсаицина (33 мМ, 10 % Tween/этанол) – стрелкой. Статистические сравнения с контрольными значениями проведены с помощью теста Манна-Уитни: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$.

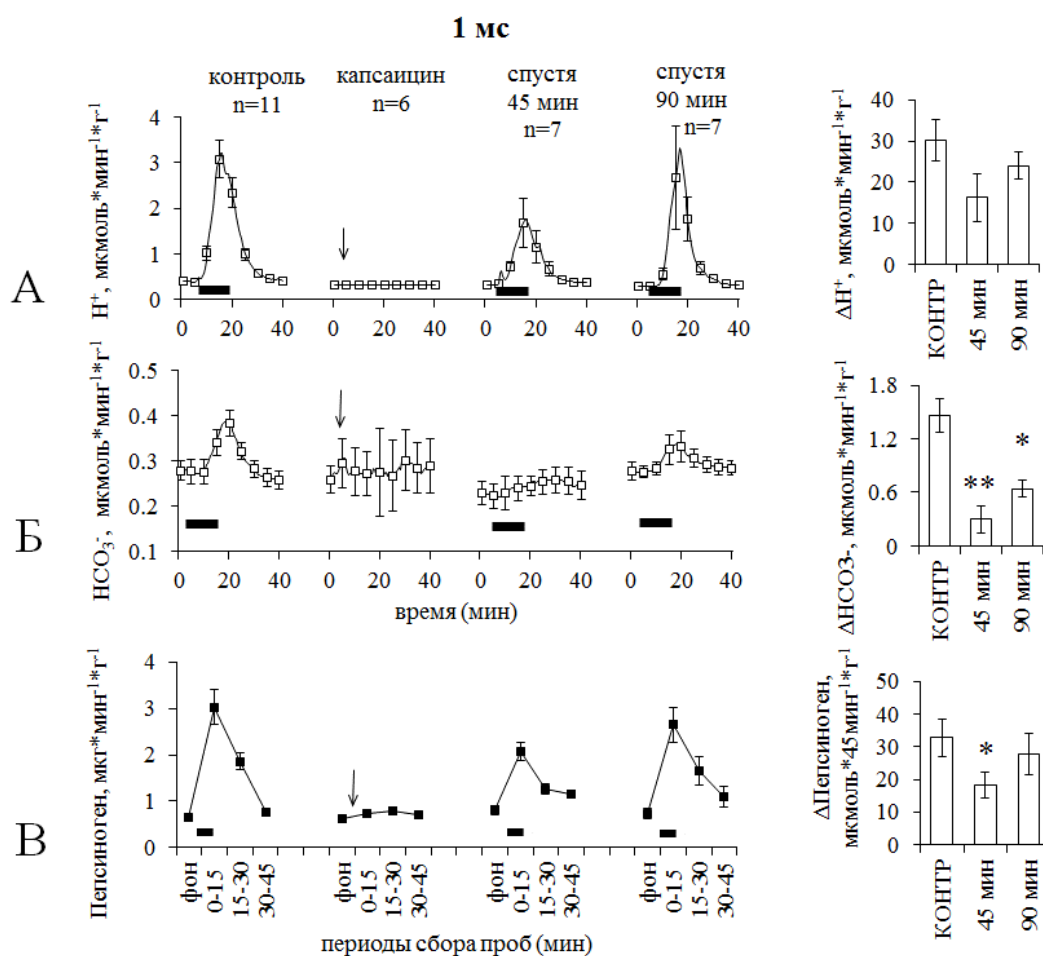


Рис. 39. Влияние блокады проведения нервного импульса в С-волокнах с помощью капсаицина на вызванную электрическим раздражением (1.0 мс, 6 В, 8 Гц, 10 мин) левого субдиафрагмального блуждающего нерва желудочную секрецию кислоты (А), бикарбонатов (Б) и пепсиногена (С). Регистрация секреторной реакции в контроле (КОНТР), а также спустя 45 и 90 мин после перивагальной аппликации капсаицина.

Слева на фрагментах – скорость секреции, справа – удельная продукция. Период раздражения нерва отмечен полосой на графиках, начало аппликации капсаицина (33 мМ, 10 % Tween/этанол) – стрелкой. Статистические сравнения с контрольными значениями проведены с помощью теста Манна-Уитни: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$.

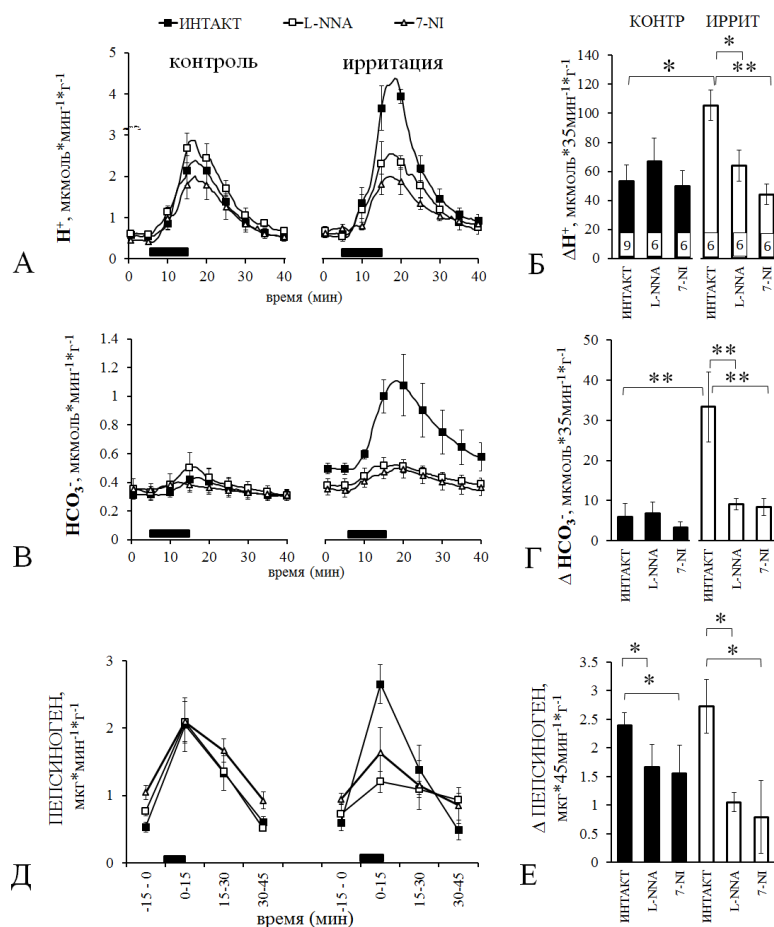


Рис. 40. Влияние слабой ирритации СОЖ на желудочную секрецию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена, вызванную электрическим раздражением блуждающего нерва. Эффект блокаторов NOS: N ω -нитро-L-аргинина (L-NNA) и 7-нитроиндазола (7-NI). На графиках А, В, Д - скорость секреции, Б, Г, Е - удельная продукция.

Контрольная стимуляция (КОНТР) производилась на фоне полостной перфузии желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl, pH 4.0). Слабая ирритация (ИРРИТ) достигалась при перфузии гипертоническим раствором (500 mM NaCl, pH 3.0). Период стимуляции дистального отрезка децентрализованного левого субдиафрагмального вагуса (10 В, 2 мс, 10 Гц, 5 мин) отмечен полосой на графиках А, В, Д. L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг, в.в.) инъецировались за 15 мин до начала раздражения нерва. Интактным животным (ИНТАКТ) вводили равный объем 0.1% DMSO.

Статистические сравнения скоростей секреции и удельной продукции (Приложение 2, Табл. 14) произведены с помощью 3-х и 2-х факторного дисперсионного анализа, соответственно. Для множественных сравнений использован тест Фишера LSD: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Размер выборок указан на столбцах гистограммы Б.

3.6.4 Слабая ирритация слизистой оболочки желудка потенцирует секрецию, вызванную раздражением вагуса, роль нитреергического и простагландинового опосредования

В условиях физиологической нормы вагусные воздействия на секреторный аппарат желудка происходят на фоне меняющегося химического состава в полости органа. В связи с этим в представленных ниже экспериментах сравнивали эффекты раздражения блуждающего нерва в контроле при перфузии полости желудка изотоническим раствором низкой кислотности (154 mM NaCl, pH 4.0) или на фоне ирритации, при перфузии подкисленным гипертоническим раствором (500 mM NaCl, pH 3.0). Показано, что слабая ирритация СОЖ сопровождалась почти 2-х кратным увеличением удельной продукции кислоты, стимулированной вагусом (Рис. 40Б; $p < 0.05$, $n = 9 \sim 6$; тест Фишера LSD), и примерно 5-ти кратным ростом продукции бикарбонатов (Рис. 40Г; $p < 0.01$, $n = 9 \sim 6$; тест Фишера LSD). Изменений вагусной продукции пепсиногена при этом не наблюдали (Рис. 40Е).

Блокада изоформ конститутивной NOS с помощью L-NNA или 7-NI в равной степени приводила к ослаблению вагусной секреции кислоты и HCO_3^- , причем эффект блокаторов проявлялся только на фоне ирритации СОЖ (Рис. 40; Приложение 1, Табл. 14), а при перфузии полости желудка изотоническим раствором низкой кислотности действие блокаторов не выявлялось (Рис. 40 А-Г). Удельная продукция пепсиногена, вызванная стимуляцией вагуса, существенно снижалась в присутствии L-NNA либо 7-NI, как в контрольных опытах, так и при ирритации СОЖ (Рис. 40 Д, Е).

Раздражение блуждающего нерва вызывает кратковременное увеличение кислотности в полости желудка до $\text{pH} \leq 2.0$, что может быть дополнительным стимулом продукции NO и ПГ в слизистой оболочке. Чтобы оценить влияние эндогенной кислоты на вагусную секрецию бикарбонатов и пепсиногена, были проведены эксперименты с блокадой H^+ , K^+ -АТФазы омепразолом. На рисунке 41А-Г показано, что подавление секреции кислоты

не влияло на вагусную продукцию HCO_3^- , но провоцировало значительное увеличение продукции пепсиногена, как в контроле, так и на фоне ирритации (Рис. 41 Д, Е).

Влияние неселективного блокатора циклооксигеназ индометацина (ИНД) на анализируемые показатели желудочной секреции отчетливо проявилось в контрольных опытах при перфузии полости желудка изотоническим раствором рН 4.0. В частности, после инъекции ИНД наблюдали достоверное увеличение вагусной продукции H^+ , HCO_3^- и пепсиногена. На фоне слабой ирритации ИНД не действовал на продукцию H^+ , HCO_3^- (Рис. 42 А-Г). В то же время и на фоне ирритации ИНД сохранял влияние, хотя и ослабленное, на продукцию пепсиногена (Рис. 42 Д, Е).

Описанные в этом разделе эксперименты в целом показали следующее.

- 1) Желудочная секреция как ульцерогенных (H^+ и пепсиноген), так и протективных (HCO_3^-) факторов, вызванная электрической стимуляцией вагуса, полностью зависит от N- и M-холинергической передачи. При этом вагусная и пентагастриновая стимуляция секреции H^+ , опосредуется продукцией гистамина, от которой не зависит секреция HCO_3^- и пепсиногена.
- 2) Продукция H^+ и пепсиногена с одной стороны и HCO_3^- с другой регулируется не полностью перекрывающимися группами нервных волокон в желудочных ветвях нерва. Вагусная секреция HCO_3^- , в отличие от продукции H^+ и пепсиногена, отчасти потенцируется на периферии капсаицин-чувствительными афферентными волокнами.
- 3) Слабая ирритация СОЖ потенцирует вагусную секрецию H^+ и HCO_3^- , но не влияет на секрецию пепсиногена. Эффект ирритации угнетается в равной мере как L-NNA, так и 7-NI. Потенциация вагусной секреции HCO_3^- на фоне ирритации не зависит от собственной продукции кислоты в желудке.

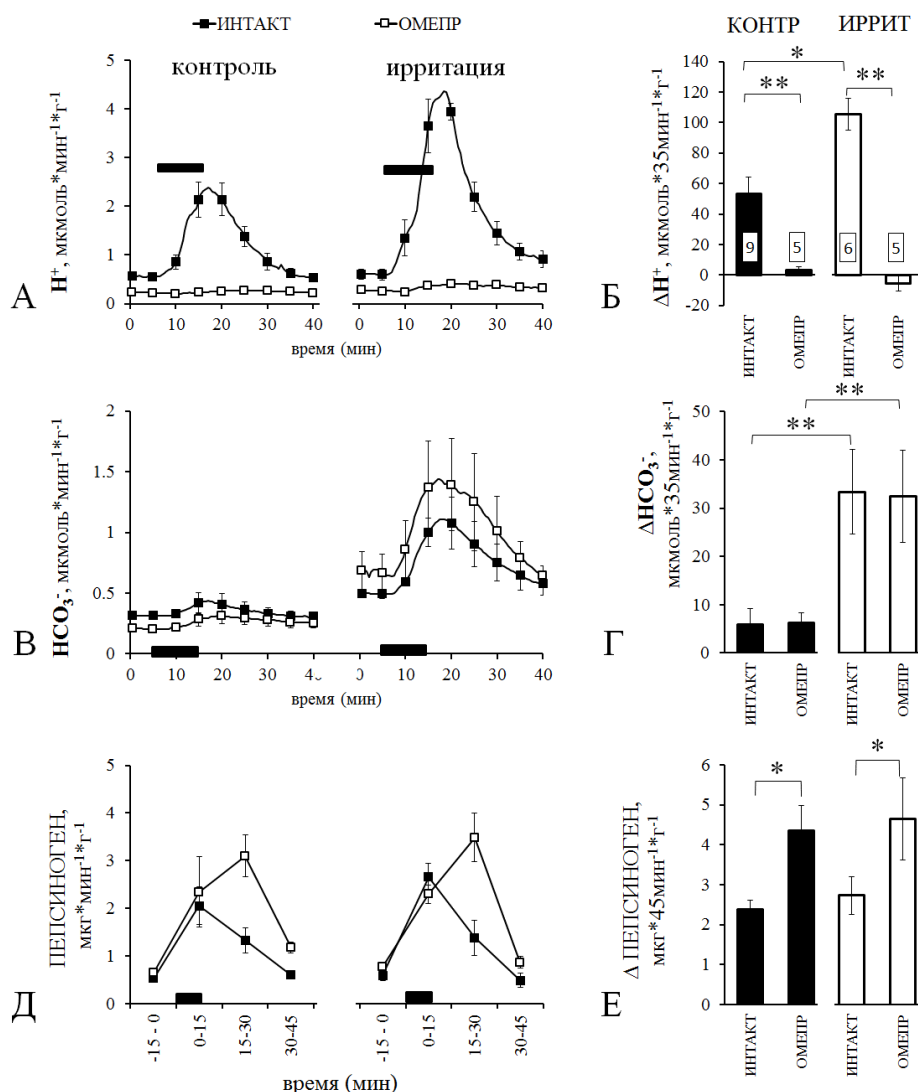


Рис. 41. Влияние слабой ирритации СОЖ на желудочную секрецию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена, вызванную электрическим раздражением блуждающего нерва. Эффект омепразола. А, В, Д - скорость секреции, Б, Г, Е - удельная продукция.

Контрольные воздействия (КОНТР) производили на фоне полостной перфузии желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl, pH 4.0). Ирритация (ИРРИТ): перфузия гипертоническим раствором (500 mM NaCl, pH 3.0). Период стимуляции дистального отрезка децентрализованного левого субдиафрагмального вагуса (10 В, 2 мс, 10 Гц, 5 мин) отмечен полосой на графиках А, В, Д. Омепразол инъецировали дважды в дозе 10 мг/кг: за 18 часов до эксперимента подкожно и за 50 мин до стимуляции нерва (в.в.). Статистические сравнения проведены с помощью критерия Манна-Уитни: * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$. Размер выборок указан на столбцах гистограммы Б.

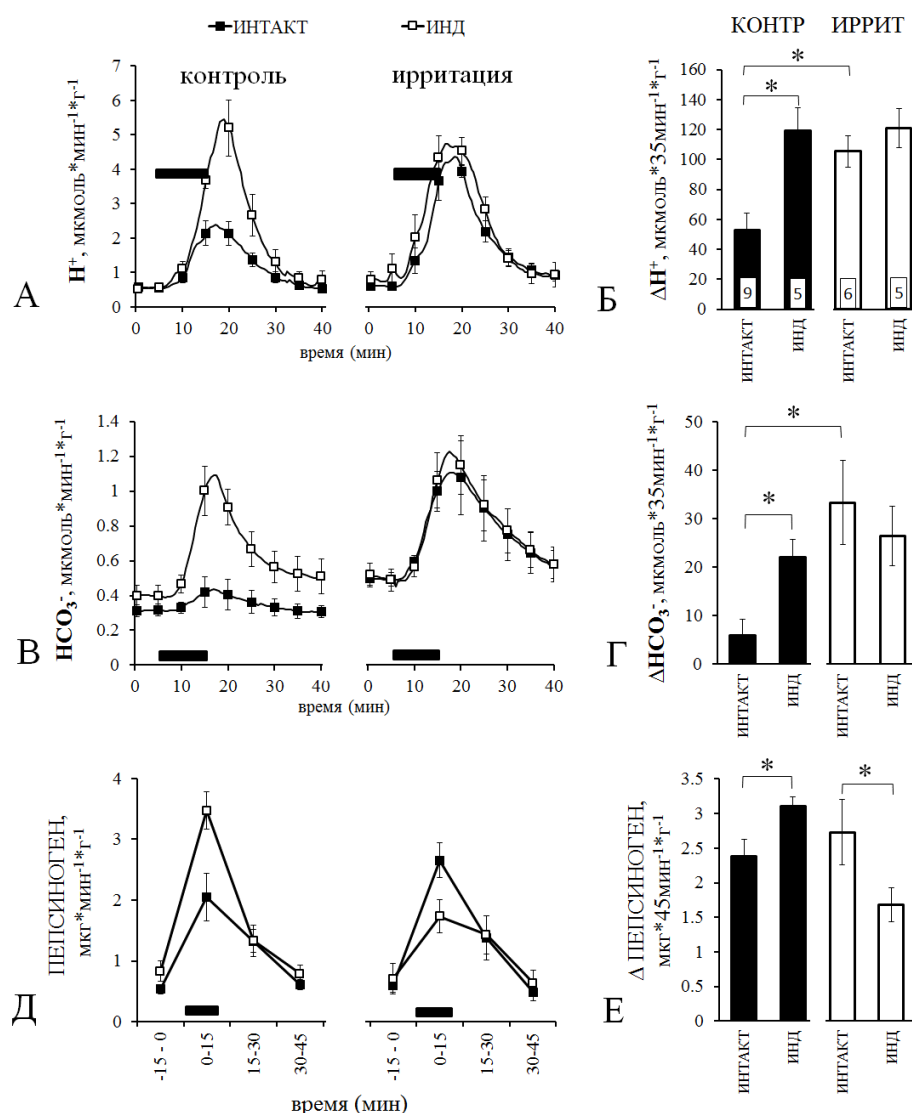


Рис. 42. Влияние слабой ирритации СОЖ на желудочную секрецию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена, вызванную электрическим раздражением блуждающего нерва. Эффект индометацина (ИНД). На графиках А, В, Д - скорость секреции, Б, Г, Е - удельная продукция.

Контрольные воздействия (КОНТР) производили на фоне полостной перфузии желудка изотоническим раствором (154 mM NaCl, pH 4.0). Ирритация (ИРРИТ): перфузия гипертоническим раствором (500 mM NaCl, pH 3.0). Период стимуляции дистального отрезка децентрализованного левого субдиафрагмального вагуса (10 В, 2 мс, 10 Гц, 5 мин) отмечен полосой на графиках А, В, Д. ИНД (5 мг/кг, в.в.) инъецировали за 15 мин до начала раздражения нерва. Интактным животным (ИНТАКТ) вводили равный объем 0.1% DMSO. Статистические сравнения проведены с помощью критерия Манна-Уитни: * - $p < 0.05$. Размер выборок указан на столбцах гистограммы Б.

4. ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

4.1. Ирритация – постоянный фактор пищеварения

Агрессивная полостная среда в желудке активирует гастропротективные процессы, реализующиеся через изменения кровотока в подслизистом слое, экзокринной и эндокринной секреции желудочных желез, и нейтрализующей способности преэпителиального слоя слизи. В фундаментальных исследованиях адаптивные реакции стимулировали, непродолжительно воздействуя на СОЖ некротизирующими агентами в супрамаксимальной концентрации: соляной кислотой (0.6-1 N), гиперосмотическим раствором (1-2 M NaCl), таурохолевой кислотой (5 mM), раствором щелочи (0.2 N NaOH), либо 20% этанолом (Robert et al., 1983; Takeuchi et al., 2001a). За рамками изучения при этом оставалось влияние естественного химического фона, который сопровождает пищеварение, в частности эффекты полостной кислотности (pH 2.0) и осмотического давления.

Первую и в норме достаточную линию защиты от кислоты в полости желудка образует преэпителиальный слой слизи. Присутствующие в слое слизи в сравнительно небольшой концентрации ионы бикарбоната нейтрализуют диффундирующую из полости желудка кислоту, в результате чего возникает значительный градиент pH между кислой средой на границе слизи и полости желудка и нейтральной реакцией у поверхности эпителия (Allen, Flemstrom, 2005; Williams, Turnberg, 1981). Именно регуляции желудочной секреции HCO_3^- , как недостаточно полно изученной протективной реакции, было уделено основное внимание в проведенном исследовании. При этом сдвиги в продукции других компонентов желудочного секрета, кислоты и пепсиногена, также рассматривались, хотя их следует отнести к факторам агрессии. В частности, известно, что на фоне высокой концентрации пепсина развиваются особенно тяжелые поражения, для которых характерно разрушение пристеночного слоя слизи на обширных

участках эпителия, а также нарушение реэпитализации и формирования мукоидного купола над местом поражения (Allen et al., 1986; Silen, Ito 1985; Sellers et al., 1987).

Проведенное исследование имеет методические особенности, существенные для более полного раскрытия механизмов защиты СОЖ. Здесь впервые при изучении адаптивной гастропротекции применена техника, позволяющая регистрировать секрецию бикарбонатов на фоне естественной продукции кислоты в желудке (нормацидное состояние). Для этого концентрация HCO_3^- рассчитывалась на основе измерения в полостном перфузате pH и PCO_2 (Garner et al., 1984; Золотарев и др. 1996). В предшествующих работах других авторов желудочная продукция HCO_3^- оценивалась с помощью обратного титрования, для чего требовалась фармакологическая блокада эндогенной секреции кислоты.

4.1.1 Секреция HCO_3^- в желудке возникает в ответ на колебания полостной кислотности и осмотического давления в физиологических пределах

Полученные на основе измерений pH/ PCO_2 результаты впервые показали, что физиологический уровень кислотности в желудке бодрствующих крыс является достаточным стимулом для усиления секреции HCO_3^- . Ослабление секреции кислоты под действием ОМЕ (гипоацидное состояние) сопровождалось значительным уменьшением базальной секреции HCO_3^- (Рис. 5А, Б). На фоне ИПП искусственное увеличение кислотности до величин, сопоставимых с показателями секреции у бодрствующих животных (pH 2.0), усиливало продукцию HCO_3^- . Повышение осмотического давления в полости желудка также стимулировало секрецию HCO_3^- , реакция при этом была более выражена в присутствии кислоты (Рис. 5 А, В-Д). По данным литературы гиперосмолярность облегчает диффузию протонов к поверхности эпителия, причем такие ирританты, как гипертонический раствор NaCl, либо этанол в

дозе не вызывающей некроз не оказывают самостоятельного действия на секреторный аппарат желудка, но разрыхляют слизь и отслаивают ее с поверхности эпителия (Allen et al., 1986; Silen, Ito 1985). Относительно небольшие сдвиги полостной кислотности ($\text{pH} \leq 3$) на фоне повышенного осмотического давления перфузата потенцируют секрецию HCO_3^- в том числе у наркотизированных животных (Рис. 7).

Одновременная с регистрацией секреции HCO_3^- оценка секреции H^+ и пепсиногена продемонстрировали влияние ирритации на базальную (натощак) секрецию в желудке. У бодрствующих крыс подтверждено описанное ранее угнетение собственной секреции H^+ в ответ на аппликацию экзогенной кислоты и при увеличении осмотического давления (Рис. 4). Кроме того, установлено, что ирритация оказывала двухфазное действие на продукцию пепсиногена. Кратковременное ослабление секреции сменялось небольшим усилением. При этом секреция пепсиногена не изменялась при умеренной искусственной ацидификации ($\text{pH} 2$), что полностью соответствует данным литературы (Puurunen, Westermann, 1978), но после частичной деструкции слоя слизи гиперосмолярным раствором происходило увеличение продукции пепсиногена в ответ на повышение кислотности желудочного содержимого (Рис. 6).

4.1.2 Реакция на ирритацию зависит от градиента pH на поверхности желудочного эпителия

В представленной работе затронут практически неизученный вопрос о роли эндогенной секреции кислоты в реакциях адаптивной гастропротекции, в частности, как блокада H^+ , K^+ -АТФазы влияет на базальную либо вызванную ирритацией СОЖ секрецию HCO_3^- и пепсиногена. У бодрствующих животных блокада протонного насоса с помощью ОМЕ сопровождалась значительным ослаблением базальной секреции HCO_3^- при относительно стабильной секреции пепсиногена. С другой стороны, на фоне ИПП увеличивались как

[Type here]

абсолютная, так и относительная секреция HCO_3^- и пепсиногена, вызванная инфузией экзогенной кислоты в желудок.

Ингибиторы протонного насоса - класс препаратов, наиболее часто назначаемых для лечения кислотозависимых заболеваний ЖКТ, характеризующихся большой избирательностью действия и минимальными побочными эффектами (Thomson et al., 2010). В то же время исчезновение такого важного интегрирующего фактора как кислая среда в полости желудка неизбежно влечет за собой физиологические сдвиги, которые могут влиять на непариетальную секрецию. В частности, в результате снижения секреторной активности обкладочных клеток исчезает градиент pH в преэпителиальном слое слизи (Allen, Flemström, 2005) и ослабевает «щелочной прилив», что приводит к уменьшению концентрации бикарбонатов в подслизистом слое (Niv, Fraser, 2002). Известно также, что прием ИПП сопровождается умеренной гипергастринемией (Thomson et al., 2010). Кроме того, в клинических исследованиях, а также на животных *ex vivo* показано, что под действием ИПП увеличивается парацеллюлярный транспорт через СОЖ как неполярных, так и полярных молекул весом до 4 kDa в обоих направлениях (Gabello et al., 2010; Murray et al., 2009).

Проведенные эксперименты дали возможность оценить роль перечисленных процессов, связанных с подавлением секреции H^+ , в реакции на ирританты. Наиболее вероятной причиной потенциации эффекта слабых ирритантов на секрецию HCO_3^- и пепсиногена на фоне ОМЕ было уменьшение градиента pH в слое слизи. Градиент pH, который в значительной мере нивелирует колебания кислотности у апикальной поверхности эпителия, находится в прямой зависимости от концентрации кислоты в полости желудка. До тех пор, пока в полости органа сохраняется высокая концентрация кислоты (pH 1-3), у поверхности эпителия поддерживается практически нейтральная реакция. При уменьшении полостной кислотности (pH 3-4) нейтральная реакция у апикальных мембран сдвигается в кислую сторону, а при полостном

$\text{pH} > 5.0$ происходит извращение градиента, т.е. у поверхности эпителия реакция становится более кислой, чем в полости желудка (Chu et al., 1999; Coskun et al., 2001; Phillipson et al., 2002). Следовательно, когда на фоне ИПП исчезает градиент pH в слое слизи, аппликация тех же концентраций экзогенной кислоты приводит к более существенным сдвигам кислотности в непосредственной близости от эпителиальных клеток, что стимулирует дополнительную продукцию паракринных факторов, в частности ПГ, КГРП и NO. Эта простая причинно-следственная связь проверялась в данной работе на наркотизированных животных, у которых на фоне ОМЕ градиент pH в слое слизи поддерживался искусственно с помощью перфузии желудка изотоническим растворами pH 3.0, либо 4.0. Получено, что смещение кислотности в полости желудка с pH 4.0 до pH 2.0 провоцировал большую продукцию HCO_3^- и пепсиногена, чем при сдвиг pH с 3.0 до 2.0 (Рис. 7 А, В; Рис. 8).

Облегчение парацеллюлярного транспорта через СОЖ, сопровождающее, как известно из литературы, действие ИПП (Gabello et al., 2010; Murray et al., 2009), в проведенных экспериментах существенно не влияло на потенциацию секреции HCO_3^- , т.к. системное введение NaHCO_3 не сопровождалось ростом внутрижелудочной концентрации HCO_3^- ни в нормацидном состоянии, ни на фоне ОМЕ (Рис. 20). Усиление секреции бикарбонатов на фоне ИПП нельзя также связать с гипергастринемией. Секреция бикарбонатов в желудке не зависела от уровня гастрина, хотя на секрецию главных клеток гастрин оказывал сильное стимулирующее действие (Рис. 36).

Таким образом, в опытах как на бодрствующих, так и на наркотизированных животных с использованием метода непрерывной регистрации pH/PCO_2 впервые показано, что для запуска реакций адаптивной гастропротекции достаточно повышения кислотности и осмолярности в полости желудка в физиологических пределах близких показателям пищеварения. При этом блокада эндогенной продукции кислоты в желудке

усиливает активирующее действие слабых ирритантов на секрецию HCO_3^- и пепсиногена, причиной чего следует считать уменьшение градиента pH в презепителиальном слое слизи, приводящее к повышению чувствительности эпителия и субэпителиальных структур к экзогенной кислоте.

4.2 Роль изоформ конститутивной синтазы оксида азота в управлении желудочной секрецией на фоне слабой ирритации СОЖ

Полостная аппликация ирритантов приводит к быстрому локальному увеличению концентрации паракринных факторов (прежде всего, ПГ и NO). В настоящее время роль ПГ в реакциях адаптивной гастропротекции изучена достаточно подробно (Takeuchi et al., 2010b). Также сформировалось четкое представление об участии NO в управлении желудочной секрецией кислоты и пепсиногена (Berg et al., 2004, 2005; Kim, Kim, 1996; Hasebe et al., 2005; Fiorucci et al., 1995a; Garcia-Vitoria et al., 2000; Raufman, 1992). Роль эндогенного NO в регуляции желудочной секреции бикарбонатов, тем не менее остается малоизученной и отчасти спорной.

4.2.1 Изоформы cNOS оказывают разнонаправленное действие на желудочную секрецию кислоты, бикарбонатов и пепсиногена в покое и на фоне ирритации СОЖ

Поскольку влияние эндогенного NO на желудочную секрецию HCO_3^- по данным литературы не очевидно, в работе впервые рассмотрена гипотеза, предполагающая, что изоформы cNOS различаются по своему действию на секрецию бикарбонатов, что связано с особенностями их локализации в тканях органа. Специфичность действия eNOS и nNOS на состояние защитного бикарбонатного барьера и продукцию пепсиногена в желудке ранее не была установлена.

Для оценки активности изоформ cNOS, в том числе в условиях раздражения слизистой оболочки подкисленным гипертоническим раствором,

[Type here]

в одних и тех же экспериментальных условиях сравнивали действие селективного и неселективного блокаторов cNOS (7-NI и L-NNA), примененных в наковой дозе близкой к EC50. В качестве неселективного блокатора, имеющего практически одинаковую аффинность к eNOS и nNOS, был применен структурный аналог L-аргинина, L-NNA (Southan, Szabó, 1996). Ранее при изучении секреции HCO_3^- в желудке и ДПК использовался только этот класс неселективных блокаторов cNOS (Takeuchi et al., 1994b, 1996, 2015; Aihara et al., 2005b, 2006; Sugamoto et al., 2001), поэтому применение в работе L-NNA было необходимым для корректного сопоставления полученных результатов с литературными. В качестве селективного *in vivo* блокатора nNOS впервые в исследованиях желудочной секреции был использован 7-нитроиндазол (Babbedge et al., 1993; Moore et al., 1993).

Интерпретация полученных результатов основывается на том, что L-NNA и 7-NI характеризуются сходной фармакодинамикой и фармакокинетикой (Bush, Pollack, 2001; Víteček et al., 2012). Это дает возможность представить эффект блокады eNOS теоретически. Приняв, что eNOS и nNOS действуют независимо и аддитивно (поскольку противоположные сведения неизвестны), и имея независимые выборки данных, полученные при использовании одинаковых доз блокатора, эффект угнетения eNOS оценивали как разность между эффектами L-NNA (A) и 7-NI (B). Алгебраическое сложение этой разности, нормированной на контрольные значения (в %), с контрольным уровнем (100%) дает теоретическую величину реакции при избирательном угнетении eNOS (Рис. 43-45). Статистическая достоверность различий между рассчитанной величиной реакции при блокаде eNOS и контролем может быть формально установлена путем сравнения разности (A-B) с нулем.

В целом результаты экспериментов и проведенная на их основе теоретическая оценка блокады eNOS показали, что селективное угнетение эндотелиальной либо нейрональной изоформы NOS оказывает разнонаправленное действие на желудочную секрецию бикарбонатов, как

базальную, так и вызванную раздражением. При сохраненной собственной секреции кислоты 7-NI (10 мг/кг в.в.), угнетающий *n*NOS *in vivo*, ослаблял базальную секрецию HCO_3^- и подавлял продукцию HCO_3^- при раздражении СОЖ (Рис. 43, А, Б). В аналогичных условиях неселективная блокада обеих изоформ конститутивной NOS с помощью такой же дозы L-NNA (10 мг/кг в.в.) не привела к достоверному сдвигу базальной и стимулированной раздражением секреции HCO_3^- . Более того, в присутствии L-NNA происходило увеличение примерно на 20% удельной продукции HCO_3^- , которое все же не достигало уровня статистической достоверности (Рис. 9 В, Рис. 43Б). Интересно, что усиление базальной секреции HCO_3^- в желудке под действием L-NAME и ее ослабление после аппликации доноров NO было описано ранее (Takeuchi et al., 1999).

Вычитание эффекта 7-NI из эффекта L-NNA, как предложено выше, дало разность достоверно больше нуля, что позволяет считать продукцию HCO_3^- при избирательном подавлении *e*NOS увеличившейся. Рассчитанная базальная продукция HCO_3^- также вырастала при угнетении *e*NOS, но недостоверно (Рис. 43 А, Б). Исходя из этого, активация *e*NOS теоретически сопровождается ослаблением стимулированной продукции HCO_3^- . В то же время экспериментально доказано, что активация *n*NOS приводит к увеличению продукции HCO_3^- , причем действие NO опосредуется растворимой ГЦ-I (Рис. 15). Вполне очевидно, что конститутивные NOS присутствуют во всех органах, в том числе оказывающих влияние на желудочную секрецию. В проведенной работе доказано, что раздражение СОЖ действует преимущественно через изоформы *s*NOS локализованные интрамурально. В условиях двухсторонней субдиафрагмальной ваготомии аппликация в спланхнический кровоток L-NNA и 7-NI в дозе на порядок меньшей (1 мг/кг), чем при системном введении, вызывала изменения продукции HCO_3^- , полностью сопоставимые с описанными выше (Рис. 10; Рис. 43 В,Г).

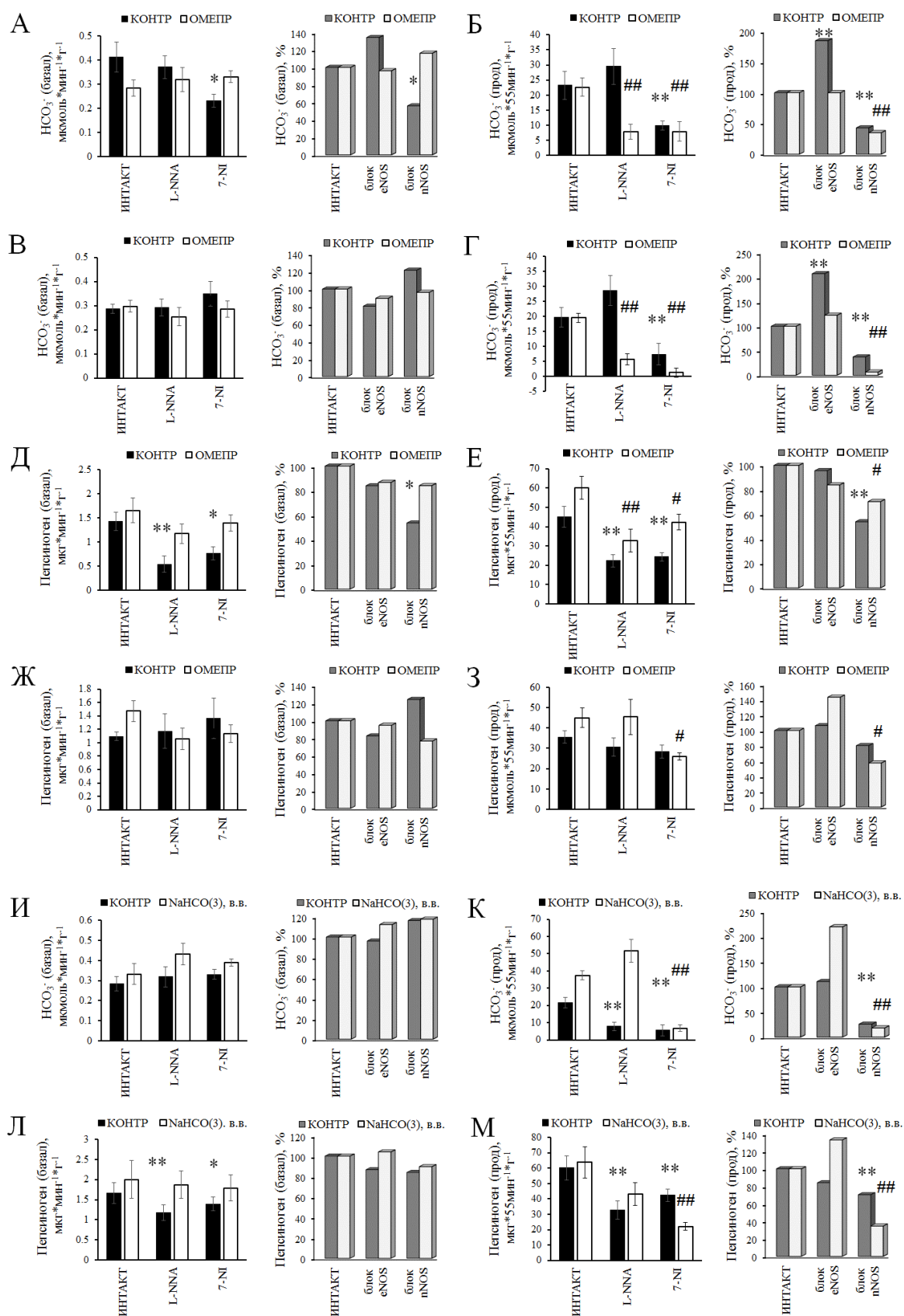


Рис. 43.

[Type here]

Рис. 43. Влияние блокады nNOS и eNOS на желудочную секрецию бикарбонатов и пепсиногена в базальных условиях и на их продукцию, вызванную раздражением слизистой оболочки. На гистограммах слева: абсолютные значения базальной секреции или продукции; справа: рассчитанные относительные значения секреции или продукции в % от контрольных значений.

Уровень относительной секреции/продукции при блокаде eNOS рассчитывался как разность показателей на фоне инъекции L-NNA и 7-NI (подробности см. в п. 4.2.1). Относительная эффективность блокады nNOS вычислялась путем нормирования реакции в присутствии 7-NI на контрольные значения. Уровень реакции при интактной (ИНТАКТ) NOS принят за 100%.

А, Б) Влияние блокады nNOS и eNOS на базальную секрецию HCO_3^- (А) и стимулированную раздражением СОЖ удельную продукцию HCO_3^- (Б) на фоне системного введения блокаторов 7-NI и L-NNA (10 мг/кг, в.в.) в нормацидном состоянии (КОНТР) и в присутствии омепразола (ОМЕПР).

В, Г) Влияние блокады nNOS и eNOS на базальную секрецию HCO_3^- (В) и стимулированную раздражением СОЖ удельную продукцию HCO_3^- (Г) при ретроградной инъекции в чревную артерию блокаторов 7-NI и L-NNA (1 мг/кг, в.а.) в нормацидном состоянии (КОНТР) и на фоне омепразола (ОМЕПР).

Д, Е) Влияние блокады nNOS и eNOS на базальную секрецию (Д) и продукцию пепсиногена при раздражении СОЖ (Е) на фоне системного введения блокаторов 7-NI и L-NNA (10 мг/кг, в.в.) в нормацидном состоянии (КОНТР) и в присутствии омепразола (ОМЕПР).

Ж, З) Влияние блокады nNOS и eNOS на базальную секрецию пепсиногена (Ж) и продукцию пепсиногена при раздражении СОЖ (З) после ретроградной инъекции в чревную артерию блокаторов 7-NI и L-NNA (1 мг/кг, в.а.) в нормацидном состоянии (КОНТР) и на фоне омепразола (ОМЕПР).

И, К) Влияние блокады nNOS и eNOS на базальную секрецию HCO_3^- (И) и стимулированную раздражением СОЖ удельную продукцию HCO_3^- (К) при системном введении блокаторов 7-NI и L-NNA (10 мг/кг, в.в.) при нормальном уровне бикарбонатов в плазме крови в условиях физиологического покоя (КОНТР) и на фоне в.в. инфузии NaHCO_3 ; воздействие в присутствии омепразола.

Л, М) Влияние блокады nNOS и eNOS на базальную секрецию пепсиногена (Л) и стимулированную раздражением СОЖ суммарную продукцию пепсиногена (М) при системном введении блокаторов 7-NI и L-NNA (10 мг/кг, в.в.) при нормальном уровне бикарбонатов в плазме крови в условиях физиологического покоя (КОНТР) и на фоне в.в. инфузии NaHCO_3 ; воздействие в присутствии омепразола.

Эксперименты на крысах под наркозом. Раздражение СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 М NaCl, pH 2.0) в течение 20 мин. Системная инфузия NaHCO_3^- ($10 \text{ ммоль}^{-1} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$, в.в.) в течение 20 мин. Блокаторы NOS, 7-NI и L-NNA, инъектировали за 15 мин до раздражения. Контрольным группам вводили DMSO (0.1%, 0.3 мл, в.в.). Омепразол (10 мг/кг) инъектировали за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин до аппликации раздражителя (в.в.).

Статистические сравнения с показателями при интактной NOS между абсолютными величинами, а также между относительными величинами при блокаде nNOS проведены с помощью теста Фишера (LSD). Различия относительных значений секреции при блокаде eNOS и контрольных выявлялось путем сравнения разности секреторных реакций на фоне L-NNA и 7-NI с нулем. Сравнение с соответствующим контролем: *, # - $p < 0.05$; **, ## - $p < 0.01$.

Оксид азота играет заметную роль в поддержании уровня кислотности и пепсиногена в желудке, причем и в этом случае последствия активации нейрональной и эндотелиальная изоформ cNOS различаются. Проведенное исследование показало, что принимающая участие в усилении базальной секреции кислоты cNOS локализуется интрамурально, Блокада nNOS приводила к ослаблению секреции H^+ , но воздействие на eNOS эффекта не имело. Эти данные находят подтверждение в литературе, описывающей разнонаправленные действия NO на желудочную секрецию кислоты на клеточном и системном уровне. Известно, что несмотря на низкую активность NOS в обкладочных клетках (Brown et al., 1992a), NO через цГМФ тормозит продукцию H^+ (Berg et al., 2005). С другой стороны, эндогенный NO может усиливать секрецию H^+ , стимулируя продукцию гистамина в ECL-клетках (Hasebe et al., 2005). Сведения о роли NO в центральных механизмах регуляции продукции кислоты не менее противоречивы. Эндогенный NO тормозит секрецию кислоты, вызванную растяжением желудка либо инъекцией 2-дезоксид-D-глюкозы (Kitamura et al., 1999), но у бодрствующих собак NO стимулирует желудочную секрецию H^+ и гастрина (Bilski et al., 1994).

Секреция пепсиногена может быть связана с продукцией NO в самих главных клетках, что подтверждается подавлением в присутствии L-NMMA базального и активированного карбохолином образования цитруллина в культуре клеток (Fiorucci et al., 1995a). Полученные результаты позволяют уточнить, что основную роль в усилении продукции пепсиногена в ответ на внутрижелудочную аппликацию ирритантов играет нейрональная изоформа NOS (Рис. 11; Рис. 12; Рис. 43 Д-3).

4.2.2 Действие изоформ cNOS на секрецию HCO_3^- зависит от эндогенной продукции кислоты и концентрации бикарбонатов в желудочном кровотоке

Приоритетным результатом исследования стала демонстрация зависимости эффекта неселективного блокатора cNOS (L-NNA) на желудочную продукцию HCO_3^- от уровня секреции кислоты и отсутствие такой зависимости для действия 7-NI (Золотарев и др. 2012; Золотарев, Хропычева, 2012). У наркотизированных животных уровень базальной секреции кислоты в желудке остается достаточно высоким, но после блокады H^+ , K^+ -АТФазы, сокращается более чем на 80%. Однако такое уменьшение полостной кислотности мало сказывалось на базальной секреции HCO_3^- (Рис. 9; Рис. 10; Рис. 43 Б, Г). С другой стороны, на фоне ОМЕ исчезали различия в действии L-NNA и 7-NI на продукцию HCO_3^- , вызванную ирритацией СОЖ. Введение L-NNA, как системное, так и локальное, в присутствии ОМЕ подавляло выброс HCO_3^- , в то время, как в нормацидном состоянии реакция на L-NNA была нейтральной. Расчёты показывают, что на фоне ОМЕ эффективность eNOS в управлении стимулированной секрецией HCO_3^- теоретически снижается до нуля (Рис. 43 Г). Угнетающее действие селективного блокатора pNOS (7-NI) на фоне ОМЕ оставалось неизменным (Рис. 9, 10).

В связи с этим экспериментально проверялась гипотеза о том, что прекращение реакции на блокаду eNOS в присутствии ОМЕ происходит вследствие уменьшения концентрации бикарбонатов в подслизистом слое, которое имеет место при ослаблении секреторной активности обкладочных клеток (Niv, Fraser, 2002). В своем классическом исследовании Т. Теорелл показал, что на каждый секретируемый в полость желудка протон приходится один ион HCO_3^- , направляющийся в подслизистый слой (Teorell, 1951). Поэтому, когда в канальцах обкладочных клеток концентрация H^+ достигает

150 мМ, локальная концентрация HCO_3^- в примыкающей базальной пластинке значительно превышает концентрацию в плазме крови. Следовательно, кровотоков в капиллярах подслизистого слоя, который направлен из глубоких участков к поверхности эпителия (Gannon et al., 1982), при активной секреции кислоты перемещает к базальной поверхности эпителиальных клеток дополнительную порцию бикарбонатов. Несмотря на обилие карбоангидраз в цитоплазме желудочных эпителиоцитов, синтез HCO_3^- *de novo* в самих клетках сравнительно невелик (Flemström, Sachs, 1975), и основным резервом для поддержания градиента рН преэпителиальном слое слизи являются бикарбонаты тканевой жидкости (Allen, Flemström, 2005; Phillipson et al., 2002).

Для оценки вклада изоформ cNOS в регуляцию транспорта HCO_3^- из подслизистого слоя на поверхность СОЖ в работе была решена задача адекватного моделирования «щелочного прилива», которая остается актуальной до сих пор, т.к. доступная литература не содержит расчетов необходимой для в.в. введения дозы NaHCO_3 . Проведенные на основе собственных экспериментальных данных (п. 3.3.1) расчёты дозы NaHCO_3 ($10 \text{ ммоль} \times \text{кг}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$, в.в.), с помощью которой на фоне ИПП симулировали колебания концентрации бикарбонатов в желудочном кровотоке при секреции кислоты, удовлетворительно совпали с ранее эмпирически принятой дозой $5 \text{ ммоль} \times \text{кг}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$ (Phillipson 2004).

На фоне кислотосупрессии внутривенное введение рассчитанной дозы NaHCO_3 существенно усиливало секрецию HCO_3^- , вызванную ирритацией. При сохраненной секреции кислоты дополнительное увеличение концентрации NaHCO_3 в желудочном кровотоке не оказало такого влияния (Рис. 21 А,В,Д). Можно полагать, что существует определенный диапазон концентрации HCO_3^- в подслизистом слое, который создает резерв бикарбонатов, доступный для переноса на поверхность эпителия в зависимости от степени ирритации СОЖ. Этот диапазон ограничен снизу

[Type here]

концентрацией HCO_3^- в плазме крови натошак, а сверху «щелочным приливом». Установлено, что парацеллюлярный транспорт не оказывал заметного влияния на трансэпителиальный перенос HCO_3^- . Полученные данные также позволили заключить, что активность анионных транспортеров в эпителиальных клетках не зависит от концентрации субстрата (HCO_3^-) в подслизистом слое, но меняется в ответ на паракринные сигналы. Последнее подтверждается тем, что сама по себе парентеральная инфузия NaHCO_3 не приводит к изменениям базальной секреции бикарбонатов ни в нормацидном, ни в гипоацидном состоянии (Рис. 20).

Экстраполяция данных, полученных на слюнных железах, почечных канальцах и протоках поджелудочной железы млекопитающих, позволяет считать, что активность анионных транспортеров в эпителиоцитах желудка определяется прежде всего pH среды (Aalkjaer et al., 2014; Реѝа-Münzenmayer et al., 2016), а также взаимодействием с внутриклеточными ферментативными каскадами, управляемыми цАМФ, карбохолином, инозитол-3-фосфатом, что достаточно полно описано для $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ котранспортеров (Aalkjaer et al., 2014; Thornell, Bevensee, 2015), т.е. существует прямое влияние медиаторов и паракринных факторов на работу переносчиков.

Новым результатом стала демонстрация действия неселективного блокатора cNOS (L-NNA) в зависимости от концентрации NaHCO_3 в желудочном кровотоке, что проявлялось при кислотосупрессии (Золотарев и др., 2017). Увеличение концентрации NaHCO_3 в кровеносных сосудах желудка на фоне ОМЕ отменяло угнетающее действие L-NNA по отношению к стимулированной ирритантами секреции HCO_3^- , напротив, можно было заметить примерно 20% увеличение продукции HCO_3^- , не достигавшее, однако, статистической значимости. В то же время инъекция 7-NI, селективного *in vivo* блокатора nNOS, по-прежнему сопровождалась ослаблением стимулированной ирритацией секреции HCO_3^- (Рис. 23 А,В). Расчеты показали, что при повышенной концентрации NaHCO_3 в кровотоке

избирательное подавление активности eNOS приводит к усилению секреции HCO_3^- (Рис. 43 К). Стоит отметить, что в тех же условиях донор оксида азота (SNP), введенный внутривенно, но не внутрижелудочно, вызывал угнетение секреции HCO_3^- , стимулированной ирритацией СОЖ (Рис. 25).

Опыты с применением блокаторов анионных транспортеров (DIDS либо NH_4Cl) показали, что при моделировании «щелочного прилива» транспорт дополнительного резерва HCO_3^- из подслизистого слоя на поверхность СОЖ зависит от базолатеральных переносчиков NBC1,2. Угнетение с помощью DIDS работы апикального электрогенного анионного обменника SLC26A9 (Wang et al., 2002) и электрогенных котранспортеров $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, NBCe1 и NBCe2 (Rossmann et al., 1999; Romero et al., 2013), присутствие которых характерно для желудочных эпителиоцитов, сопровождалось значительным уменьшением секреции HCO_3^- независимо от концентрации бикарбонатов в подслизистом слое (Рис. 27А,Б). Отсутствие реакции на NH_4Cl , в свою очередь, говорит о незначительном влиянии апикального белка SLC26A9 на транспорт бикарбонатов в условиях ирритации. Скорость же переноса HCO_3^- апикальным транспортером AE4, вероятно, регулируется концентрацией субстрата, т.е. HCO_3^- в цитоплазме.

Продукция бикарбонатов в желудке, а также их перенос на поверхность эпителия потенциально связаны с активностью карбоангидраз. Хотя синтез HCO_3^- в цитоплазме поверхностных эпителиальных клеток незначителен (Reichstein et al., 1984; Takeuchi et al., 1986), карбоангидразы могут функционально объединяться с анионными транспортерами, ускоряя их работу, как это показано для переносчиков AE2 и NBCe (Sterling et al., 2001; Thornell, Bevensee, 2015). Тем не менее в примененной экспериментальной модели неселективная блокада карбоангидраз с помощью АЦТЗ не влияла ни на базальную, ни на стимулированную секрецию HCO_3^- . Кроме того, эффект АЦТЗ не зависел от концентрации бикарбонатов в желудочном кровотоке

(Рис. 27В, Г), из чего можно заключить, что карбоангидразы не играют существенной роли в переносе бикарбонатов из подслизистого слоя.

Продукция пепсиногена по результатам описанных экспериментов угнеталась в присутствии 7-NI и не была связана с активностью eNOS, независимо от блокады H^+ , K^+ -АТФазы, а также алкалоза, вызванного в.в. инфузией $NaHCO_3$ (Рис. 43 Л,М).

В целом установлено, что при ирритации СОЖ влияние эндотелиальной изоформы NOS на желудочную продукцию HCO_3^- зависит от уровня эндогенной секреции кислоты либо концентрации бикарбонатов в кровеносных сосудах подслизистого слоя. Активация pNOS обеспечивает усиление желудочной секреции HCO_3^- независимо от кислотности в полости органа, а равно от концентрации бикарбонатов в подслизистом кровотоке. Активация eNOS теоретически приводит к ослаблению секреции HCO_3^- в нормацидном состоянии или на фоне искусственного увеличения концентрации HCO_3^- подслизистом слое в присутствии OME. В то же время при кислотной супрессии влияние eNOS на секрецию HCO_3^- было незначительным. Таким образом, от активности eNOS зависит транспорт на поверхность СОЖ дополнительного количества HCO_3^- , накапливающегося в подслизистом слое в том числе при «щелочном приливе».

4.3 Капсаицин-чувствительные первичные афференты – основное звено в управлении секрецией бикарбонатов и пепсиногена в желудке при слабой ирритации СОЖ; роль TRPV1 рецепторов

Экспериментально доказано, что капсаицин-чувствительные нервные окончания являются основным посредником для запуска сосудистых реакций и защитной секреции HCO_3^- , связанных с увеличением полостной кислотности в желудке. Десенситизация КЧПА под действием нейротоксических доз алкалоида капсаицина значительно ослабляет как секрецию HCO_3^- , так и гиперемическую реакцию в ответ на закисление полостного содержимого

(Takeuchi, Aihara, 2014). Тем не менее блокада основных сайтов связывания протонов в нервном сплетении органа, а именно TRPV1 и ASIC, парадоксальным образом не оказывала влияния на секрецию бикарбонатов (Aihara et al., 2005a; Sasaki et al., 2009). Интересно, что в слизистой оболочке ДПК секреция HCO_3^- в ответ на увеличение полостной кислотности зависит от реакции TRPV1, по крайней мере частично (Akiba et al., 2006).

Локальный гастропротективный эффект КЧПА реализуется в основном за счет выделения из периферических нервных окончаний (дендритов) КГРП, преобладающего медиатора спинальных афферентов (Ohno et al., 2008; Shimozawa et al., 2006). Выделяясь в непосредственной близости от артериол подслизистого слоя, КГРП активирует в прилежащих тканях eNOS и, возможно, ЦОГ-1 (Harada et al., 2002; Holzer, 2006). Известна также публикация, описывающая синтез оксида азота в физиологической концентрации в самих капсаицин-чувствительных нервных окончаниях, которые в желудке содержат nNOS (Raimura et al., 2013).

Таким образом, экспрессирующие TRPV1 капсаицин-чувствительные нервные окончания потенциально взаимодействует с обеими изоформами конститутивной NOS. В связи с этим в работе решался вопрос, может ли взаимодействие TRPV1 по отдельности с eNOS и nNOS повлиять на секрецию HCO_3^- , вызванную повышением концентрации кислоты и осмотического давления в желудке.

Прежде всего было получено подтверждение, что КЧПА являются основным звеном в регуляции защитной продукции бикарбонатов в желудке. Химическая десенситизация КЧПА значительно сокращала базальную секрецию бикарбонатов и практически полностью подавляла их удельную продукцию при ирритации СОЖ подкисленным раствором (Рис. 31 А, Б). Впервые установлено, что базальная секреция HCO_3^- отчасти обусловлена реакцией основных молекулярных сенсоров H^+ , а именно TRPV1 и ASIC. Также было доказано, что описанные реакции были связаны с местным

возбуждения КЧПА, т.к. развивались в условиях субдиафрагмальной двухсторонней ваготомии и спланхникотомии (Золотарев и др., 2018).

Ранее сообщалось, что КЧПА, обеспечивающие эти реакции, имеют в основном спинальное происхождение (Holzer, 2006). В проведенном исследовании среди КЧПА вагуса не было обнаружено проводников, влияющих при их антидромном раздражении на секрецию кислоты и пепсиногена. В то же время была выявлена группа капсаицин-чувствительных С-волокон (Рис. 38, 39), способных стимулировать относительно слабую продукцию бикарбонатов (Золотарев и др., 2002).

На рисунке 31В показано, что ни TRPV1, ни ASIC не оказывают существенного воздействия на желудочную секрецию HCO_3^- , вызванную ирритацией СОЖ, что согласуется с данными литературы. Из этого следует, что секреция HCO_3^- в желудке связана еще с активностью других сенсоров H^+ , отличных от TRPV1, но взаимодействующих с КЧПА прямо или опосредованно. Вполне очевидно, что реакция TRPV1 и ASIC при этом тоже имеет место. Известно, что даже умеренное увеличение концентрации кислоты (рН 2.0) в полости желудка сопровождается значительным снижением рН в цитоплазме эпителиальных клеток и в подслизистом слое (Kiviluoto et al., 1988, 1993), достаточным для стимуляции TRPV1 и ASIC и для того, чтобы вызвать ответ в нейронах спинальных ганглиев (Kress, Waldmann, 2006). С другой стороны, нейронный ответ зависит от действия многих медиаторов, таких как фактор роста нервов, простагландины, субстанция П, брадикинин, серотонин, а также эндоканнабиноидов. Эти медиаторы активируют несколько типов киназ, включая протеинкиназы –А и –С, а также MAP киназы, которые в ряду прочих своих функций, фосфорилируют различные сайты TRPV1 (Almasi et al., 2008; Cheng, Ji, 2008; Ohta et al., 2006; Xia et al., 2011).

Окончания КЧПА окружают артериолы подслизистого слоя и распространяются до пролиферативной зоны пришеечных слизистых клеток

[Type here]

(Nozawa et al., 2001; Horie et al., 2004). Такие морфологические особенности позволяют КЧПА влиять на транспорт бикарбонатов на поверхность СОЖ, регулируя скорость подслизистого кровотока и активность белков-переносчиков HCO_3^- в эпителиальных клетках. Действие конкурентного блокатора TRPV1 капсазепина на эффекты L-NNA, и 7-NI показало, что стимуляция TRPV1 при закислении желудочного содержимого является достаточной для изменения активности eNOS. У животных с интактной NOS эффект КПЗП не проявлялся. На фоне блокады TRPV1 капсазепином реакция на L-NNA уменьшалась почти на 50%. С другой стороны, реакция на 7-NI на фоне КПЗП оставалась прежней (Рис. 32 А, В). Расчёты, проведенные по описанной выше схеме, показали, что аппликация КПЗП устраняла эффект блокады eNOS, но не влияла на действие блокатора nNOS (Рис. 44 Б).

Данные литературы о роли КЧПА в регуляции функций главных клеток очень ограничены. Сама аппликация КАПС на слизистую оболочку не приводит к изменениям секреции пепсиногена (Schmidt et al., 1999). Деафферентация желудка с помощью КАПС либо лидокаина также оказалась неэффективной по отношению к секреции пепсиногена, стимулированной гастрином, либо аналогами холецистокинина (Blandizzi et al., 1995). В то же время известно, что нейропептиды, присутствие которых характерно для КЧПА, оказывают заметное влияние на продукцию фермента. В частности, КГРП подавлял стимулированную секрецию пепсиногена (Kraenzlin et al., 1985). Последнее объясняет влияние десенситизации КЧПА на секрецию пепсиногена в описываемых здесь опытах. Как видно на рисунке 33А,В после субхронической аппликации капсаицина исчезала ранняя негативная фаза реакции на ирритацию СОЖ, в то время как позднее усиление секреции, частично зависящее от NO, сохранялось. Также проведенное исследование показало, что активация TRPV1 не была достаточным стимулом для изменения секреции пепсиногена при ирритации, в том числе на фоне блокаторов cNOS.

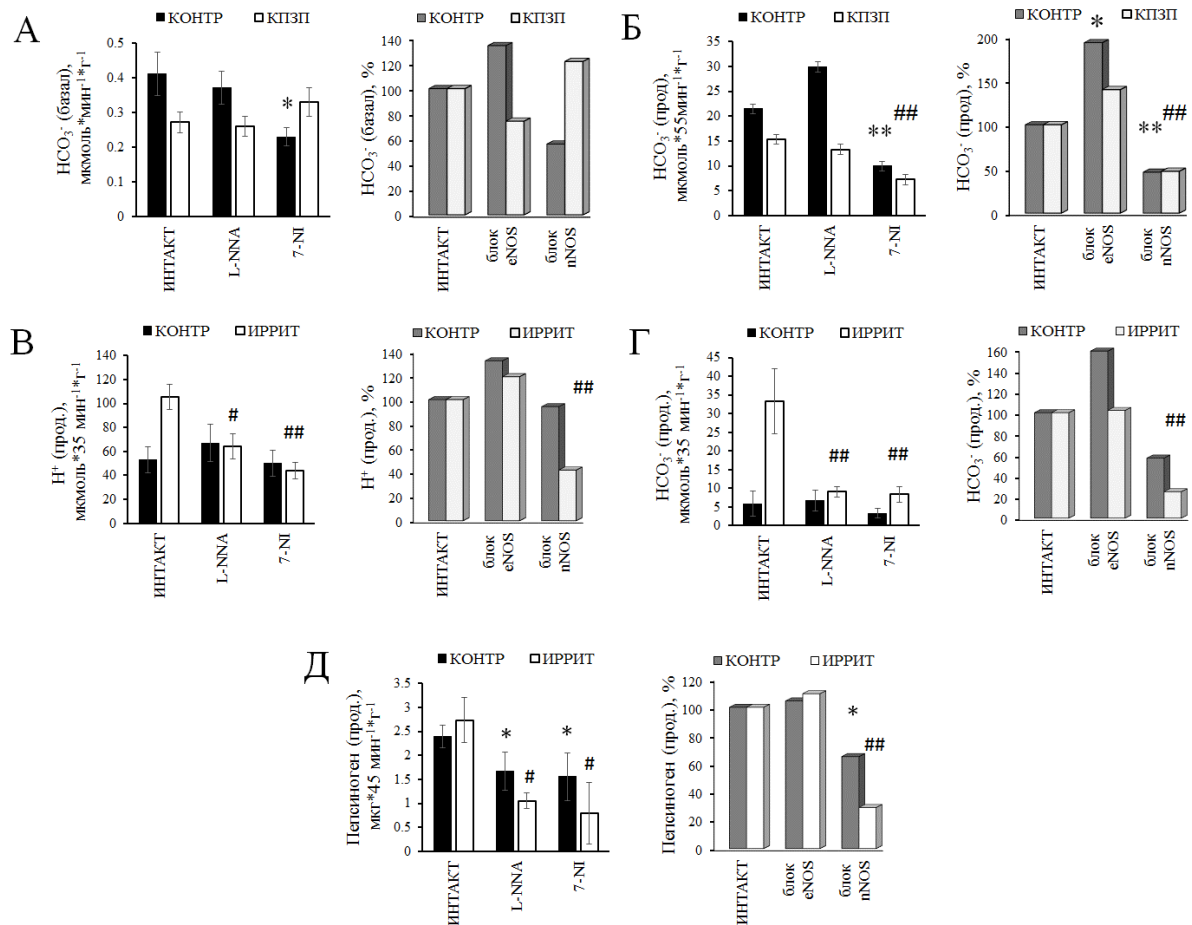


Рис. 44. Влияние блокады nNOS и eNOS на базальную секрецию и продукцию бикарбонатов, кислоты и пепсиногена в желудке при ирритации СОЖ. На графиках слева: абсолютные значения; справа: рассчитанные относительные значения в % от контрольного уровня.

Относительная секреция/продукция при блокаде eNOS рассчитывался как разность показателей, полученных после инъекции L-NNA и 7-NI (подробности см. в п. 4.2.1); относительная эффективность nNOS рассчитывалась путем нормирования реакции в присутствии 7-NI на контрольные значения. Уровень реакции при интактной NOS (ИНТАКТ) принят за 100%.

А, Б) Влияние блокады nNOS и eNOS (с помощью 7-NI и L-NNA, оба 10 мг/кг в.в.) на базальную секрецию HCO_3^- (А) и вызванную ирритацией СОЖ удельную продукцию HCO_3^- (Б) в условиях физиологической нормы под наркозом (КОНТР) и на фоне непрерывной инфузии капсазефина (КПЗП; 0.6 мг×кг⁻¹×ч⁻¹, в.а.).

В) Влияние блокады nNOS и eNOS на удельную продукцию H^+ , вызванную электрическим раздражением вагуса, после системного ведения блокаторов 7-NI и L-NNA (оба 10 мг/кг, в.в.) при перфузии полости желудка изотоническим раствором низкой кислотности (КОНТР), либо перфузии гипертоническим подкисленным раствором (ИРРИТ).

Г) Влияние блокады nNOS и eNOS на удельную продукцию HCO_3^- , вызванную электрическим раздражением вагуса, после системного ведения блокаторов 7-NI и L-NNA (оба 10 мг/кг, в.в.) при перфузии полости желудка изотоническим раствором низкой кислотности (КОНТР), либо перфузии гипертоническим подкисленным раствором (ИРРИТ).

Д) Влияние блокады nNOS и eNOS на продукцию пепсиногена, вызванную электрическим раздражением вагуса, после системного введения блокаторов 7-NI и L-NNA (оба 10 мг/кг, в.в.) при перфузии полости желудка изотоническим раствором низкой кислотности (КОНТР), либо перфузии гипертоническим подкисленным раствором (ИРРИТ).

Эксперименты на крысах под наркозом. Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 M NaCl, pH 2.0) в течение 20 мин. Блокаторы NOS, 7-NI и L-NNA, инъецировали за 15 мин до ирритации. Контрольным группам вводили DMSO (0.1%, 0.3 мл, в.в.).

Статистические сравнения с показателями при интактной NOS между абсолютными величинами, а также между относительными показателями при блокаде nNOS проведены с помощью теста Фишера (LSD). Отличие относительных значений секреции при блокаде eNOS от интактных выявлялось путем сравнения разности секреторных реакций на фоне L-NNA и 7-NI с нулем. Сравнение с соответствующим контролем: *, # - $p < 0.05$; **, ## - $p < 0.01$.

В целом, желудочная секреция бикарбонатов в ответ на уменьшение pH в полости органа зависит от местной реакции КЧПА, которая опосредуется nNOS. Действие nNOS на удельную продукцию HCO_3^- не является прямым результатом активности TRPV1. С другой стороны, взаимодействие TRPV1 с eNOS ограничивает секрецию HCO_3^- . Изменение секреции пепсиногена, вызванное ирритацией СОЖ, связано с активностью КЧПА лишь частично и не зависит от состояния TRPV1.

4.4 Слабая ирритация слизистой оболочки желудка потенцирует секрецию, вызванную раздражением вагуса; роль нитрергической и простагландиновой системы

Парасимпатическая иннервация регулирует в желудке как продукцию основных ulcerогенных факторов, кислоты и пепсиногена, так и процессы адаптивной гастропротекции. В эти реакции вовлечены афферентные и эфферентные волокна блуждающего нерва, причем общим эфферентным звеном, обеспечивающим те и другие процессы, являются пре- и постганглионарные холинергические волокна. Наряду со стимуляцией экзокринной секреции ацетилхолин через мускариновые холинорецепторы активирует синтез ПГ и NO (Ko, Cho, 2011).

Использованная экспериментальная модель позволила подтвердить полную зависимость продукции кислоты, бикарбонатов и пепсиногена, вызванной электрическим раздражением субдиафрагмального вагуса, от холинергической нейротрансмиссии, т.к. вагусная секреция прекращалась в присутствии М-, либо N-холиноблокаторов (Рис. 35). Кроме того, получено четкое подтверждение, что холинергическое вагусное воздействие на секрецию кислоты опосредуется гистамином, в то время как продукция HCO_3^- и пепсиногена не зависят от гистамина (Рис. 36; Хропычева и др., 2000). Также была установлена способность КЧПА в составе вагуса слабо потенцировать холинергическое усиление секреции HCO_3^- и отсутствие подобного влияния КЧПА на секрецию кислоты и пепсиногена (Рис. 38, 39; Золотарев и др., 2002).

Впервые показано, что на фоне продолжительной перфузии полости желудка раствором повышенной в физиологических пределах кислотности и осмотического давления происходит значительная потенциация холинергической секреции H^+ и HCO_3^- , вызванной электрическим раздражением периферического отрезка блуждающего нерва (Золотарев и др., 2019). Измеренная в тех же экспериментах вагусная продукция пепсиногена была нечувствительна к ирритации СОЖ (Рис.40).

Поскольку раздражение блуждающего нерва закономерно приводит к непродолжительному, но резкому увеличению кислотности в полости желудка, приток эндогенной кислоты сам по себе может быть раздражающим фактором. Однако применение ИПП показало, что эндогенное закисление полостного перфузата не действовало на усиление вагусной секреции HCO_3^- (Рис. 41 В, Г). В то же время вагусная секреция пепсиногена после инъекций ОМЕ увеличивалась независимо от ирритации (Рис. 41 Д, Е), что можно считать следствием гипергастринемии (Thomson et al., 2010).

Практически все эффекты блуждающего нерва в желудке, включая ulcerогенные и протективные, модулируются оксидом азота, что предопределено многообразием NO-продуцирующих клеток, с которыми

вступают в контакт пресинаптические и постсинаптические окончания вагуса (Brown et al., 1992a; Byrne et al., 1997; Ichikawa et al., 1998; Price, Hanson 1998; Fiorucci et al., 1995a; Burrell et al., 1996). Значительная доля пре- и постганглионарных парасимпатических волокон в сплетении желудка сама содержит nNOS (Bredt et al., 1990; Gańko, Całka, 2013). Кроме действия на иннервируемые клетки, NO способен потенцировать холинергическую синаптическую передачу, например, усиливая фосфорилирование пресинаптических кальциевых каналов (Herring, Paterson, 2001).

В проведенных экспериментах установлено, что усиление вагусной секреции H^+ и HCO_3^- происходит преимущественно под действием периферического NO и мало зависит от выделения NO из центробежных НАНХ нервных окончаний в составе блуждающего нерва. Примененные на фоне ирритации блокаторы cNOS (L-NNA и 7-NI) в равной мере подавляли потенциацию вагусной секреции H^+ и HCO_3^- , но не оказывали влияния при перфузии желудка изотоническим раствором низкой кислотности (Рис. 40 А-Г). Сопоставление эффектов неселективной блокады изоформ cNOS (с помощью L-NNA) и блокады nNOS позволило сделать вывод о преобладающем действии nNOS при усилении вагусной секреции H^+ и HCO_3^- (Рис. 44 В, Г).

Влияние NO на вагусную секрецию H^+ связано с одновременным развитием нескольких процессов. Несмотря на то, что на уровне обкладочных клеток взаимодействие NO/ГЦ-I приводит к торможению секреции H^+ (Berg et al., 2005; Brown et al., 1993a; Kim, Kim, 1996), NO также способен опосредованно усиливать секрецию H^+ через цАМФ зависимую продукцию гистамина (Hasebe et al., 2005).

Потенциацию холинергической продукции HCO_3^- посредством NO обсуждают в основном в связи с действием КГРП, который выделяется при деполяризации КЧПА (Aihara et al., 2005a; Takeuchi et al., 1991, 1992). Кроме того, NO в физиологической концентрации синтезируется в самих КЧПА,

[Type here]

содержащих nNOS (Raimura et al., 2013). В проведенных экспериментах при электрической стимуляции нерва неизбежно возникало антидромное возбуждение капсаицин-чувствительных периферических нервных окончаний, которое, как было показано, способно увеличить продукцию бикарбонатов в желудке (Рис. 38 Б). Тем не менее наблюдавшаяся NO-зависимая потенцияция вагусной продукции бикарбонатов незначительно связана с антидромным распространением возбуждения по афферентам, поскольку в условиях субдиафрагмальной двухсторонней ваготомии эффект блокаторов NOS проявлялся только на фоне ирритации СОЖ.

Известно, что NO потенцирует продукцию пепсиногена, вызванную введением карбохолина (Fiorucci et al., 1995a). При этом синтез NO может идти в самих главных клетках, где регулируется кальций-мобилизующими агентами, такими как карбахол, холецистокинин и гастрин, которые сами способны вызвать секрецию пепсиногена (Raufman, 1992). Наблюдавшееся усиление вагусной продукции пепсиногена было обусловлено активацией nNOS в нервных окончаниях, либо в главных клетках желез, но при этом оно не зависело от продукции NO в эпителии, либо КЧПА. Последнее подтверждается сходным тормозным действием блокаторов cNOS как при перфузии полости желудка изотоническим раствором низкой кислотности, так и при ирритации СОЖ (Рис. 40 Д, Е).

Поскольку вагусные воздействия на желудочную секрецию кислоты, пепсиногена и бикарбонатов, в том числе вызванные электрической стимуляцией нерва, целиком опосредуются М-холинергической передачей (Рис. 35), эндогенный NO скорее потенцирует эффект М-холинергической трансмиссии, чем действует аддитивно.

М-холинергическое воздействие, равно как и химическое раздражение СОЖ, усиливает в желудке локальный синтез простагландинов, в основном ПГЕ₂ и ПГІ₂ (Coseani et al., 1967; Bennett et al., 1967; Ko, Cho, 2011). Применение в работе неселективного блокатора ЦОГ индометацина показало,

[Type here]

что роль ПГ в модуляции вагусной секреции не тождественна вкладу NO. Угнетающее влияние ПГ по отношению к вагусной продукции H^+ и HCO_3^- выявлялось только в отсутствии химического раздражения СОЖ, когда полость желудка перфузировали изотоническим раствором низкой кислотности. На фоне слабой ирритации СОЖ влияние ПГ на вагусную секрецию H^+ и HCO_3^- прекращалось (Рис. 42 А-Г). Также эндогенные ПГ угнетали вагусную продукцию пепсиногена при перфузии полости желудка изотоническим раствором, но на фоне ирритации СОЖ вызывали усиление секреции. Полученные результаты отчасти совпадают с данными литературы о том, что ПГ снижают кислотность и протеолитическую активность желудочного секрета (Fiorucci et al., 1995c). Механизм, за счет которого ПГ ослабляют секрецию HCO_3^- неочевиден. В то же время хорошо известно, что ПГ усиливают секрецию муцина и бикарбонатов эпителиоцитами СОЖ, что опосредуется EP4 и EP1 рецепторами, соответственно (Takeuchi et al., 2010b).

Можно заключить, что изменение в физиологических пределах кислотности и осмотического давления желудочного содержимого эффективно модулирует желудочную секрецию кислоты и бикарбонатов, вызванную раздражением блуждающего нерва, но не влияет на вагусную продукцию пепсиногена. Выявленная потенция вагусной продукции HCO_3^- не зависела от продукции эндогенной кислоты. В основном потенция вагусной секреции H^+ и HCO_3^- связана с локальной активностью pNOS, не зависящей от НАНХ пресинаптических нервных окончаний. Эндогенные ПГ тормозят вагусную секрецию в отсутствии химического раздражения СОЖ, однако, при слабой ирритации теряют свою эффективность. Связанное в условиях слабой ирритации СОЖ с активностью pNOS усиление вагусной продукции H^+ и HCO_3^- не зависит от ЦОГ/ПГ опосредования.

4.5 Роль изоформ cNOS в регуляции кровотока в желудке в базальных условиях и на фоне ирритации слизистой оболочки

Причину разнонаправленного действия блокаторов эндотелиальной и нейрональной NOS на желудочную секрецию HCO_3^- на фоне ирритации слизистой оболочки логично связать с особенностями локализации изоформ фермента в тканях органа. Эндотелиальная NOS в кровеносных сосудах мышечного и подслизистого слоя (Whittle et al., 1990; Price et al., 1996) является основным ферментом, определяющим кровоток в желудке. Также известно, что желудочная секреция HCO_3^- зависит от величины артериального давления, например, увеличивается при портальной гипертензии (Lamarque et al., 1997). Нейрональная изоформа фермента распространена значительно шире (Bredt et al., 1990; Garcia-Vitoria et al., 2000; Brown et al., 1992b; Byrne et al., 1997; Ichikawa et al., 1998; Price, Hanson, 1998; Fiorucci et al., 1995a; Burrell et al., 1996), в связи с чем вовлечена в управление большим числом физиологических процессов.

Ирритация СОЖ сопровождается вазодилатацией, в результате которой усиливаются защитные процессы. По данным литературы именно эндотелий кровеносных сосудов подслизистого слоя первым в течение 1-5 мин после воздействия реагирует на химическое раздражение эпителия, опережая реакцию ЦОГ (Szabo et al., 2012). По мере развития реакции и в основном под действием ПГЕ₂ увеличивается проницаемость капилляров подслизистого слоя. В результате в зоне базальной пластинки формируется отек, имеющий согласно концепции Ш. Шабо протективное значение как «тканевой барьер разведения» (histodilution barrier), который задерживает диффузию H^+ и токсинов из полости в стенку органа (Szabo, 2014)

От скорости кровотока в подслизистом слое также зависит доступность для транспорта на поверхность эпителия бикарбонатов, накапливающихся в тканевой жидкости. Этому способствует архитектура капилляров подслизистого слоя, восходящих из нижних отделов желудочных желез к

поверхностному эпителию (Gannon et al., 1982) и задающих направление оттока HCO_3^- от обкладочных клеток. Проведенная оценка объемного кровотока в стенке желудка преследовала две цели: подтвердить, что примененное слабое химическое раздражение СОЖ подкисленным гипертоническим раствором способно вызвать изменения кровотока, и показать, что действие блокаторов cNOS на транспорт HCO_3^- сопровождается локальными сосудистыми реакциями.

Для регистрации объемного кровотока в подслизистом слое датчик лазер-доплеровского флоуметра помещался над серозной поверхностью тела желудка, что позволяло сохранять целостность органа. Адекватность такого подхода обосновывается тем, что суммарная толщина мышечного и подслизистого слоев в стенке желудка крысы меньше толщины слизистой оболочки (Olaibi et al., 2014), при этом именно артериолы подслизистого слоя являются основными резистивными сосудами, контролирующими кровотоки в органе (Guth, Smith, 1975). Учитывая значительную глубину проникновения лазерного луча в ткани, можно полагать, что именно кровотоки в сосудах подслизистого слоя определял полученные суммарные показатели. Наконец, амплитуда изменений желудочного кровотока при полостной аппликации кислоты (Рис. 30) была близка к амплитуде реакций, зарегистрированных с мукозной поверхности (Tashima et al., 2002).

Сосудистые реакции в желудке и их медиаторная специфичность изучены достаточно подробно. В частности, известно, что дилатация артериол подслизистого слоя в основном связана с продукцией оксида азота, возрастающей под действием КАПС/КГРП (Chen et al., 1992). С другой стороны, под действием NO/цГМФ происходит торможение спонтанных сокращений венул, что ведет к повышению давления в капиллярах (Mitsui, Hashitani, 2016). Простагландин E_2 усиливает желудочный кровоток и, действуя через EP2 рецепторы, вызывает расширение как желудочных

артериол, так и венул (Cho et al., 1994). Активация же EP3 рецепторов приводит к констрикции венул (Ohno et al., 1999).

Сравнение эффектов одновременной блокады eNOS и nNOS (с помощью L-NNA) с действием 7-NI, селективного блокатора nNOS, проведенное по ранее описанной схеме (п. 4.2.1), показало, что базальный уровень кровотока в стенке желудка не связан с активностью nNOS (Рис. 29), но поддерживается за счет локальной стимуляции TRPV1/eNOS. Близкое в.а. введение L-NNA значительно ослабляло кровоснабжение желудка, но не влияло на системные показатели гемодинамики (Рис. 28). Многократно подтвержденные литературные данные позволяют считать, что желудочный кровоток регулируется КЧПА (Holzer et al., 1994; Luo et al., 2013), активность которых, как выяснилось, в значительной мере является следствием реакции TRPV1 рецепторов. В проведенных экспериментах внутривенная инфузия блокатора TRPV1 капсазепина сопровождалась ослаблением базального кровотока (Рис. 28 А).

Раздражение СОЖ подкисленным гипертоническим раствором приводило к быстрому увеличению объемной скорости кровотока в стенке желудка. Пик сосудистой реакции совпадал по времени с пиком секреции бикарбонатов. При этом вазодилатация зависела от активности nNOS, так как кровоток в равной мере ослабевал в присутствии L-NNA и 7-NI, что говорит о незначительной вовлеченности eNOS (Рис. 30 А). Этот результат, показанный впервые (Золотарев и др., 2018), не стал, однако, полной неожиданностью. Ранее nNOS была выявлена в периваскулярных капсаицин-чувствительных нервных окончаниях, и было описано сосудорасширяющее действие этой изоформы фермента, индуцированное местной аппликацией капсаицина (Raimura et al., 2013; Chen, Guth, 1995; Knowles, Moncada, 1994). Исследовав динамику вовлечения nNOS и eNOS в локальную гиперемическую реакцию на капсаицин, Раимура и соавт. (Raimura et al., 2013) предположили, что nNOS обеспечивает раннюю фазу реакции, в то время как eNOS длительное время

поддерживает вазодилатацию после окончания действия стимула. Последнее хорошо согласуется с полученными здесь сведениями о роли eNOS и nNOS в поддержании базальной и стимулированной секреции HCO_3^- .

Подтверждение сосудистых эффектов слабой ирритации и влияния блокаторов cNOS и ЦОГ можно получить из результатов макроскопического обследования поражений СОЖ. Наиболее частым изменением состояния СОЖ после ирритации была умеренная гиперемия, отражающая вазодилатацию в подслизистом слое. Площадь гиперемизированных участков существенно сокращалась под действием 7-NI и ИНД, но не L-NNA (Табл. 1), что говорит о преобладающем значении nNOS и ЦОГ в регуляции локальной сосудистой реакции. Блокада ЦОГ с помощью ИНД подавляла сосудистую реакцию на ирритацию СОЖ в той же мере, что и блокада nNOS (Рис. 30Б). При этом на фоне ИНД реакция на 7-NI значительно уменьшалась.

Полученные результаты свидетельствуют, что сосудистая реакция на ирритацию СОЖ кислым гипертоническим раствором обеспечивается 2-я контурам регуляции. Один TRPV1/eNOS-зависимый, поддерживающий базальный кровоток. Другой включает nNOS/ПГЕ₂ и обеспечивает увеличение кровотока в ответ на ирритацию. Оба пути регуляции координируются КЧПА.

В целом проведенная оценка объёмной скорости базального и стимулированного ирритацией СОЖ кровотока способствует пониманию механизмов разнонаправленного действия блокаторов cNOS, L-NNA и 7-NI, на секрецию HCO_3^- в зависимости от локальной концентрации бикарбонатов в подслизистом слое. Угнетение активности eNOS приводит к резкому и достаточно продолжительному снижению базальной скорости кровотока, что препятствует вымыванию из подслизистого слоя накопившихся вследствие «щелочного прилива» ионов HCO_3^- . Это создает дополнительный резерв для транспорта HCO_3^- на поверхность СОЖ, активируемого NO и ПГ (Рис. 23, 26). Увеличение концентрации NO, в том числе за счет экзогенных доноров, напротив, усиливает объёмный кровоток и ускоряет «вымывание» щелочного

прилива, что приводит к сокращению подслизистого резерва HCO_3^- , доступного для транспорта на поверхность эпителия (Рис. 16, 25). Возбуждение TRPV1 оказывается достаточно сильным сигналом, чтобы через активацию eNOS ускорить «вымывание» HCO_3^- из подслизистого слоя. В то же время вазодилатация и равно активность nNOS при раздражении СОЖ подкисленным гипертоническим раствором в общем не зависели от работы TRPV1 (Рис. 32, 34).

С другой стороны, ни nNOS, ни ЦОГ в примененной экспериментальной модели не влияли на базальный тонус сосудов (Рис. 29), но их кратковременная активация все же увеличивает объемную скорость кровотока. Однако такое увеличение не оказывает принципиального действия на транспорт бикарбонатов. Возможно также, что эффект усиления кровотока маскируется стимулирующим действием NO и ИНД на ионные транспортеры в эпителиоцитах. Предложенная концепция подкрепляется литературными данными об усилении желудочной секреции HCO_3^- при портальной гипертензии. Эта реакция ослабевала в присутствии ИНД и усиливалась под действием ПГЕ₂. Кроме того, известно, что секреция HCO_3^- , вызванная повышением давления в кровеносных сосудах желудка, увеличивалась под действием L-NMMA, но сокращалась в присутствии доноров NO (Takeuchi et al., 1993).

4.6 Взаимодействие нитрергической и простагландиновой систем при регуляции желудочной секреции бикарбонатов и пепсиногена, вызванной ирритацией СОЖ

Изоформы cNOS широко экспрессированы в стенке желудка. Эндотелиальная изоформа присутствует в кровеносных сосудах мышечного и подслизистого слоя (Whittle 1990; Price et al., 1996). Нейрональная синтаза выявляется значительно шире. Основной молекулярной мишенью NO, через

которую этот медиатор влияет на физиологические процессы, является растворимая гуанилатциклаза (ГЦ-I). Однако ее присутствие и функциональная роль в слизистых эпителиальных клетках, по-видимому, невелики, о чем можно узнать только из ранних публикаций (Brown et al., 1992b).

Локализация ЦОГ-1 в здоровой СОЖ отличаются от топографии cNOS. Фермент ЦОГ-1 обнаруживается в основном в клетках, не имеющих прямого контакта с полостным содержимым: в мезенхимных клетках базальной пластинки, фибробластах, макрофагах, обкладочных и слизистых клетках пилорических желез, но отсутствует в поверхностных эпителиальных клетках (Tatsuguchi et al., 2000). При этом рецепторы простагландинов и простациклина распределены в СОЖ значительно шире, чем ГЦ-I (п.1.4.4).

Оксид азота и ПГ синтезируются вблизи друг от друга, хотя в подслизистом слое желудка полного перекрывания сайтов cNOS и ЦОГ-1 не происходит. Тем не менее имеется полная возможность для взаимодействия конститутивных NOS и ЦОГ, в частности при регуляции агрегации тромбоцитов, адгезии лейкоцитов, регуляции тонуса сосудов и цитопротективных реакциях ЖКТ (Cuzzocrea, Salvemani, 2007). Ранее также показано, что стимуляция с помощью NO продукции HCO_3^- в слизистой оболочке желудка и ДПК зависит от взаимодействия NO/ЦОГ-1 (Furukawa et al., 1999, 2000; Sugamoto et al., 2001). При этом нитрергические влияния на продукцию HCO_3^- полностью определено ГЦ-I/цГМФ-опосредованным синтезом ПГЕ₂, который в свою очередь через рецептор EP₁ активирует Gqα белки, PLC-β/PIP₂/IP₃ и высвобождение внутриклеточного Ca^{2+} в цитоплазму (Takeuchi et al., 2006; Nicola et al., 2005; Tang et al., 2005). Интересно, что рецептор EP₁ до сих пор не выявлен в поверхностных эпителиальных клетках желудка, напротив, показано, что в этих клетках экспрессируется рецептор EP₂ (Northey et al., 2000), воздействие на которые не приводит к изменению секреции HCO_3^- . Ассоциируясь с белками Gsa, рецепторы EP₂ стимулируют

аденилатциклазу (Woodward et al., 2011), что малоэффективно в поверхностных эпителиоцитах желудка, в которых даже прямая стимуляция аденилатциклазы форсколином не влияет на продукцию HCO_3^- (Takeuchi et al., 1997b, 2006).

Применение блокатора ЦОГ в экспериментах подтвердило, что стимулирующее действие эндогенного NO/ГЦ-I на секрецию HCO_3^- реализуется практически полностью за счет синтеза ПГ. Само угнетение ЦОГ с помощью ИНД сопровождалось значительным (почти 50%) уменьшением удельной продукции HCO_3^- , вызванной раздражением СОЖ, но не оказало влияния на базальную секрецию (Рис. 13А-В; 45 А,Б), что хорошо согласуется с данными литературы (Peskar, 2001).

Селективный блокатор nNOS, 7-нитроиндазол, который подавлял связанную с раздражением удельную продукцию HCO_3^- , на фоне ИНД не вызывал дальнейшего ослабления секреции. Как абсолютная, так и относительная продукция HCO_3^- в присутствии 7-NI+ИНД не отличалась от соответствующих значений, полученных на фоне ИНД (Рис. 45 Б), т.е. действие nNOS практически полностью реализуется через синтез ПГ. Учитывая, что вызванная раздражением продукция HCO_3^- целиком зависела от синтеза цГМФ, что подтверждается реакцией на блокатор ГЦ-I метиленовую синь (Рис. 15 А, В), можно дополнить существующие представления тем, что взаимодействие ГЦ-I/цГМФ/ЦОГ, происходящее в СОЖ при регуляции продукции HCO_3^- , является результатом активности nNOS.

Функциональные проявления взаимодействия eNOS и простагландиновой системы при управлении продукцией HCO_3^- существенно отличаются от результата взаимодействия nNOS/ПГ. Такое заключение можно сделать по результатам экспериментов с использованием L-NNA, неселективного блокатора eNOS и nNOS. Расчеты показали, что в гипоацидном состоянии прекращение действия eNOS на фоне ИНД приводит к более чем двукратному увеличению продукции HCO_3^- , по сравнению с

реакцией в присутствии ИНД (Рис. 45 Б). В то же время известный вазодилататор нитропруссид натрия вызывает резкое сокращение продукции HCO_3^- , независимо от присутствия ИНД (Рис. 17 А, В).

Учитывая, что eNOS действует на транспорт HCO_3^- через изменение кровотока в подслизистом слое, стоит обратить внимание на особенности взаимодействия NO и ЦОГ в эндотелии сосудов. Установлено, например, что в культуре эндотелиальных клеток ослабление синтеза ПГ при блокаде ЦОГ компенсируется усилением продукции NO, за счет чего может поддерживаться вазодилатация (Vassale et al., 2003). Посредником, увеличивающим синтез NO, в этом случае может быть Ca^{2+} , концентрация которого в цитоплазме эндотелиальных клеток возрастает из-за усиления эффекта гистамина на фоне блокады ЦОГ. Кроме того, гистамин усиливает продукцию цГМФ (Bolz, Pohl, 1997).

Важно отметить, что описанное выше увеличение продукции HCO_3^- в присутствии L-NNA на фоне ИНД происходило после подавления собственной секреции кислоты, т.е. при относительно низкой концентрации HCO_3^- в подслизистом слое, близкой к значениям в плазме крови натошак. При искусственном увеличении концентрации NaHCO_3 в желудочном кровотоке взаимное влияние ИНД и L-NNA при регуляции секреции бикарбонатов не наблюдалось. В то же время ИНД и в этом случае отменял эффект 7-NI (Рис. 26, 45 Е).

В тех же экспериментальных условиях было показано, что базальная секреция пепсиногена не зависела от синтеза ПГ. В то же время при ирритации СОЖ ПГ угнетали секрецию пепсиногена, а неселективная блокада ЦОГ приводила к ослаблению реакции на 7-NI, но не влияла на эффект eNOS, что указывает на частичное взаимодействие nNOS/NO/ЦОГ при регуляции продукции пепсиногена.

В целом установлено, что влияние NO на перенос HCO_3^- из подслизистого слоя на поверхность желудочного эпителия преимущественно зависит от

[Type here]

активности ЦОГ. Проведенный анализ действия блокаторов изоформ cNOS в присутствии ИНД показал, что активирующий эффект nNOS при регуляции желудочной секреции HCO_3^- и отчасти пепсиногена полностью реализуется через взаимодействие цГМФ/ЦОГ. Вместе с тем данная серия экспериментов дала новые сведения о механизмах взаимного влияния распространенных классов препаратов. В частности, показано, что применение нового поколения НПВП, конъюгированных с донорами NO, на фоне ИПП может ослабить защитный бикарбонатный барьер СОЖ.

Заключение

Представленное исследование посвящено одной из основных проблем фундаментальной гастроэнтерологии - паракринной регуляции процессов адаптивной гастропротекции. В целом полученные результаты раскрывают значение нитергической системы как модулятора простагландиновых и вагусных холинергических воздействий на защитный бикарбонатный барьер на поверхности желудочного эпителия и микроциркуляцию в подслизистом слое в условиях слабой ирритации СОЖ. Актуальность работы подтверждается тем, что до настоящего времени не были получены непротиворечивые данные о влиянии нитергической системы на желудочную секрецию HCO_3^- . Также в проведенном исследовании впервые оценена роль конститутивных синтаз оксида азота в поддержании баланса и взаимодействия между агрессивными и защитными факторами СОЖ, в частности, влияния собственной секреции кислоты на продукцию бикарбонатов.

На основе измерения pH и PCO_2 в желудочном перфузате установлено, что в желудке крысы *in vivo* изменение кислотности и осмотического давления в диапазоне, сопоставимом с показателями пищеварения, является достаточным стимулом для NO-зависимого усиления реакций адаптивной гастропротекции, а именно секреции HCO_3^- и вазодилатации. Основную роль

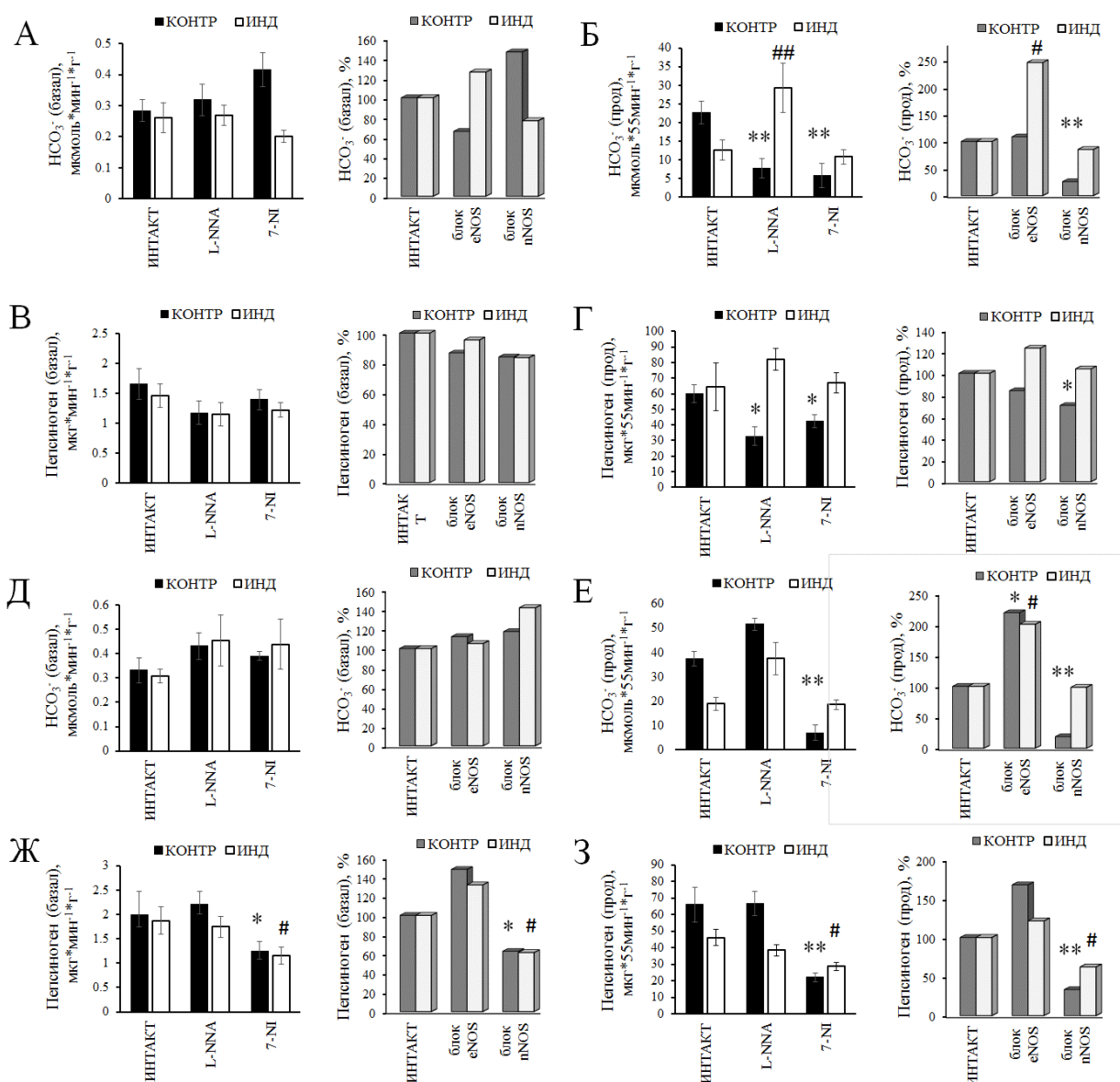


Рис. 45. Влияние блокады nNOS и eNOS на базальную секрецию и вызванную ирритацией СОЖ продукцию бикарбонатов и пепсиногена в желудке на фоне блокады ЦОГ. На графиках слева: абсолютные значения; справа: рассчитанные относительные значения в % от контрольного уровня.

Секреция/продукция при блокаде eNOS рассчитывался как разность относительных показателей, полученных после инъекции L-NOS и nNOS (подробности см. в п. 4.2.1); относительная эффективность nNOS рассчитывалась путем нормирования реакции в присутствии 7-NI на контрольные значения. Уровень реакции при интактной NOS (ИНТКАТ) принят за 100%.

А, Б) Влияние блокады nNOS и eNOS (с помощью 7-NI и L-NNA, оба 10 мг/кг, в.в.) на базальную секрецию (А) и вызванную ирритацией СОЖ удельную продукцию HCO_3^- (Б) в условиях физиологической нормы под наркозом (КОНТР) и после инъекции индометацина (ИНД, 5 мг/кг, в.в.).

В, Г) Влияние блокады nNOS и eNOS (с помощью 7-NI и L-NNA, оба 10 мг/кг в.в.) на базальную секрецию (В) и продукцию пепсиногена на фоне ирритации СОЖ (Г) в

условиях физиологической нормы под наркозом (КОНТР) и после инъекции индометацина (ИНД, 5 мг/кг, в.в.).

Д, Е) Влияние блокады nNOS и eNOS на базальную секрецию (Д) и стимулированную ирритацией СОЖ удельную продукцию HCO_3^- (Е) при системном введении блокаторов 7-NI и L-NNA (10 мг/кг, в.в.) в условиях физиологической нормы под наркозом (КОНТР) и после инъекции индометацина (ИНД, 5 мг/кг, в.в.). Воздействие на фоне на фоне в.в. инфузии NaHCO_3 .

Ж, З) Влияние блокады nNOS и eNOS на базальную секрецию (Д) и стимулированную ирритацией СОЖ продукцию пепсиногена (Е) при системном введении блокаторов 7-NI и L-NNA (10 мг/кг, в.в.) в условиях физиологической нормы под наркозом (КОНТР) и после инъекции индометацина (ИНД, 5 мг/кг, в.в.). Воздействие на фоне на фоне в.в. инфузии NaHCO_3 .

Эксперименты на крысах под наркозом. Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 М NaCl, pH 2.0) в течение 20 мин. Блокаторы NOS, 7-NI и L-NNA, инъектировали за 15 мин до ирритации. Контрольным группам вводили DMSO (0.1%, 0.3 мл, в.в.). Системная инфузия NaHCO_3^- ($10 \text{ ммоль}^{-1} \times \text{кг}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$, в.в.) проводилась в течение 20 мин. Перед всеми экспериментами производили инъекцию омепразола (10 мг/кг) за 18 ч до эксперимента (п.к.) и за 50 мин (в.в.) до аппликации ирританта.

Статистические сравнения с показателями при интактной NOS между абсолютными величинами, а также между относительными показателями при блокаде nNOS проведены с помощью теста Фишера (LSD). Отличие относительных значений секреции при блокаде eNOS от интактных выявлялось путем сравнения разности секреторных реакций на фоне L-NNA и 7-NI с нулем. Сравнение с соответствующим контролем: *, # - $p < 0.05$; **, ## - $p < 0.01$.

в этих реакциях играет NO, синтезированный в СОЖ, но не в центробежных НАНХ нервных волокнах.

Впервые путем прямого воздействия на nNOS и теоретической оценки эффекта eNOS установлено, что в нормацидном состоянии эндотелиальная и нейрональная изоформы NOS оказывают разнонаправленное действие на желудочную секрецию бикарбонатов, как базальную, так и стимулированную слабой ирритацией СОЖ. Полученные с применением селективного *in vivo* блокатора nNOS (7-NI) данные позволяют заключить, что на фоне слабой ирритации СОЖ усиление продукции HCO_3^- зависит главным образом от активации широко экспрессированной в тканях органа нейрональной изоформы фермента. Подтверждено, что действие nNOS/NO приводит к ускорению ионного обмена через базолатеральные котранспортеры $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC1,2), которые доставляют ионы HCO_3^- из тканевой жидкости в цитоплазму поверхностных эпителиоцитов желудка. Немаловажно, что cNOS

[Type here]

не влияет на парацеллюлярный транспорт HCO_3^- , который в примененных экспериментальных условиях оставался на низком уровне.

Особенности участия eNOS в регуляции секреции HCO_3^- преимущественно связаны с локализацией этой изоформы в эндотелии кровеносных сосудов. Согласно расчетам, произведенным путем сопоставления реакции на неселективный блокатор eNOS и nNOS (L-NNA) и реакции на селективный *in vivo* блокатор nNOS (7-NI), избирательное подавление eNOS приводит к продолжительному сокращению базального кровотока в стенке желудка, на фоне которого существенно возрастает стимулированная ирритацией СОЖ удельная продукция HCO_3^- . Следовательно, синтез NO в стенке кровеносных сосудов потенциально связан с ослаблением секреции HCO_3^- . Подтверждение этому было получено при аппликации в спланхнический кровоток вазодилататора, донора NO (SNP), который подавлял желудочную секрецию бикарбонатов, в том числе стимулированную слабой ирритацией СОЖ. В работе впервые получено экспериментальное подтверждение того, что nNOS не влияет на базальное кровоснабжение в желудке, но опосредует кратковременное увеличение объемного кровотока в сосудах органа в ответ на ирритацию СОЖ, на фоне которого тем не менее регистрировалось выраженное усиление продукции HCO_3^- . Теоретическое значение полученного результата связано с уточнением положений теории адаптивной гастропротекции, а именно концепции тканевого барьера разведения (histodilution barrier), предложенной Ш. Шабо (Szabo, 2014). Согласно концепции, вазодилатация при химическом раздражении СОЖ сопровождается усилением капиллярной фильтрации, в результате чего в области собственной пластинки возникает отек, задерживающий диффузию H^+ и токсинов из полости желудка в подслизистый слой. При этом, как показано в проведенных экспериментах, сокращается защелачивание поверхностного слоя слизи. Таким образом, реакция неповрежденной СОЖ в ответ на слабую ирритацию развивается в

зависимости от кровоснабжения подслизистого слоя. При увеличении кровотока (под действием КГРП, ПГ и NO) формируется тканевой барьер разведения. Если же ирритант действует на фоне сокращения объемного кровотока, усиливается презепителиальный щелочной барьер.

Полученные результаты подтвердили зависимость базальной и стимулированной ирритантами продукции HCO_3^- от концентрации эндогенной кислоты в желудке. Для этого впервые в исследованиях адаптивной гастропротекции был верифицирован и успешно применен метод одновременной регистрации pH и PCO_2 , позволяющий вести измерения секреции HCO_3^- при кислой реакции содержимого желудка. Приоритетным результатом стала демонстрация зависимости эффекта eNOS на желудочную продукцию HCO_3^- от уровня собственной секреции кислоты. Установлено, что блокада eNOS потенцирует продукцию HCO_3^- при наличии базальной секреции кислоты, но становится неэффективной на фоне ИПП. Влияние pNOS, однако, не связано с уровнем собственной секреции кислоты в желудке.

Для объяснения зависимости эффекта изоформ cNOS от секреции кислоты была предложена гипотеза, предполагавшая, что ослабление реакции на блокаду eNOS на фоне ИПП обусловлено уменьшением концентрации бикарбонатов в области базальной пластинки вследствие сокращения так называемого щелочного прилива - транспорта HCO_3^- через базолатеральную мембрану активированных обкладочных клеток. Гипотеза получила подтверждение в опытах с внутривенной инфузией NaHCO_3 на фоне ИПП. Впервые показано, что при искусственном увеличении концентрации NaHCO_3 в сосудах желудка увеличивалось потенцирующее действие блокады eNOS на секрецию HCO_3^- , т.е. ослабление кровотока задерживает в подслизистом слое желудка дополнительное количество HCO_3^- , делая его доступным для транспорта на поверхность эпителия.

Проведенная работа подтвердила, что действие изоформ cNOS на желудочную секрецию HCO_3^- при раздражении СОЖ кислотой полностью

зависит от возбуждения капсаицин-чувствительных первичных афферентов. Тем не менее участие в этой реакции мембранных сенсоров протонов (TRPV1), характерных для капсаицин-чувствительных афферентов, осталось не доказанным. С одной стороны, активация рецепторов TRPV1 провоцирует возбуждение афферентов, поддерживающее базальную секрецию HCO_3^- , с другой стороны, стимуляция TRPV1 была недостаточной для усиления секреции HCO_3^- при ирритации СОЖ.

В работе в целом подтвержден главный постулат теории гастропротекции, что ПГ являются основными паракринными факторами, стимулирующими защитные реакции СОЖ, в том числе продукцию HCO_3^- . Другой паракринный фактор защиты, оксид азота, не оказывал прямого действия на усиление транспорта HCO_3^- . Его влияние в значительной мере локально опосредовалось ЦОГ и синтезом ПГ, что характерно для многих физиологических и патофизиологических процессов. Проведенный впервые анализ показал, что взаимодействие отдельных изоформ cNOS с ЦОГ приводит к нетождественным изменениям продукции HCO_3^- . Потенцирующий эффект nNOS полностью реализуется через взаимодействие ГЦ-I/ЦОГ независимо от продукции кислоты в желудке и концентрации бикарбонатов в подслизистом слое. Расчеты показывают, что действие eNOS на желудочную секрецию HCO_3^- прямо не связано с активацией ЦОГ-1. Тем не менее при подавлении синтеза ПГ эффект eNOS увеличивается.

Слабая ирритация СОЖ усиливает парасимпатические воздействия на экзокринную секрецию в желудке. Новым результатом стала демонстрация того, что увеличившаяся на фоне ирритации вагусная холинергическая продукция H^+ и HCO_3^- зависела от локальной активности nNOS, не относящейся к неадренергическим и нехолинергическим центробежным нервным окончаниям. Установлено также, что нитергическая потенция вагусной продукции H^+ , HCO_3^- , а также продукции пепсиногена не зависела

от синтеза ПГ. Кроме того, показано, что NO-зависимое усиление продукции пепсиногена в желудке не связано с раздражением СОЖ.

Полученные доказательства тесного взаимодействия nNOS и ЦОГ имеют практическое значение для развития потенциала НПВП, конъюгированных с донорами оксида азота. Также сведения о зависимости желудочной секреции бикарбонатов от действия ИПП могут быть учтены при уточнении схем лечения и поддержания ремиссии эрозивного и язвенного поражения, что актуально в связи с широким применением ИПП.

Выводы

- 1) Слабое химическое раздражение (ирритация) СОЖ, моделирующее физиологический уровень кислотности и осмолярности в желудке во время пищеварения, активирует секрецию бикарбонатов и увеличивает органный кровоток. Главным фактором, определяющим силу секреторных реакций, является градиент pH в полости желудка.
- 2) Увеличение секреции HCO_3^- и кровотока в желудке при раздражении СОЖ кислым гипертоническим раствором зависит от локального синтеза оксида азота. Отдельные изоформы конститутивной синтазы оксида азота (cNOS) по-разному влияют на секрецию HCO_3^- . Стимуляция нейрональной синтазы оксида азота (nNOS) усиливает базальную секрецию и потенцирует удельную продукцию HCO_3^- при раздражении СОЖ кислым гипертоническим раствором. Активация эндотелиальной изоформы (eNOS) приводит к уменьшению секреции бикарбонатов.
- 3) Потенцирующее влияние nNOS на желудочную секрецию бикарбонатов, вызванную слабой ирритацией слизистой оболочки, реализуется через взаимодействие NO с растворимой гуанилатциклазой (ГЦ-I), в результате чего увеличивается перенос HCO_3^- из подслизистого слоя на поверхность эпителия. Определяющую роль в трансэпителиальном переносе бикарбонатов играют

базолатеральные электрогенные транспортеры NBCe-1,-2 желудочных эпителиоцитов.

4) Базальный кровоток в желудке поддерживается за счет активности eNOS, но вклад eNOS в усиление кровотока в ответ на ирритацию СОЖ незначителен. Увеличение кровоснабжения стенки желудка при раздражении СОЖ кислым гипертоническим раствором происходит в результате стимуляции nNOS.

5) Усиление базального кровотока за счет активности eNOS, способствует уменьшению концентрации HCO_3^- в подслизистом слое и сокращению транспорта HCO_3^- в полость желудка. Угнетающее действие eNOS на секрецию HCO_3^- проявляется при сохраненной продукции кислоты в желудке, создающей дополнительный приток HCO_3^- в капилляры органа (щелочной прилив), но прекращается после кислотной супрессии. В подтверждение этому негативный эффект eNOS проявляется при искусственном увеличении концентрации NaHCO_3 в желудочном кровотоке на фоне ингибиторов протонной помпы.

6) Действие изоформ cNOS на защитный бикарбонатный барьер СОЖ и кровоток в подслизистом слое в значительной мере опосредовано циклооксигеназой (ЦОГ). Потенцирующее влияние nNOS на секрецию бикарбонатов и усиление желудочного кровотока при ирритации СОЖ полностью реализуется через взаимодействие ГЦ-ЦОГ независимо от уровня собственной секреции кислоты в желудке и концентрации бикарбонатов в подслизистом слое. С другой стороны, эндогенные ПГ препятствуют влиянию eNOS на желудочную продукцию HCO_3^- .

7) Слабая ирритация СОЖ потенцирует секрецию H^+ и HCO_3^- , вызванную электрическим раздражением блуждающего нерва. Усиление холинергической вагусной секреции связано с активацией периферической nNOS, не относящейся к эфферентным неадренергическим и

нехолиергическим нервным волокнам. Действие nNOS/NO на вагусную экзокринную секрецию в желудке не зависит от синтеза ПГ.

8) Локальные реакции нитрергической и простагландиновой системы в базальных условиях и после химического раздражения СОЖ интегрируются в капсаицин-чувствительными первичными афферентами. Тем не менее активация вероятных сенсоров протонов в капсаицин-чувствительных афферентах, а именно рецепторов переменного потенциала ванилоидных 1-го типа (TRPV1) и кислоточувствительных ионных каналов (ASIC), не является достаточным сигналом для nNOS/ГЦ-I/ЦОГ – зависимого усиления секреции HCO_3^- при ирритации СОЖ. Влияние eNOS на секрецию HCO_3^- частично зависит от активности TRPV1.

9) Раздражение СОЖ подкисленным гипертоническим раствором приводит к кратковременному ослаблению секреции пепсиногена с последующим ее незначительным увеличением. Ослабление секреции пепсиногена на фоне ирритации обусловлено локальной реакцией капсаицин-чувствительных первичных афферентов. Не связанная с ирритацией СОЖ активность nNOS усиливает базальную и стимулированную блуждающим нервом секрецию пепсиногена.

10) В целом периферическая нитрергическая система в условиях слабой ирритации СОЖ является важным модулятором простагландиновых и вагусных холинергических влияний, обеспечивающих усиление презепителиального бикарбонатного барьера и кровоснабжения подслизистого слоя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гиноман Л.М., Соловьева Т.А. Определение пепсина и гастриксина в желудочном соке человека // Вопросы Мед. Хим. – 1965. – Т. 11. – С. 87-89.
2. Гриневич В.Б., Пахомова И.Г., Карева Е.Н., Якоб О.В., Кнорринг Г.Ю. Алгоритм лечения пациентов с кислотозависимыми заболеваниями с позиции клинициста // Эффективная фармакотерапия. - 2020. - Т. 16. № 24. - С. 14-19.
3. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Силин Л.В., Хропычева Р.П. Нитреергическая регуляция транспорта бикарбонатов из подслизистого слоя желудка наркотизированных крыс // Рос. Физиол. Журн. им. Сеченова. - 2017. - Т. 103. № 4. – С. 432-445.
4. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Хропычева Р.П. Влияние TRPV1 на активность изоформ конститутивной синтазы оксида азота при регуляции секреции бикарбонатов в желудке //Бюлл. Эксп. Биол. Мед. - 2018. - Т. 166. № 9. - С. 278-281.
5. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Хропычева Р.П. Действие слабых ирритантов на желудочную продукцию бикарбонатов и пепсиногена зависит от уровня секреции кислоты // Росс. Физиол. Журн. Им. Сеченова. – 2012. – Т. 98. № 6 – С. 744-756.
6. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Хропычева Р.П. Слабая ирритация слизистой оболочки желудка потенцирует секрецию, вызванную раздражением вагуса // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. - 2019. – Т. 105. № 9. – С. 1142–1153.
7. Золотарев В.А., Ноздрачев А.Д. Капсаицин-чувствительные афференты блуждающего нерва // Росс. Физиол. журн. им. Сеченова – 2001. -Т. 87. -№ 2. -С. 182-207.
8. Золотарев В.А., Поленов С.А., Лепнев Г.П., Разумова Н.А. Метод непрерывной количественной оценки секреции кислоты и бикарбонатов в желудке наркотизированных крыс// Физиол. Журн. Им. Сеченова. -1996. – Т. 82. - №7. -С. 111-116.
9. Золотарев В.А., Хропычева Р.П. Влияние ингибиторов протонного насоса на секрецию бикарбонатов и пепсиногена, вызванную химическим раздражением слизистой оболочки желудка // Бюлл. Эксп. Биол. и Мед. – 2012. – Т. 154. №10 – С. 406-410.

10. Золотарев В.А., Хропычева Р.П., Поленов С.А. Селективное управление желудочной секрецией кислоты, пепсиногена и бикарбонатов разными популяциями С-волокон блуждающего нерва // Бюлл. Экспер. Биол. и Мед. - 2002 - Т. 133. №3 - С.210-213.
11. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Ивашкин К.В., Корочанская Н.В., Лопина О.Д., Лапина Т.Л. и др. Роль нарушения защитных факторов в развитии кислотозависимых заболеваний (Резолюция Экспертного совета 12–13 марта 2016) // Российский журн. Гастроэнтерол. Гепатол. Колопроктол. – 2016 – Т. 26. №3. – С. 115–116.
12. Ивашкин К.В., Изатуллаев Е.А., Корнеева В.Р. Желудочная цитопротекция как основа защиты и восстановления слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта при эрозивно-язвенном поражении различной этиологии // Российский журн. Гастроэнтерол. Гепатол. Колопроктол. – 2020. – Т. 30. №5. – С. 7–17.
13. Лидин Р.А., Андреева Л. Л., Молочко В. А. Константы неорганических веществ: справочник / Под ред. Р. А. Лидина. - М.: Дрофа. 2006. — 685 с.
14. Мараховский Ю.Х., Мараховский К.Ю. Гастропротекция слизистой оболочки: от научных достижений к клинической практике // The Unity of Sci.: Int. Sci. Periodical J. – 2018. - №2. С. 59-65.
15. Марков Х. М. Окись азота и окись углерода—новый класс сигнальных молекул //Успехи физиол. наук. – 1996. – Т. 27. №4. – С. 30-43.
16. Муравьев В.И., Погорелов А.Г., Золотарев В.А. Восьмиканальный многофункциональный усилитель для физиологических исследований //Физиол. Журн. СССР им. И.М. Сеченова. - 1988. – Т. 74. №6. С. 878-881
17. Мыш М.Г. Секреторная функция желудка и язвенная болезнь. - Новосибирск: Наука. 1987. — 175 с.
18. Поленов С. А. Окись азота в регуляции функций желудочно-кишечного тракта // Рос. журн. Гастроэнтерол. Гепатол. Колопроктол. – 1998. – Т. 8. №. 1. – С. 53-60.
19. Разумова Н.А., Лепнев Г.П., Максимов Г.В. Время отклика потенциометрического датчика и концентрационный пределы его функционирования // Журн. Прикл. Химии. – 1985. – Т. 58. №5. – С. 993-998.
20. Разумова Н.А., Лепнев Г.П., Максимов Г.В., Вильямс М.В. Потенциометрический газовый датчик // А.с. 890217. БИ. - 1981. - №46.
21. Хропычева Р.П., Золотарев В.А., Поленов С.А. Количественная оценка роли холинергических, гастриновых и гистаминовых механизмов в регуляции продукции пепсиногена в желудке наркотизированных крыс // Бюлл. Экспер. Биол. и Мед. – 2000 -Т. 129. №1. – С. 12-15.

22. Худсон Д. Статистика для физиков. - М.: Мир. 1970. - 296 с.
23. Шульц М.М., Ершов О.С., Лепнев Г.П. Высокостабильные стеклянные электроды с внутренним твердым контактом // Журн. Прикл. Химии. – 1979 – Т. 52. №11. – С.2487-2479.
24. Aalkjaer C., Boedtkjer E., Choi I., Lee S. Cation-coupled bicarbonate transporters // Compr. Physiol. - 2014. -Vol.4. – P.1605-1637.
25. Abrahamsson H. Non-adrenergic non-cholinergic nervous control of gastrointestinal motility patterns. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. – 1986. – Vol.280 (Suppl). – P.50–61.
26. Ahern G.P. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. - P. 30429–30434.
27. Aihara E., Hayashi M., Sasaki Y., Kobata A., Takeuchi K. Mechanisms underlying capsaicin-stimulated secretion in the stomach: comparison with mucosal acidification // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 2005a. – Vol. 315. – P.423–432.
28. Aihara E., Kagawa S., Hayashi M., Takeuchi K. ACE inhibitor and ATI antagonist stimulate duodenal HCO_3^- secretion mediated by a common pathway: Involvement of PG, NO and bradykinin // J. Physiol. Pharmacol. - 2005b. -Vol. 56. – P. 391-406.
29. Aihara E., Sasaki Y., Ise F., Kita K., Nomura Y., Takeuchi K. Distinct mechanisms of acid-induced HCO_3^- secretion in normal and slightly permeable stomachs // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2006. – Vol.291. – P. G464-471
30. Akiba Y., Ghayouri S., Takeuchi T., Mizumori M., Guth P.H., Engel E., Swenson E.R., Kaunitz J.D. Carbonic anhydrases and mucosal vanilloid receptors help mediate the hyperemic response to luminal CO_2 in rat duodenum // Gastroenterology. - 2006. – Vol. 131. – P. 142–152.
31. Akiba Y., Kaunitz J.D. Luminal chemosensing and upper gastrointestinal mucosal defenses // Am. J. Clin. Nutr. – 2009. – Vol. 90. - P.826S–831S.
32. Akiba Y., Mizumori M., Kuo M., Ham M., Guth P.H., Engel E., Kaunitz J.D. CO_2 chemosensing in rat oesophagus // Gut. – 2008 Dec. – Vol. 57. – P. 1654-64.
33. Akiba Y., Takeuchi T., Mizumori M., Guth P.H., Engel E., Kaunitz J.D. TRPV-1 knockout paradoxically protects mouse gastric mucosa from acid/ethanol-induced injury by upregulating compensatory protective mechanisms // Gastroenterology. - 2006a. – Vol. 130(Suppl 2). – P. A-106.
34. Allen A., Flemström G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2005. - Vol. 288. - P. C1-19.

35. Allen A., Flemstrom G., Garner A., and Kivilaakso E. Gastroduodenal mucosal protection // *Physiol. Rev.* – 1993. - Vol. 73. – P. 823–857.
36. Allen A., Hutton D. A., Leonard A. J., Pearson J. P., Sellers L. A. The role of mucus in the protection of the gastroduodenal mucosa // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1986. - Vol. 21. Suppl 125. – P. 71–77.
37. Almasi R., Szoke E., Bolcskei K., Varga A., Riedl Z., Sandor Z., Szolcsanyi J., Petho G. Actions of 3-methyl-N-oleoyldopamine, 4-methyl-N-oleoyldopamine and N-oleoylethanolamide on the rat TRPV1 receptor in vitro and in vivo // *Life Sci.* – 2008. - Vol. 82. – P. 644–651.
38. Amagase K., Izumi N., Takahira Y., Wada T., Takeuchi K. Importance of cyclooxygenase-1/prostacyclin in modulating gastric mucosal integrity under stress conditions // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2014. - Vol. 29. Suppl 4. – P. 3-10.
39. Aoi M., Aihara E., Nakashima M., Takeuchi K. Participation of prostaglandin receptor EP4 subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats // *Am. J. Physiol.* – 2004. - Vol. 287. - P. G96-G103.
40. Araki H., Ukawa H., Sugawa Y., Yagi K., Suzuki K., Takeuchi K. The roles of prostaglandin E receptor subtypes in the cytoprotective action of prostaglandin E2 in rat stomach // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2000. - 14 Suppl. 1. – P. 116–124.
41. Arvidsson J., Ygge J. A quantitative study of the effects of neonatal capsaicin treatment of subsequent peripheral nerve transection in the adult rat // *Brain Res.* – 1986. - Vol. 397. – P. 130-136.
42. Atuma C., Strugala V., Allen A., Holm L. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2001. - Vol. 280. – P. G922-929.
43. Baak L.C., Biemond I., Jansen J.B., Lamers C.B. Repeated intravenous bolus injections of omeprazole: effects on 24-hour intragastric pH, serum gastrin, and serum pepsinogen A and C // *Scand. J. Gastroenterol.* - 1991a. - Vol. 26. – P. 737-746.
44. Baak L.C., Jansen J.B., Biemond I., Lamers C.B. Weekend treatment with 20 and 40 mg omeprazole: effect on intragastric pH, fasting and postprandial serum gastrin, and serum pepsinogens // *Gut.* - 1991b. - Vol. 32. – P. 977-982.
45. Babbedge R. C., Bland-Ward P. A., Hart S. L., Moore P. K. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitro indazole and related substituted indazoles // *Br. J. Pharmacol.* - 1993. - Vol. 110. P. 225-8.

46. Bachmann O., Sonnentag T., Siegel W.K., Lamprecht G., Weichert A., Gregor M., Seidler U. Different acid secretagogues activate different Na^+/H^+ exchanger isoforms in rabbit parietal cells // *Am. J. Physiol.* – 1998. - Vol. 275. - No 5(1). – P. G1085-93.
47. Bahari H.M., Ross I.N., Turnberg L.A. Demonstration of a pH gradient across the mucus layer on the surface of human gastric mucosa in vitro // *Gut.* – 1982. - Vol. 23. – P. 513-6.
48. Barrachina M.D., Whittle B.J.R., Moncada S. and Esplugues J.V. Endotoxin inhibition of distention-stimulated gastric acid secretion in rat: Mediation by NO in the central nervous system // *Br. J. Pharmacol.* – 1995. - Vol. 114. – P.8–12.
49. Basson M.D., Adrian T.E., Modlin I.M. Dissociation of pepsinogen and acid secretion in the guinea pig // *Gastroenterology.* – 1988. - Vol. 95. – P. 321-6.
50. Baumgartner H.K., Montrose M.H. Regulated alkali secretion acts in tandem with unstirred layers to regulate mouse gastric surface pH // *Gastroenterology.* – 2004. - Vol. 126. – P. 774-83.
51. Beckman J., Koppenol W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly // *Am. J. Physiol.* – 1996. - Vol. 271. – P. C1424-C1437
52. Beinborn W., Schrammel W., Hennies S. Characterization of prostaglandin E2 receptors antagonizing pepsinogen secretion of porcine chief cells // *Gastroenterology* – 1989. - Vol. 96. – P. 37.
53. Bell A.E., Sellers L.A., Allen A., Cunliffe W.J., Morris E.R., Ross-Murphy S.B. Properties of gastric and duodenal mucus: effect of proteolysis, disulfide reduction, bile, acid, ethanol, and hypertonicity on mucus gel structure // *Gastroenterology.* – 1985. - Vol. 88(1 Pt 2). - P. 269-80.
54. Bennett A., Friedmann C.A., Vane J.R. Release of prostaglandin E-1 from the rat stomach // *Nature* – 1967. - Vol. 216. – P. 873—876.
55. Bentley J.K., Beavo J.A. Regulation and function of cyclic nucleotides // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1992. - Vol. 4. – P. 233–240.
56. Berg A., Redeen S., Ericson A.C., and Sjostrand S.E. Nitric oxide—an endogenous inhibitor of gastric acid secretion in isolated human gastric glands // *BMC Gastroenterol.* – 2004. - Vol. 4. – P. 16.
57. Berg A., Redéen S., Grenegard M., Ericson A.C., Sjöstrand S.E. Nitric oxide inhibits gastric acid secretion by increasing intraparietal cell levels of cGMP in isolated human gastric glands // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2005. - Vol. 289. P. G1061-6.

58. Berthoud H.R. Morphological analysis of vagal input to gastrin releasing peptide and vasoactive intestinal peptide containing neurons in the rat glandular stomach // *J. Comp. Neurol.* – 1996. - Vol. 370. – P. 61–70.
59. Bertrand P.P., Kunze W.A., Bornstein J.C., Furness J.B., Smith M.L. Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa. *Am. J. Physiol.* – 1997. - Vol. 273. – P. G422–G435.
60. Bevan S., Szolcsanyi J. Sensory neurone-specific actions of capsaicin-mechanisms and applications // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1990 - Vol. 11. P. 330-333.
61. Bilski J., Konturek P.C., Konturek S.J, Cieszkowski M., Czarnobilski K. Role of endogenous nitric oxide in the control of gastric acid secretion, blood flow and gastrin release in conscious dogs // *Regul. Pept.* – 1994. - Vol. 53. – P. 175-84.
62. Birder L.A., Kanai A.J., De Groat W.C., Kiss S., Nealen M.L., Burke N.E., Dineley K.E., Watkins S., Reynolds I.J. & Caterina M.J. (2001). Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2001. - Vol. 98. – P. 13396–13401.
63. Blackshaw L.A., Page A.J., Partosoedarso E.R. Acute effects of capsaicin on gastrointestinal vagal afferents// *Neuroscience.* – 2000. -Vol. 96. -No 2. -P. 407-16.
64. Blandizzi C., Colucci R., Carignani D., Lazzeri G., Del Tacca M. Positive modulation of pepsinogen secretion by gastric acidity after vagal cholinergic stimulation // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1997. - Vol.283(3). – P.1043-50.
65. Blandizzi C., Colucci R., Carignani D., Natale G., Lazzeri G., Crema F., Del Tacca M. Central administration of cholecistokinin stimulates gastric pepsinogen secretion from anaesthetized rats // *Neurosci. Lett.* – 1995. - Vol. 193. – P. 13-16.
66. Bliski A.J., Halliday S.E, Fitzgerald J.D., Wale J.D. The pharmacology of b-2-selective adrenoreceptor antagonist ICI-118,551 // *J. Cardio. Pharmacol.* – 1983. - Vol. 5. – P. 430-7.
67. Bojamic D., Jansen J.D., Nahyrski S.R., Zaagsma J. Atypical characteristic of the b-adrenoreceptor mediating cyclic AMP generation and lipolysis in the rat adipocyte // *Br. J. Pharmacol.* – 1985. - Vol. 84. – P. 131-7.
68. Boku K., Ohno T., Saeki T., Hayashi H., Hayashi I., Katori M., Murata T., Narumiya S., Saigenji K., Majima M. Adaptive cytoprotection mediated by prostaglandin I(2) is attributable to sensitization of CRGP-containing sensory nerves // *Gastroenterology.* – 2001. - Vol. 120. – P. 134-43.
69. Bolton J.P., Cohen M.M. Stimulation of non-parietal secretion in canine Heidenhain pouches by 16,16-dimethyl prostaglandin E2 // *Digestion.* – 1978. - Vol. 17. – P. 291-299.

70. Bolz S.S., Pohl U. Indomethacin enhances endothelial NO release – evidence for a role of PGI₂ in the autocrine control of calcium-dependent autacid production // *Cardiovasc. Res.* – 1997. - Vol. 36. – P. 437–444.
71. Bonar P.T, Casey J.R. Plasma membrane Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers: structure, mechanism and physiology // *Channels (Austin)*. – 2008. - Vol. 2(5). – P. 337-45.
72. Bondot J.P, Cavero I, Fernad S, Lefevre-Borg P, Hersey S.J. Cellular basis of pepsinogen secretion. / In: *Handbook of Physiology. Alimentary canal. The gastrointestinal system.* // Schult S.G., Forte J.G., Rauner B.B. eds. Am. Physiol. Soc. Bethesda: Maryland. 1989. III: 267-78p.
73. Boulos C., Jiang H., Balaz M. Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2000. - Vol. 293. - P. 222–229.
74. Bredt D.S, Hwang P.M, Snyder S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide // *Nature*. – 1990. - Vol. 347. – P. 768 –770.
75. Brown J. F., Tepperman B. L., Hanson P. J., Whittle B. J., Moncada S. Differential distribution of nitric oxide synthase between cell fractions isolated from the rat gastric mucosa // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1992b. - Vol. 184. – P. 680-5.
76. Brown J.F., Hanson P.J., Whittle B.J. Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach // *Eur. J. Pharmacol.* – 1992a. - Vol. 223. – P.103–104.
77. Brown J.F., Hanson P.J., Whittle B.J.R. The nitric oxide donor, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, inhibits secretory activity in rat isolated parietal cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993a. – Vol. 185. - P. 1354–1359.
78. Brown J.F., Keates A.C., Hanson P.J., Whittle B.J. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells // *Am. J. Physiol.* – 1993b - Vol. 265. – P. G418–G422.
79. Brown J.F., Tepperman B.L., Hanson P.J., Whittle B.J., Moncada S. Differential distribution of nitric oxide synthase between cell fractions isolated from the rat gastric mucosa // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1992b. - Vol. 184. – P. 680–685.
80. Brown J.F., Tepperman B.L., Hanson P.J., Whittle B.J.R. Lipopolysaccharide induces Ca²⁺-independent nitric oxide synthase activity in rat gastric mucosal cells // *Eur. J. Pharmacol.* – 1994. - Vol. 292. – P. 111–114.
81. Browning K.N., Verheijden S., Boeckxstaens G.E. The vagus nerve in appetite regulation, mood, and intestinal inflammation // *Gastroenterology*. – 2017. - Vol. 152. – P.730–744.

82. Brun-Pascaud M., Gaudebout C., Blayo M.C., Pocidalo J.J. Arterial blood gases and acid-base status in awake rats // *Respir. Physiol.* – 1982. - Vol. 48. – P. 45-57.
83. Brzozowski T. Hot Topic: Novel physiological and pharmacological avenues in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing // *Curr. Medicinal Chem.* – 2012. - Vol. 19. – P. 2-3.
84. Brzozowski T., Konturek P.C., Drozdowicz D.. Role of central and peripheral ghrelin in the mechanism of gastric mucosal defence // *Inflammopharmacology.* – 2005. - Vol. 13. P. 45–62.
85. Brzozowski T., Konturek P.C., Pajdo R., Ptak-Belowska A., Kwiecien S., Pawlik M., Drozdowicz D., Sliwowski Z., Brzozowski B., Konturek S.J., Pawlik W.W. Physiological mediators in nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)-induced impairment of gastric mucosal defense and adaptation. Focus on nitric oxide and lipoxins // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2008. - Vol.59. Suppl 2. – P. 89-102.
86. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission // *Physiol. Rev.* – 2007. - Vol. 87. – P. 659–797.
87. Burrell M.A., Montuenga L.M., García M., Villaro A.C. Detection of nitric oxide synthase (NOS) in somatostatin-producing cells of human and murine stomach and pancreas // *J. Histochem. Cytochem.* – 1996. - Vol. 44. - P. 339 –346.
88. Bush M. A., Pollack G. M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 7-nitroindazole, a selective nitric oxide synthase inhibitor, in the rat hippocampus // *Pharm. Res.* – 2001. - Vol. 18. - P. 1607—1612.
89. Byrne C.R., Price K.J., Williams J.M., Brown J.F., Hanson P.J., Whittle B.J. Nitric oxide synthase and arginase in cells isolated from the rat gastric mucosa // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. - Vol. 1356. – P.131–139.
90. Calatayud S., Barrachina D., Esplugues J.V. Nitric oxide: relation to integrity, injury, and healing of the gastric mucosa // *Microsc. Res. Tech.* - 2001a. - Vol.53(5). – P. 325-35.
91. Canani R.B, Terrin G. Gastric acidity inhibitors and the risk of intestinal infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2010. - Vol. 26. – P. 31-5.
92. Cao E., Liao M., Cheng Y., Julius D. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms // *Nature.* – 2013. - Vol. 504(7478). – P.113-8.
93. Carobi C. A quantitative investigation of the effects of neonatal capsaicin treatment on vagal afferent neurons in the rat // *Cell Tissue Res.* – 1996. - Vol. 283. – P. 305-11.

94. Caroppo R., Debellis L., Valenti G., Alper S., Frömter E, Curci S. Is resting state HCO_3^- secretion in frog gastric fundus mucosa mediated by apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange? // *J. Physiol.* – 1997. - Vol. 499 (Pt 3). – P. 763-71.
95. Cary S.P., Winger J.A., Derbyshire E.R., Marletta M.A. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off // *Trends Biochem. Sci.* – 2006. - Vol. 31. – P. 231-9.
96. Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway // *Nature.* – 1997. – Vol. 389. – P. 816–824.
97. Cave T.R, Cave D.R. Helicobacter pylori stimulates pepsin secretion from isolated rabbit gastric glands // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1991. - Vol. 181. – P. 9–14.
98. Chandrasekharan N.V., Dai H., Roos K.L., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. - Vol. 99. – P. 13926–13931.
99. Chen H.F., Lee B.P., Kou Y.R. Two subgroups of lung vagal C-fibers with different vulnerabilities to blockades by perivagal capsaicin and vagal cooling in dogs// *Chin. J. Physiol.* – 1999. -Vol. 42. -No 4. -P. 219-25.
100. Chen R. Y., Li D. S., Guth P. H. Role of calcitonin gene-related peptide in capsaicin-induced gastric submucosal arteriolar dilation // *Am. J. Physiol.* – 1992. – Vol. 262(5 Pt 2). – P. H1350-5.
101. Chen R.Y., Guth P.H. Interaction of endogenous nitric oxide and CGRP in sensory neuron-induced gastric vasodilation // *Am. J. Physiol.* – 1995. - Vol. 268. – P. G791-G796.
102. Cheng J.K., Ji R.R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain // *Neurochem. Res.* – 2008. - Vol. 33. – P. 1970-8.
103. Chew C.S. Parietal cell protein kinases. Selective activation of type I cAMP-dependent protein kinase by histamine // *J. Biol. Chem.* – 1985. - Vol. 260. – P. 7540–50
104. Chiou S.K., Tanigawa T., Akahoshi T. Survivin: a novel target for indomethacin-induced gastric injury // *Gastroenterology.* – 2005 - Vol. 128. – P. 63–73.
105. Chittajallu R.S., Dorrian C.A., Ardill J.E. Effect of Helicobacter pylori on serum pepsinogen I and plasma gastrin in duodenal ulcer patients // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1992. - Vol. 27. – P. 20–4.
106. Cho C.H., Chen B.W., Hui W.M., Lam S.K., Ogle C.W. The role of the vagus nerve in the protective action of acid inhibitors on ethanolinduced gastric mucosal damage in rats // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 1992. - Vol. 7. – P. 178–183.

107. Cho C.H., Ko J.K., Tang X.L. The differential mechanisms of mild irritants on adaptive cytoprotection // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 1994b. - Vol. 9. Suppl 1. – P. S24-8.
108. Chu S., Tanaka S., Kaunitz J.D., Montrose M.H. Dynamic regulation of gastric surface pH by luminal pH // *J. Clin. Invest.* – 1999. - Vol. 103. – P. 605-12.
109. Cirino G., Wheeler-Jones C.P, Wallace J.L., Del Soldato P., Baydoun A.R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by novel nonsteroidal anti-inflammatory derivatives with gastrointestinal-sparing properties // *Br. J. Pharmacol.* – 1996. - Vol. 117. – P. 1421-1426.
110. Clapham D.E. TRP channels as cellular sensors // *Nature* – 2003. - Vol. 426. – P. 517–524.
111. Coceani F., Pace-Asciak C., Volta F., Wolfe L.S. Effect of nerve stimulation on prostaglandin formation and release from the rat stomach // *Am. J. Physiol.* - 1967. - Vol. 213. – P. 1056—1064.
112. Coffin B., Chollet R., Flourie B, Lemann M., Franchisseur C, Rambaud J.C., Jian R. Intraluminal modulation of gastric sensitivity to distension: effects of hydrochloric acid and meal // *Am. J. Physiol.* – 2001. - Vol. 280. – P. G904–G909.
113. Coleman R.A., Smith W.L., Narumiya S. Classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes // *Pharmacol. Rev.* – 1994. - Vol. 46. – P. 205-229.
114. Conti M.A., Adelstein R.S. The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 39:59 cAMP-dependent protein kinase // *J. Biol. Chem.* – 1981. - Vol. 256. – P. 3178–3181.
115. Coskun T., Chu S., Montrose M. H. Intra gastric pH regulates conversion from net acid to net alkaline secretion by the rat stomach // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2001. - Vol. 281. – P. G870-7.
116. Cox K.H., Adair-Kirk T.L., Cox J.V. Variant AE2 anion exchanger transcripts accumulate in multiple cell types in the chicken gastric epithelium // *J. Biol. Chem.* – 1996. - Vol. 271. – P. 8895-902.
117. Crampton J.R., Gibbons L.C., Rees W.D.W. Effect of luminal pH on the output of bicarbonate and PGE2 by the normal human stomach // *Gut* . – 1987. - Vol. 28. – P. 1291-5.
118. Cross S.A.M. Ultrastructural localization of carbonic anhydrase in rat stomach parietal cells // *Histochemie.* – 1970. - Vol. 22. – P. 219–225.

119. Curro D., Volpe A.R., Preziosi P. Nitric oxide synthase activity and non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the rat gastric fundus // *Br. J. Pharmacol.* – 1996. - Vol. 117. – P. 717–723.
120. Cuzzocrea S., Salvemini D. Molecular mechanisms involved in the reciprocal regulation of cyclooxygenase and nitric oxide synthase enzymes // *Kidney Int.* – 2007. - Vol. 71. – P. 290–7.
121. Danzer M., Jovic M., Samberger C., Painsipp E., Bock E., Pabst M.A., Crailsheim K., Schicho R., Lippe I.T., Holzer P. Stomach-brain communication by vagal afferents in response to luminal acid backdiffusion, gastrin, and gastric acid secretion // *Am. J. Physiol.* – 2004. - Vol. 286. – P. G403–G411.
122. Debellis L., Caroppo R., Frömter E., Curci S. Alkaline secretion by frog gastric glands measured with pH microelectrodes in the gland lumen // *J. Physiol.* – 1998. - Vol. 513(Pt 1). – P. 235–241.
123. Demitrack E.S., Soleimani M., Montrose M.H. Damage to the gastric epithelium activates cellular bicarbonate secretion via SLC26A9 Cl⁻/HCO₃⁻ // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2010. - Vol. 299. – P. G255–64.
124. Desai K.M., Zembowicz A., Sessa W.C., Vane J.R. Nitroergic nerves mediate vagally induced relaxation in the isolated stomach of the guinea pig // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1991. - Vol. 88. P. 11490–4.
125. DiDonato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., Zandi E., Karin M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B // *Nature.* – 1997. - Vol. 388. – P. 548–54.
126. DiMarzo V., Bisogno T., Melck D., Ross R., Brockie H., Stvenson L., Pertwee R.C., DePetrocellis L. Interaction between synthetic vanilloids and endogenous cannabinoid systems // *FEBS Lett.* – 1998. - Vol. 436. -P. 449–454.
127. Ding M., Kinoshita Y., Kishi K. Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract // *Prostaglandins.* – 1997. - Vol. 53. – P. 199–216.
128. Doni M.G., Whittle B.J., Palmer R.M., Moncada S. Actions of nitric oxide on the release of prostacyclin from bovine endothelial cells in culture // *Eur. J. Pharmacol.* – 1988. - Vol. 151. – P. 19–25.
129. Duman J.G., Pathak N.J., Ladinsky M.S. Three-dimensional reconstruction of cytoplasmic membrane networks in parietal cells // *J. Cell Sci.* – 2002. - Vol. 115(Pt 6). – P. 1251–1258.
130. Duprat F., Lauritzen I., Patel A., Honoré E. The TASK background K²P channels: chemo- and nutrient sensors // *Trends Neurosci.* – 2007. - Vol. 30. – P. 573–580.

131. Eckly A.E., Lugnier C. Role of phosphodiesterase III and IV in the modulation of vascular cyclic AMP content by the NO/cyclic GMP pathway // *Br. J. Pharmacol.* – 1994. - Vol. 113. – P. 445–450.
132. Egan R.W., Paxton J., Kuehl F.A.Jr. Mechanism for irreversible selfdeactivation of prostaglandin synthetase // *J. Biol. Chem.* - 1976. - Vol. 251. - P. 7329–7335.
133. Ekblad E., Ekelund M., Graffner H., Hakanson R., Sundler F. Peptide-containing nerve fibers in the stomach wall of rat and mouse // *Gastroenterology.* – 1985 - Vol. 89. – P. 73–85.
134. Elliott S.N., Wallace J.L. Nitric oxide: a regulator of mucosal defense and injury // *J. Gastroenterol.* – 1998. - Vol. 33. – P. 792-803.
135. Engel E.I., Guth P.H., Nishizaki Y., Kaunitz J.D. Barrier function of the gastric mucus gel // *Am. J. Physiol.* – 1995. - Vol. 269(6 Pt 1). – P. G994-9.
136. Esplugues J.V., Barrachina M.D., Beltran B., Calatayud S., Whittle B.J.R. and Moncada S. Inhibition of gastric acid secretion by stress: A protective reflex mediated by cerebral nitric oxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. - Vol. 93. – P. 14839–14844.
137. Fändriks L., Stage L. Simultaneous measurements of gastric motility and acid-bicarbonate secretions in the anaesthetized cat / *Acta Physiol. Scand.* – 1986. - Vol. 128. – P. 563-73.
138. Feitelberg S.P., Hogan D.L., Koss M.A., Isenberg J.I. pH threshold for human duodenal bicarbonate secretion and diffusion of CO₂ // *Gastroenterology.* – 1992. - Vol. 102. – P. 1252–58
139. Feldman M., Goldschmiedt M. Gastric HCO₃⁻ secretion: relationship with Na⁺ secretion and effect of acetazolamide in humans // *Am. J. Physiol.* – 1991. - Vol. 261. – P. G320-6
140. Feng G., Wang Q., Xu X., Liu Z., Li Z., Liu G. The protective effects of calcitonin gene-related peptide on gastric mucosa injury of gastric ischemia reperfusion in rats // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* – 2011. - Vol. 33. – P. 84–89.
141. Fernandez P.C., Cohen R.M., Feldman G.M. The concept of bicarbonate distribution space: The crucial role of body buffers // *Kidney Int.* – 1989. - Vol. 36. – P. 747– 752.
142. Ferro A., Queen L.R., Priest R.M., Xu B., Ritter J.M., Poston L., and Ward J.P. Activation of nitric oxide synthase by β₂-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro // *Br. J. Pharmacol.* – 1999. - Vol. 126. – P. 1872–1880.
143. Filaretova L., Bagaeva T., Podvigina T. Various ulcerogenic stimuli are potentiated by glucocorticoid deficiency in rats // *J. Physiol. Paris.* – 2001. - Vol. 95. – P. 59–65.
144. Filaretova L., Podvigina T., Bagaeva T. Gastroprotective role of glucocorticoid hormones // *J. Pharmacol. Sci.* – 2007. - Vol. 104. – P. 195–201.

145. Filaretova L.P., Filaretov A.A., Makara G.B. Corticosterone increase inhibits stress-induced gastric erosions in rats // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 1998. - Vol. 274. – P. G1024–G1030.
146. Fiorucci S., Distrutti E., Santucci L., Morelli A. Leukotrienes stimulate pepsinogen secretion from guinea pig gastric chief cells by nitric oxide-dependent pathway // *Gastroenterology.* - 1995b. - Vol. 108. – P. 1709-19.
147. Fiorucci S., Santucci L., Gresele P., Luinetti O., Morelli A. Effect of NSAIDs on pepsinogen secretion and calcium mobilization in isolated chief cells // *Am. J. Physiol.* – 1995c. - Vol. 268(6 Pt 1). – P. G968-78.
148. Fiorucci S., Distrutti E., Chiorean M., Santucci L., Belia S., Fano G., De Giorgio R., Stanghellini V., Corinaldesi R., Morelli A. Nitric oxide modulates pepsinogen secretion induced by calcium-mediated agonist in guinea pig gastric chief cells // *Gastroenterology.* - 1995a. - Vol. 109. – P. 1214-23.
149. Flatt P.R., Swanston-Flatt S.K., Bailey C.J., McGregor G.P., Conlon J.M. Substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide during development of the rat gastrointestinal tract // *Regul. Pept.* – 1991. - Vol. 33. – P. 313-20.
150. Flemström G. Active alkalization by amphibian gastric fundic mucosa in vitro // *Am. J. Physiol.* – 1977. - Vol. 233. – P. E1-12.
151. Flemstrom G. Cl^- dependence of HCO_3^- transport in frog gastric mucosa // *Ups. J. Med. Sci.* – 1980a. - Vol. 85. – P. 303–309.
152. Flemstrom G. Gastric and duodenal mucosal bicarbonate secretion / In: *Physiology of Gastrointestinal Tract* (3rd ed.), edited by Johnson L.R.J.E., Christensen J., Alpers D., and Walsh J.H. - New York: Raven. – 1994. - P. 1285–1309.
153. Flemstrom G., A. Garner. Effect of parathyroid hormone on bicarbonate secretion in the guinea-pig stomach and the amphibian isolated gastric mucosa // *CZin. Sci.* – 1981 - Vol. 60. – P. 427-433.
154. Flemström G., Garner A. Gastroduodenal HCO_3^- transport: characteristics and proposed role in acidity regulation of mucosal protection // *Am. J. Physiol.* - 1982. - Vol. 242. – P. G182–93
155. Flemström G., Sachs T.G. Ion transport by amphibian antrum in vitro. I. General characteristics // *Am. J. Physiol.* – 1975. - Vol. 228. – P. 1188-98.
156. Flemström G.I., Isenberg J.I. Gastroduodenal mucosal alkaline secretion and mucosal protection // *News Physiol. Sci.* – 2001. - Vol. 16. - P.23-8.

157. Forssell H. Studies on gastric bicarbonate secretion in man // *Acta Chir. Scand. Suppl.* – 1987. - Vol. 540. - P. 1-12
158. Forstermann U., Kleinert H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 1995. - Vol. 352. – P.351–364.
159. Forte J.G., Soll A. Cell biology of hydrochloric acid secretion. // *See Ref.* - 1989. - Vol. 153. – P.207–28
160. Forte T.M., Machen T.E., Forte J.G. Ultrastructural changes in oxyntic cells associated with secretory function: a membrane-recycling hypothesis // *Gastroenterology.* – 1977. - Vol. 73. – P. 941–55
161. Foschi D., Castoldi L., del Soldato P., Musazzi M., Callioni F., Rovati V., Trabucchi E, Montorsi W. Effects of autonomic nervous system on gastric damage by ethanol in the rat // *Dig. Dis. Sci.* – 1989. - Vol. 34. – P. 688–693.
162. Francis S.H., Busch J.L., Corbin J.D., Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action // *Pharmacol. Rev.* – 2010. - Vol. 62. – P. 525 – 563.
163. Franco L., Talamini G. Cross-talk between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase in *Helicobacter-pylori* -induced gastritis // *Med. Princ. Pract.* – 2009. - Vol. 18. – P. 477–481
164. Funatsu T., Chono K., Hirata T., Keto Y., Kimota A., Sasamata M. Mucosal acid causes gastric mucosal microcirculatory disturbance in nonsteroidal anti-inflammatory drug-treated rats // *Eur. J. Pharmacol.* – 2007. - Vol. 554. – P. 53–59.
165. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // *Nature.* – 1980. - Vol. 288. - P. 373–376.
166. Furness J.B., Kunze W.A., Bertrand P.P., Clerc N., Bornstein J.C. Intrinsic primary afferent neurons of the intestine // *Prog. Neurobiol.* – 1998. - Vol. 54. – P. 1–18.
167. Furukawa O., Hirokawa M., Zhang L. Mechanism of augmented duodenal HCO_3^- secretion after luminal CO_2 // *Am. J. Physiol.* - 2005. - Vol. 288. – P. G557–63
168. Furukawa O., Kawauchi S., Mimaki H., Takeuchi K. Stimulation by nitric oxide of HCO_3^- secretion in bullfrog duodenum in vitro -roles of cyclooxygenase-1 and prostaglandins // *Med. Sci. Monit.* – 2000. - Vol. 6. – P. 454-9.
169. Furukawa O., Kitamura M., Sugamoto S., Takeuchi K. Stimulatory effect of nitric oxide on bicarbonate secretion in bullfrog duodenum in vitro // *Digestion.* – 1999. - Vol. 60. – P. 324-31.

170. Gabello M., Valenzano M. C., Barr M., Zurbach P., Mullin J. M. Omeprazole induces gastric permeability to digoxin // *Dig. Dis. Sci.* – 2010. - Vol. 55. – P. 1255-63.
171. Gamse, R. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 1982. - Vol. 320. – P. 205-216.
172. Gańko, M., Całka, J. Localization and chemical coding of the dorsal motor vagal nucleus (DMX) neurons projecting to the porcine stomach prepyloric area in the physiological state and after stomach partial resection // *J. Mol. Neuroscience.* – 2013. - Vol. 52. – P. 90–100.
173. Gannon B., Browning J., O'Brien P. The microvascular architecture of the glandular mucosa of rat stomach // *J. Anat.* – 1982. - Vol. 135(Pt 4). – P. 667-83.
174. García-Martínez C., Morenilla-Palao C., Planells-Cases R., Merino J.M., and FerrerMontiel A. Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties // *J. Biol. Chem.* – 2000. - Vol. 275. – P. 32552–32558.
175. García-Vitoria M., García-Corchon C., Rodríguez J.A., García-Amigot F., Burrell M.A. Expression of neuronal nitric oxide synthase in several cell types of the rat gastric epithelium // *J. Histochem. Cytochem.* – 2000. - Vol. 48. – P. 1111–1120.
176. Garner A., Flemström G. Gastric HCO_3^- secretion in the guinea pig // *Am. J. Physiol.* – 1978. - Vol. 234. – P. E535-41.
177. Garner A., Flemström G., Allen A., Heylings J.R., McQueen S. Gastric mucosal protective mechanisms: roles of epithelial bicarbonate and mucus secretions // *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* – 1984. - Vol. 101. – P. 79-86.
178. Gascoigne A.D., Hirst B.H. Prostaglandins alter the relationship between gastric hydrogen ion concentration and flow: evidence for stimulation of non-parietal secretion in the cat // *J. Physiol.* – 1981. - Vol. 316. – P. 427-38.
179. Gates T.S., Zimmerman R.P., Mantyh C.R., Vigna S.R., Mantyh P.W. Calcitonin gene-related peptide-alpha receptor binding sites in the gastrointestinal tract // *Neuroscience.* - 1989. - Vol. 31. – P. 757-70.
180. Gawenis L.R., Ledoussal C., Judd L.M., Prasad V., Alper S.L., Stuart-Tilley A., Woo A.L., Grisham C., Sanford L.P., Doetschman T., Miller M.L., Shull G.E. Mice with a targeted disruption of the AE2 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger are achlorhydric // *J. Biol. Chem.* – 2004. - Vol. 279. – P. 30531-9
181. Gazzieri D., Trevisani M., Springer J., Harrison S., Cottrell G.S., Andre E. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. - Vol.4. – P. 581-589.
182. Geppetti P., Holzer P. *Neurogenic Inflammation* / Boca Raton FL. - CRC Press. – 1996.

[Type here]

183. Gerbino A., Fistetto G., Colella M., Hofer A.M., Debellis .L, Caroppo L., Curci S. Real time measurements of water flow in amphibian gastric glands // J. Biol. Chem. – 2007. - Vol. 282. – P. 13477–13486.
184. Gibert A.J., Hersey S.J. Exocytosis in isolated gastric glands induced by secretagogues and hyperosmolarity // Cell Tissue Res. – 1982. - Vol. 227. – P. 535-42.
185. Gibson R., Hirschowitz B.I., Hutchison G. Actions of metiamide, an H₂ histamine receptor antagonist, on gastric H⁺ and pepsin secretion in dogs // Gastroenterology. – 1977. - Vol. 67. – P. 93-9.
186. Gibson S.J., McGregor G., Bloom S.R., Polak J.M., Wall P.D. Local application of capsaicin to one sciatic nerve of the adult rat induces a marked depletion in the peptide content of the lumbal dorsal horn// Neurosci. – 1982. – Vol. 7. -P. 3153-3162.
187. Goddard P.J., Kao Y.C., Lichtenberger L.M. Luminal surface hydrophobicity of canine gastric mucosa is dependent on a surface mucous gel // Gastroenterology. – 1990. - Vol. 98. – P. 361-70.
188. Goldstein S.A., Bayliss D.A., Kim D., Lesage F., Plant L.D., Rajan S. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels // Pharmacol. Rev. – 2005. - Vol. 57. – P. 527–540.
189. Goodwin D.C., Gunthe, M.R., Hsi L.C. Nitric oxide trapping of tyrosyl radicals generated during prostaglandin endoperoxide synthase turnover. Detection of the radical derivative of tyrosine 385 // J. Biol. Chem. - 1998. - Vol. 273. - P. 8903–8909.
190. Grandl J., Kim S.E, Uzzell V., Bursulaya B., Petrus M., Bandell M., Patapoutian A. Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain // Nat. Neurosci. – 2010. - Vol. 13. – P. 708-14.
191. Green T., Dockray G.J. Characterization of the peptidergic afferent innervation of the stomach in the rat, mouse and guinea-pig // Neuroscience. - 1988. - Vol. 1. – P. 181-193.
192. Gretzer B., Maricic N., Respondek M., Schuligoi R, Peskar B.M. Effects of specific inhibition of cyclo-oxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the rat stomach with normal mucosa and after acid challenge // Br. J Pharmacol. – 2001. - Vol. 132. – P. 1565-73.
193. Gritti I., Banfi G., Roi G.S. Pepsinogens: physiology, pharmacology pathophysiology and exercise // Pharmacol. Res. – 2000. - Vol. 41. – P. 265-81.
194. Gryglewski R.J., Palmer R.M., Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium derived vascular relaxing factor // Nature. - 1986.- Vol. 320. - P. 454–456.
195. Guggino W.B., Stanton B.A. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2006. - Vol. 7. – P. 426–436.

196. Guo A., Vulchanova L., Wang J., Li X., Erde R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): Relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites // *Europ. J. Neurosci.* – 1999. - Vol. 11. – P. 946-958.
197. Guo J.J., Browning K.N., Rogers R.C., Travagli R.A. Catecholaminergic neurons in rat dorsal motor nucleus of vagus project selectively to gastric corpus // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2001. - Vol. 280. – P. G361–G367.
198. Guth P.H. Current concepts in gastric microcirculatory pathophysiology // *Yale J. Biol. Med.* – 1992. - Vol. 65. – P. 677–688.
199. Guth P.H., Aures D., Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat. Cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine // *Gastroenterology.* – 1979. - Vol. 76. – P. 88-93.
200. Guth P.H., Smith E. Neural control of gastric mucosal blood flow in the rat // *Gastroenterology.* – 1975. - Vol. 69. – P. 935-940.
201. Gyires K., Nemeth J., Zadori Z.S. Gastric mucosal protection and central nervous system // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. - Vol. 19. – P. 34-39.
202. Hanson PJ, Hatt JF. 1989. Intracellular signalling and regulation of gastric acid secretion. *Q. J. Exp. Physiol.* 74:607–34
203. Hajjar D., Lander H., Pearce S., Upmacis R., Pomerantz K.B. Nitric oxide enhances prostaglandin-H synthase-1 activity by a hemeindependent mechanism: evidence implicating nitrosothiols // *J. Am. Chem. Soc.* – 1995. - Vol. 117. – P. 3340–3346.
204. Harada N., Okajima K., Uchiba M., Katsuragi T. Ischemia/reperfusion-induced increase in the hepatic level of prostacyclin is mainly mediated by activation of capsaicin-sensitive sensory neurons in rats // *J. Lab. Clin. Med.* – 2002. - Vol. 139. – P. 218-226.
205. Harden T.K., Tanner L.I., Martin M.W., Nakahata N., Hughes A.R., Hepler J.R., Evans T., Masters S.B., Brown J.H. Characteristics of two biochemical responses to stimulation of muscarinic receptors // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1986. - Vol. 7. - P. 14-8.
206. Hasebe K., Horie S., Noji T., Watanabe K., Yano S. Stimulatory effects of endogenous and exogenous nitric oxide on gastric acid secretion in anesthetized rats // *Nitric Oxide. Dec.* – 2005. - Vol. 13. – P. 264-71.
207. Haukeland H.H., Waldum H.L., Johnsen J.A. Effect of proximal gastric vagotomy on insulin induced gastric Hq and pepsin secretion and serum group I pepsinogen // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1982. - Vol. 17. – P. 555-9

208. Hawkey C.J., Rampton D.S. Prostaglandins and the gastrointestinal mucosa: are they important in its function, disease, or treatment? // *Gastroenterology*. – 1985. - Vol. 89. – P. 1162-88.
209. Hayashi H., Ohno T., Nishiyama K., Boku K., Katori M., Majima M. Transient prevention of ethanol-induced gastric lesion by capsaicin due to release of endogenous calcitonin gene-related peptide in rats // *Jpn. J. Pharmacol.* – 2001. - Vol. 86. – P. 351–354.
210. Helander H.F. Quantitative ultrastructural studies on rat gastric zymogen // *Cell Tissue Res.* – 1965. - Vol. 189. – P. 287-303.
211. Helander K.G., Bamberg K., Sachs G., Melle D., and Helander H.F. Localization of mRNA for the muscarinic M1 receptor in rat stomach // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1996. - Vol. 1312. – P. 158–162.
212. Henagan J.M., Smith G.S., Seidel E.R., Miller T.A. Influence of vagotomy on mucosal protection against alcohol-induced gastric damage in the rat // *Gastroenterology*. – 1984. - Vol. 87. - P. 903–908.
213. Henriksnäs J., Phillipson M, Storm M., Engstrand L., Soleimani M., Holm L. Impaired mucus-bicarbonate barrier in *Helicobacter pylori*-infected mice // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2006. - Vol. 291. – P. G396-403
214. Herring N., Paterson D.J. Nitric oxide-cGMP pathway facilitates acetylcholine release and bradycardia during vagal nerve stimulation in the guinea-pig in vitro // *J. Physiol.* – 2001. - Vol. 535(Pt 2). – P. 507-18.
215. Hersey S. J. Pepsinogen secretion / In *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. - 2nd ed. - ed. by L. R. Johnson. - Raven Press. - New York. – 1987. – P. 947–957.
216. Hersey S.J. Cellular basis of pepsinogen secretion / In: *Handbook of Physiology. Alimentary canal. The gastrointestinal system*. - Schult S.G., Forte J.G., Rauner B.B. - eds. Am Physiol Soc Bethesda: Maryland. – 1989. – P. 267-78.
217. Hersey S.J., Miller M., May D., Norris S.H. Lack of interaction between acid and pepsinogen secretion in isolated gastric glands // *Am. J. Physiol.* – 1983. – Vol. 245. – P. G775-9.
218. Hirata T., Narumiya S. Prostanoid receptors // *Chem. Rev.* – 2011. – Vol. 111. – P. 6209–6230.
219. Hirschowitz B.I., Hutchison G.A. Evidence for a histamine H2 receptor that inhibits pepsin secretion in the dog // *Am. J. Physiol.* – 1977. – Vol. 233. – P. E225-8.
220. Hobbs A.J., Higgs A., Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1999. – Vol. 39. – P. 191–220.

221. Hoffmann W.I., Jagla W., Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain // *Histol. Histopathol.* – 2001. – Vol. 16. – P. 319-34.
222. Hofmann F., Bernhard D., Lukowski R., Weinmeister R. cGMP regulated protein kinases (cGK) / *Handbook of Experimental Pharmacology* 191. - H.H.H.W. Schmidt et al. (eds.). // *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic.* - Springer-Verlag Berlin Heidelberg. - 2009. - P. 137-162.
223. Hollander F. The two-component mucous barrier; its activity in protecting the gastroduodenal mucosa against peptic ulceration // *Gastroenterology.* – 1954. - Vol.93. – P. 107-20.
224. Hollander F., Stein J., Lauber F.U. The consistency, opacity, and columnar cell content of gastric mucus secreted under the influence of several mild irritants // *Gastroenterology.* – 1946. – Vol. 6. – P. 576-95.
225. Holm L., Agren J., Persson A.E. Stimulation of acid secretion increases the gastric gland luminal pressure in the rat // *Gastroenterology* - 1992. - Vol. 103. -P. 1797-803.
226. Holm L., Flemström G. Microscopy of acid transport at the gastric surface in vivo // *J. Intern. Med. Suppl.* – 1990. - Vol. 732. – P. 91-5.
227. Holzer P. Acid sensing by visceral afferent neurons // *Acta Physiol. (Oxf.).* - 2011. - Vol. 201. – P. 63–75.
228. Holzer P. Acid-sensitive ion channels and receptors // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2009. - Vol. 194. – P. 283–332.
229. Holzer P. Acid-sensitive ion channels in gastrointestinal function // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2003. - Vol. 3. – P. 618–625.
230. Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanism of action, and selectivity for thin sensory neurons // *Pharmacol. Rev.* – 1991. - Vol. 43. – P. 143-201.
231. Holzer P. Efferent-like roles of afferent neurons in the gut: blood flow regulation and tissue protection // *Auton. Neurosci.* – 2006. - Vol. 125. – P. 70–75.
232. Holzer P. Local effector function of capsaicin- sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin- gen related peptide and other neuropeptides // *Neuroscience.* – 1988. - Vol. 24. – P. 739-768.
233. Holzer P. Neural emergency system in the stomach // *Gastroenterology.* – 1998. - Vol. 114. – P. 823–839.
234. Holzer P. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense // *Curr. Opin. Pharmacol.* - 2007b. - Vol. 7. – P. 563–569.

235. Holzer P. Sensory neuron responses to mucosal noxae in the upper gut: relevance to mucosal integrity and gastrointestinal pain // *Neurogastroenterol. Motil.* – 2002. - Vol. 14. – P. 459-75.
236. Holzer P. Taste receptors in the gastrointestinal tract. V. Acid sensing in the gastrointestinal tract // *Am. J. Physiol.* - 2007a. - Vol. 292. – P. G699–G705.
237. Holzer P., Gamse R., Lembeck F. Distribution of substance P in the rat gastrointestinal tract-lack of effect of capsaicin pretreatment // *Eur. J. Pharmacol.* – 1980. - Vol. 61. – P. 303-7.
238. Holzer P., Guth P.H. Neuropeptide control of rat gastric mucosal blood flow. Increase by calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal polypeptide, but not substance P and neurokinin A // *Circ. Res.* – 1991. - Vol. 68. – P. 100–105.
239. Holzer P., Pabst M.A., Lippe I.T., Peskar B.M., Peskar B.A., Livingston E.H., Guth P.H. Afferent nerve-mediated protection against deep mucosal damage in the rat stomach // *Gastroenterology* – 1990. - Vol. 98. – P. 838-48.
240. Holzer P., Sametz W. Gastric mucosal protection against ulcerogenic factors in the rat mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons // *Gastroenterology.* - 1986. - Vol. 91. – P. 975-87.
241. Holzer P., Wachter C., Jovic M., Heinemann A. Vascular bed-dependent roles of the peptide CGRP and nitric oxide in acid-evoked hyperaemia of the rat stomach // *J. Physiol.* – 1994. - Vol. 480 (Pt 3). – P. 575-85.
242. Horie S., Michael G.J., Priestley J.V. Co-localization of TRPV1-expressing nerve fibers with calcitonin-gene-related peptide and substance P in fundus of rat stomach // *Inflammopharmacology.* - 2005. - Vol. 13. – P. 127-37.
243. Horie S., Raimura M., Matsumoto K., Namiki N., Terasawa K., Priestley J.V., Tashima K. Cooperative effects of neuronal nitric oxide synthase and endothelial nitric oxide synthase on gastric hyperemic response to intragastric capsaicin / In: "Capsaicin - sensitive neural afferentation and the gastrointestinal tract: from bench to bedside". – ed. G. Mozsik, O. M. E. Abdel- Salam and K. Takeuchi. - ISBN 978-953-51-1631-8. - 2014. - P. 103-123.
244. Horie S., Yamamoto H., Michael G.J. Uchida M., Belai A., Watanabe K., Priestley J.V., Murayama T. Protective role of vanilloid receptor type 1 in HCl-induced gastric mucosal lesions in rats // *Scand. J. Gastroenterol.* – 2004. - Vol. 39. – P. 303–312.
245. Hritz I., Herszenyi L., Molnar B. Long-term omeprazole and esomeprazole treatment does not significantly increase gastric epithelial cell proliferation and epithelial growth factor receptor expression and has no effect on apoptosis and p53 expression // *World J. Gastroenterol.* – 2005. - Vol. 11. – P. 4721–4726.

246. Huang C.W., Tzeng J.N., Chen Y.J., Tsai W.F., Chen C.C., Sun W.H. Nociceptors of dorsal root ganglion express proton-sensing G-protein-coupled receptors // *Mol. Cell. Neurosci.* - 2007. - Vol. 36. - P. 195–210.
247. Huang S.M., Bisogno T., Trevisani M., Al-Hayani A., De Petrocellis L., Fezza F., Tognetto M., Petros T.J., Krey J.F., Chu C.J. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2002. - Vol. 99. – P. 8400–8405.
248. Humphreys B.D., Chernova M.N., Jiang L., Zhang Y., Alper S.L. NH₄Cl activates AE2 anion exchanger in *Xenopus* oocytes at acidic pH // *Am. J. Physiol.* – 1997. - Vol. 272. – P. 1232–40.
249. Hunter F.M., Correa P., Fontham E. Serum pepsinogens as markers of response to therapy for *Helicobacter pylori* gastritis // *Dig. Dis. Sci.* – 1993. - Vol. 38. – P. 81–86.
250. Hwang S.J., Oh J.M., Valtschanoff J.G. Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents // *Brain Res.* – 2005. - Vol. 2. – P. 261–266.
251. Hwang S.W., Cho H., Kwak J., Lee S.Y., Kang C.J., Jung J., Cho S., Min K.H., Suh Y.G., Kim D. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2002. - Vol. 97. – P. 6155–6160
252. Hyland N.P., Abrahams T.P., Fuchs K., Burmeister M.A., Hornby P.J. Organization and neurochemistry of vagal preganglionic neurons innervating the lower esophageal sphincter in ferrets // *J. Comp. Neurol.* – 2001. - Vol. 430. – P. 222–234.
253. Ichikawa T., Ishihara K., Kusakabe T., Kurihara M., Kawakami T., Takenaka T., Saigenji K., Hotta K. Distinct effects of tetragastrin, histamine, and CCh on rat gastric mucin synthesis and contribution of NO // *Am. J. Physiol.* – 1998. - Vol. 274. – P. G138 –146.
254. Ikari A., Sakai H., Tanaka A., Ikeda A., Inoue K., Takeguchi N. Prostaglandin E(2)-activated housekeeping Cl(-) channels in the basolateral membrane of rat gastric parietal cells // *Jpn. J. Physiol.* – 1999. - Vol. 49. – No. 4. – P. 365–72.
255. Illiano S., Marsault R., Descombes J.J., Verbeuren T., Vanhoutte P.M. Regulation of nitric oxide-like activity by prostanoids in smooth muscle of the canine saphenous vein // *Br. J. Pharmacol.* – 1996. - Vol. 117. – No.2. – P. 360–4.
256. Inoue K., Koizumi S., Fuziwara S., Denda S. & Denda M. Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. - Vol. 291. – P. 124–129.

257. Ito S. Functional gastric morphology / In Physiology of the Gastrointestinal Tract, ed. LR Johnson. - New York. - Raven. – 1987. – P. 817-851.
258. Ito S., Lacy E.R., Rutten M.J. Rapid repair of injured gastric mucosa // Scand. J. Gastroenterol. - Suppl. – 1984. - Vol. 101. – P. 87–95.
259. Ito Y., Okuda S., Ohkawa F., Kato S., Mitsufuji S., Yoshikawa S., Takeuchi K. Dual role of nitric oxide in gastric hypersecretion in the distended stomach: inhibition of acid secretion and stimulation of pepsinogen secretion // Life Sci. – 2008. - Vol. 83(25-26). – P. 886-92.
260. Jancso N. Desensitization with capsaicin and related acilamides as a tool for studying the function of pain receptors / Pharmacology of Pain. - Eds. K. Linn, D. Armstrong, E.D. Pardo. - Pergamon. - Oxford UK. – 1968. – P. 33-55.
261. Jancso N. Speicherung stoffanreicherung im retikuloendothel und in der niere. - Academiai. Kiado.- Budapest. - 1955.
262. Jensen J. Co-release of substance P and neurokinin A from the Atlantic cod stomach // Peptides. – 1997. - Vol. 18. – P. 717-22.
263. Jerman J.C., Brough S.J., Prinjha R., Harries M.H., Davis J.B., Smart D. Characterization using FLIPR of rat vanilloid receptor (rVR1) pharmacology // Br. J. Pharmacol. – 2000. - Vol. 130. – P. 916–922.
264. Johansson M., Synnerstad I., Holm L. Acid transport through channels in the mucous layer of rat stomach // Gastroenterology. – 2000. - Vol. 119. – No. 5. – P. 1297-304.
265. Johnson C.D., Mole D.R., Pestrige A. Postprandial alkaline tide: does it exist // Digestion. – 1995. - Vol. 56. – P. 100-106.
266. Johnson C.D., Rai A.S. Urine acid output as a test of completeness of vagotomy // Br. J. Surg. – 1990. - Vol. 77. – P. 417-20.
267. Johnson L. R. Regulation of pepsin secretion by topical acid in the stomach // Am. J. Physiol. – 1972. - Vol. 223. – P. 847–850.
268. Jöns T. L., Drenckhahn D. Anion exchanger 2 (AE2) binds to erythrocyte ankyrin and is colocalized with ankyrin along the basolateral plasma membrane of human gastric parietal cells // Eur. J. Cell Biol. – 1998. - Vol. 75. - 232-6.
269. Jung J., Hwang S.W., Kwak J., Lee S.Y., Kang C.J., Kim W.B., Kim D., Oh U. Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel // J. Neurosci. – 1999. - Vol.19. – No.2. – P. 529-38.
270. Kamakura K., Ishiura S., Sugita H., Toyokura Y. Identification of Ca²⁺ - activated neural protease in the peripheral nerve and its effect on neurofilament degeneration // J. Neurochem. – 1983. - Vol. 40. – P. 908-913.

271. Kaneko H., Mitsuma T., Nagai H. Central action of adrenomedullin to prevent ethanol-induced gastric injury through vagal pathways in rats // *Am. J. Physiol.* – 1998. - Vol. – 274. – P. R1783–R1788.
272. Karthein R., Dietz R., Nastainczyk W., Ruf H.H. Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. EPR study of a transient tyrosyl radical in the enzyme during the peroxidase reaction // *Eur. J. Biochem.* -1988. - Vol. 171. -No 1-2. – P. 313-20.
273. Kato K., Yang H., Tache Y. Role of peripheral capsaicin-sensitive neurons and CGRP in central vagally mediated gastroprotective effect of TRH // *Am. J. Physiol.* – 1994. – No.5-2. – P. 1610-1614.
274. Kato S., Aihara E., Yoshii K., Takeuchi K. Dual action of prostaglandin E2 on gastric acid secretion through different EP-receptor subtypes in the rat // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2005. - Vol. 289. – P. G64-9.
275. Kato S., Kitamura M., Korolkiewicz R.P, Takeuchi K. Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats:effects of NO donors and NO synthase inhibitor // *Br. J. Pharmacol.* – 1998. - Vol. 123. – P. 839–846.
276. Kato S., Ohkawa F., Ito Y., Amagase K., Takeuchi K. Role of endothelial nitric oxide synthase in aggravation of indomethacin-induced gastric damage in adjuvant arthritic rats // *J. Physiol. Pharmacol. Dec.* – 2009. - Vol. 60. – No. 4. – P. 147-55.
277. Katoh H., Aoki J., Ichikawa A., Negishi M. P160 RhoA-binding kinase ROK α induces neurite retraction // *J. Biol. Chem.* – 1998. - Vol. 273. – P. 2489–2492.
278. Katori M., Ohno T., Nishiyama K. Interaction of substance P and leukotriene C4 in ethanol-induced mucosal injury of rat stomach // *Regul. Pept.* – 1993. – No. 1-2. – P. 241-243.
279. Katzung B.G., Chatterjee K. Vasodilators and the treatment of Angina Pectoris / In: Katzung BG (ed). *Basic & Clinical Pharmacology.* - 7th edn. - Appleton & Lange: Stamford, Connecticut. – 1998. – P. 179–196.
280. Kauffman G.L. Jr., Reeve J.J. Jr., Grossman M.I. Gastric bicarbonate secretion: effect of topical and intravenous 16,16-dimethyl prostaglandin E2 // *Am. J. Physiol.* – 1980. - Vol. 239. – P. G44-8.
281. Kawashima K., Ishihara S., Karim Rumi M.A. Localization of calcitonin gene-related peptide receptors in rat gastric mucosa // *Peptides.* – 2002. - Vol. 23. – P. 955–966.
282. Keklikoglu, N., Koray M., Kocelli, H., Akinci S. iNOS expression in oral and gastrointestinal tract mucosa // *Dig. Dis. Sci.* – 2008. - Vol. 53. – P. 1437-42.
283. Kellenberger S., Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure // *Physiol. Rev.* – 2002. - Vol. 82. – P. 735–767.

284. Kido M.A., Muroya H., Yamaza T., Terada Y. & Tanaka T. Vanilloid receptor expression in the rat tongue and palate // *J. Dent. Res.* – 2003. - Vol. 82. – P. 393–397.
285. Kim H., Kim K.H. Effects of a nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on acid secretion of isolated rabbit gastric glands // *Pharmacology.* – 1996. - Vol. 53. – P. 331–339.
286. Kim S.F. The role of nitric oxide in prostaglandin biology; update // *Nitric Oxide.* – 2011. - Vol. 25. – No. 3. – P. 255–264.
287. Kim S.F. The nitric oxide-mediated regulation of prostaglandin signaling in medicine // *Vitam. Horm.* - 2014. - V. 96. - P. 211–245.
288. Kinoshita Y., Inui T., Chiba T. Calcitonin gene-related peptide: a neurotransmitter involved in capsaicin-sensitive afferent nerve-mediated gastric mucosal protection // *J. Clin. Gastroenterol.* – 1993. - Vol. 17. – P. S27–S32.
289. Kita K., Takahashi K., Ohashi Y., Takasuka H., Aihara E., Takeuchi K. Phosphodiesterase isozymes involved in regulation of formula secretion in isolated mouse stomach in vitro // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2008. - Vol. 326. – No. 3. – P. 889-96.
290. Kitamura M., Sugamoto S., Kawauchi S., Kato S., Takeuchi K. Modulation by endogenous nitric oxide of acid secretion induced by gastric distention in rats: enhancement by nitric oxide synthase inhibitor // *J. Pharmacol. Exp Ther.* – 1999. - Vol. 291. – P. 181-7.
291. Kitsukawa Y., Turner R.J., Pradhan T.K., Jensen R.T. Gastric chief cells possess NK1 receptors which mediate pepsinogen secretion and are regulated by agents that increase cAMP and phospholipase C // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1996. - Vol. 1312. – No. 2. – P. 105-16.
292. Kivelä A.J, Kivelä J., Saarnio J., Parkkila S. Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours // *World J. Gastroenterol.* – 2005. - Vol. 11. – P. 155-63.
293. Kiviluoto T., Ahonen M., Bäck N., Häppölä O., Mustonen H., Paimela H., Kivilaakso E. Preepithelial mucus-HCO₃⁻ layer protects against intracellular acidosis in acid-exposed gastric mucosa // *Am. J. Physiol.* – 1993. - Vol. 264(1 Pt 1). – P. G57-63.
294. Kiviluoto T., Voipio J., Kivilaakso E. Subepithelial tissue pH of rat gastric mucosa exposed to luminal acid, barrier breaking agents, and hemorrhagic shock // *Gastroenterology.* – 1988. - Vol. 94. – P. 695-702.
295. Knapp H.R., Oelz O., Sweetman B.J., Oates J.A. Synthesis and metabolism of prostaglandins E₂, F₂_α and D₂ by the rat gastrointestinal tract. Stimulation by a hypertonic environment in vitro // *Prostaglandins.* – 1978. - Vol. 15. – P. 751–757.
296. Knowles R.G., Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals // *Biochem. J.* – 1994. - Vol. 298 (Pt 2). – P. 249-58.

297. Ko J.K., Cho C.H. Adaptive cytoprotection and the brain-gut axis // *Digestion*. – 2011. - Vol. 83. – Suppl. 1. – P. 19-24.
298. Ko J.K., Cho C.H. Co-regulation of mucosal nitric oxide and prostaglandin in gastric adaptive cytoprotection // *Inflamm. Res. Sep.* – 1999. - Vol. 48. – No. 9. – P. 471-8.
299. Ko J.K., Cho C.H. The antileSION actions of anticholinergic agents on ethanol-induced injury in rat stomachs: the importance of gastric vascular integrity and tonicity // *J. Auton. Pharmacol.* – 1996. - Vol. 16. – P. 117–24.
300. Ko J.K.S., Cho C.H. The mechanistic pathway of gastric adaptive cytoprotection: a study on different components of the autonomic nervous system // *J. Auton. Pharmacol.* – 1995. - Vol. 15. – P. 205–214.
301. Ko J.K.S., Cho C.H., Ogle C.W. The vagus nerve and its non-cholinergic mechanism in the modulation of ethanol-induced gastric mucosal damage in rats // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1994. - Vol. 46. – P. 29–32.
302. Koduru S., Vuyyuru L., and Schubert M.L. Nitric oxide mediates the stimulation of acid secretion induced by distension of the gastric fundus // *Gastroenterology*. – 1995. - Vol. 108. – P. A132.
303. Koelz H.R., Hersey S.J., Sachs G., Chew C.S. Pepsinogen release from isolated gastric glands // *Am. J. Physiol.* – 1982. - Vol. 243. – No. 6. – P. G218-25.
304. Konturek S.J. Gastroprotection by antiseSecretory and non-antiseSecretory agents // *Klin. Wochenschr.* – 1986. - Vol. 64. - Suppl 7. – P. 24-7.
305. Konturek S.J., Brzozowski T., Piastucki I., Radecki T., Dembiński A., Dembińska-Kieć A. Role of locally generated prostaglandins in adaptive gastric cytoprotection // *Dig. Dis. Sci.* – 1982. - Vol. 27. – No. 11. – P. 967-71.
306. Kopic S., Geibel J.P. Update on the mechanisms of gastric acid secretion // *Curr Gastroenterol. Rep.* – 2010. - Vol. 12. – No. 6. – P. 458-64
307. Kotani T., Kobata A., Nakamura E., Amagase K., Takeuchi K. Roles of cyclooxygenase-2 and prostacyclin/IP receptors in mucosal defense against ischemia/reperfusion injury in mouse stomach // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. - Vol. 316. – P. 547–555.
308. Kraenzlin M.E., Chung J.L., Mulderry P.K., Ghatei M.A., Bloom S.R. Infusion of a novel peptide, calcitonin gene-related peptide (CGRP) in man. Pharmacokinetics and effects on gastric acid secretion and on gastrointestinal hormones // *Regul. Pept.* – 1985. - Vol. 10. – No. 2-3. – P. 189-97.
309. Kress M., Fetzter S., Reeh P., Vyklicky L. Low pH facilitates capsaicin responses in isolated sensory neurons of the rat // *Neurosci. Lett.* – 1996. - Vol. 211. – P. 5-8.

310. Kress M., Waldmann R. Acid sensing ionic channels // *Curr. Top. Membranes*. – 2006. – Vol. 57. – P. 241–276.
311. Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception // *Neuroscience*. – 1981. – No. 6. – P. 2599–2601.
312. Kroncke K.D., Fehsel K., Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities // *Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 376. – P. 327–343
313. Krowicki Z.K., Sharkey K.A., Serron S.C, Nathan N.A., Hornby P.J. Distribution of nitric oxide synthase in rat dorsal vagal complex and effects of microinjection of nitric oxide compounds upon gastric motor function // *J. Comp. Neurol.* -1997. - Vol. 377. – P. 49–69.
314. Kubes P., Suzuki M., Granger D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1991. - Vol. 88. – P. 4651–4655.
315. Kugler P., Drenckhahn D. Intrinsic source of stomach NO // *Nature*. - 1994. - Vol. 370. – P. 25-26.
316. Kugler P., Hofer D., Mayer B., Drenckhahn D. Nitric oxide synthase and NADP-linked glucose-6-phosphate dehydrogenase are co-localized in brush cells of rat stomach and pancreas // *J. Histochem. Cytochem.* – 1994. - Vol. 42. – P. 1317–1321.
317. Kuipers E.J., Pals G., Pena A.S. *Helicobacter pylori*, pepsinogens and gastrin: relationship with age and development of atrophic gastritis // *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 1996. – No. 8. – P. 153–6.
318. Kwok Y.N., McIntosh C.H. Release of substance P-like immunoreactivity from the vascularly perfused rat stomach // *Eur. J. Pharmacol.* – 1990. – No. 2-3. – P. 201-207.
319. Lacy E.R., Ito S. Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandin // *Gastroenterology*. – 1982. - Vol. 83. – P. 619-25.
320. Laine L., Takeuchi K., Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside // *Gastroenterology*. – 2008. - Vol. 135. – P. 41- 60.
321. Lamarque D., Dutreuil C., Dhumeaux D., Delchier J. C. Increased gastric bicarbonate secretion in portal hypertensive anesthetized rats: role of prostaglandins and nitric oxide // *Dig. Dis. Sci.* – 1997. - Vol. 42. – No. 4. – P. 743-50.
322. Lamb K., Kang Y.M., Gebhart G.F., Bielefeldt K. Gastric inflammation triggers hypersensitivity to acid in awake rats // *Gastroenterology*. – 2003. - Vol. 125. – P. 1410–1418.

323. Lambrecht N., Burchert M., Respondek M., Müller K.M., Peskar B.M. Role of calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the gastroprotective effect of capsaicin in the rat // *Gastroenterology*. – 1993. - Vol. 104. – P. 1371-80.
324. Lau J.Y., Sung J., Hill C. Systematic review of the epidemiology of complicated peptic ulcer disease: incidence, recurrence, risk factors and mortality // *Digestion*. – 2011. - Vol.84. – P. 102-113.
325. Lefebvre O., Chenard M.P., Masson R., Linares J., Dierich A., LeMeur M., Wendling C., Tomasetto C., Chambon P., Rio M.C. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein // *Science*. – 1996. - Vol. 274. – No. 5285. – P. 259-62.
326. Leffler A., Fischer M.J., Rehner D., Kienel S., Kistner K., Sauer S.K., Gavva N.R., Reeh P.W., Nau C. The vanilloid receptor TRPV1 is activated and sensitized by local anesthetics in rodent sensory neurons // *J. Clin. Invest.* – 2008. - Vol. 118. – P. 763–776
327. Leffler A., Mönter B., Koltzenburg M. The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice // *Neuroscience*. – 2006. - Vol. 139. – P. 699–709.
328. Lenz H.J., Mortrud M.T., Rivier J.E., Brown M.R. Central nervous system actions of calcitonin gene-related peptide on gastric acid secretion in the rat // *Gastroenterology*. – 1985. - Vol. 88. – P. 539–544.
329. Lin Y.J., Lin Y.S., Lai C.J., Yuan Z.F., Ruan T., Kou Y.R. Perivagal antagonist treatment in rats selectively blocks the reflex and afferent responses of vagal lung C fibers to intravenous agonists// *J. Appl. Physiol.* – 2013. -Vol. 14. -No 3. -P. 361-70.
330. Lincoln T.M., Cornwell T.L. Intracellular cyclic GMP receptor proteins // *FASEB J.* – 1993. – No. 7 – P. 328–339.
331. Lippe I.T., Holzer P. Participation of endothelium-derived nitric oxide but not prostacyclin in the gastric mucosal hyperaemia due to acid back-diffusion // *Br. J. Pharmacol.* – 1992. - Vol. 105. – P. 708-14.
332. Liu Y.Z., Zhou Y., Li D. Reduction of asymmetric dimethylarginine in the protective effects of rutaecarpine on gastric mucosal injury // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* - 2008. - Vol. 86. – P. 675–681.
333. Lohi H., Kujala M., Kerkela E., Saarialho-Kere U., Kestila M., Kere J. Mapping of five new putative anion transporter genes in human and characterization of SLC26A6, a candidate gene for pancreatic anion exchanger // *Genomics*. – 2000. - Vol. 70. – P. 102–112.

334. Lohi H., Kujala M., Makela S., Lehtonen E., Kestila M., Saarialho-Kere U., Markovich D., Kere J. Functional characterization of three novel tissue-specific anion exchangers: SLC26A7, A8 and A9 // *J. Biol. Chem.* – 2002. - Vol. 277. – P. 14246-54.
335. Lorente S., Doiz O., Trinidad Serrano M., Castillo J., Lanas A. *Helicobacter pylori* stimulates pepsinogen secretion from isolated human peptic cells // *Gut.* – 2002. - Vol. 50. – P. 13-8.
336. Lou Y-P., Franco- Cereceda A., Lundberg J.M. Different ion channel mechanisms between low concentrations of capsaicin and high concentrations of capsaicin and nicotine regarding peptide release from pulmonary afferents // *Acta Physiol. Scand.* – 1992. - Vol. 146. – P. 119-127.
337. Ludwig M.G., Vanek M., Guerini D., Gasser J.A., Jones C.E., Junker U., Hofstetter H., Wolf R.M., Seuwen K. Proton-sensing G-protein-coupled receptors // *Nature.* – 2003. - Vol. 425. – P. 93–98.
338. Lugea A., Antolin M., Mourelle M., Guarner F., Malagelada J.R. Deranged hydrophobic barrier of the rat gastroduodenal mucosa after parenteral nonsteroidal anti-inflammatory drugs // *Gastroenterology.* – 1997. - Vol. 112. – No.6. – P. 1931-9.
339. Luo X., Liu B., Dai Z., Yang Z., Peng J. Stimulation of calcitonin gene-related peptide release through targeting capsaicin receptor: a potential strategy for gastric mucosal protection // *Dig. Dis. Sci.* – 2013. - Vol. 58. – P. 320-5.
340. Machen T.E., Townsley M.C., Paradiso A.M., Wenzl E., Negulescu P.A. H and HCO₃ transport across the basolateral membrane of the parietal cell // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1989. - Vol. 574. – P. 447–462.
341. MacNaughton W.K., Cirino G., Wallace J.L. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach // *Life Sci.* – 1989. - Vol. 45. – P. 1869–1876.
342. Maggi C.A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves // *Prog. Neurobiol.* – 1995.- No. 1. – P. 1-98.
343. Maggi C.A., Patacchini R., Giuliani S., Santicioli P., Meli A. Evidence for two independent modes of activation of the “efferent” function of capsaicin- sensitive nerves // *Eur. J. Pharmacol.* – 1988. - Vol. 156. – P. 367-373.
344. Malinowska D.H. Cl⁻ channel blockers inhibit acid secretion in rabbit parietal cells // *Am. J. Physiol.* – 1990. - Vol. 259. – No. 4 (Pt 1). – P. G536–G543.

345. Manela F.D., Ren J., Gao J., McGuigan J.E., Harty R.F. Calcitonin gene-related peptide modulates acid mediated regulation of somatostatin and gastrin release from rat antrum // *Gastroenterology*. – 1995. - Vol. 109. – P. 701–706.
346. Manneschi L.I., Vannucchi M.G., Bechi P., Faussone-Pellegrini M.S. Neuron density and distribution of NADPH-diaphorase positive neurons in the human stomach // *Neurosci. Lett.* – 1998. - Vol.250. – P. 169-72.
347. Marsh S.J., C.E. Stansfield, D.A. Brown, R. Davey, D. McCarthy. The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro // *J. Neurosci.* – 1987. - Vol. 23. – P. 275-290.
348. Martínez-Cuesta M.A., Moreno L., Piqué J.M., Bosch J., Rodrigo J., Esplugues J.V. Nitric oxide-mediated beta 2-adrenoceptor relaxation is impaired in mesenteric veins from portal-hypertensive rats // *Gastroenterology*. – 1996. - Vol. 111. – No. 3. – P. 727-35.
349. Mashimo H., Kjellin, A., Goyal, R. K. Gastric stasis in neuronal nitric oxide synthase-deficient knockout mice // *Gastroenterology*. – 2000. - Vol. 119. - P. 766–773
350. Matsumoto J., Takeuchi K., Okabe S. Characterization of gastric mucosal blood flow response induced by intragastric capsaicin in rats // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1991. – No. 2. -P. 205-213.
351. Matsumoto Y., Kanamoto K., Kawakubo K. Gastroprotective and vasodilatory effects of epidermal growth factor: the role of sensory afferent neurons // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2001. - Vol. 280. – P. G897–G903.
352. Maurice D.H., Haslam R.J. Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP // *Mol. Pharmacol.* – 1990. - Vol. 37. – P. 671–681.
353. Mawe G.M.I., Schemann M., Wood J., Gershon M.D. Immunocytochemical analysis of potential neurotransmitters present in the myenteric plexus and muscular layers of the corpus of the guinea pig stomach // *Anat. Rec.* – 1989. - Vol. 224. – P. 431-42.
354. McCafferty D.M. Peroxynitrite and inflammatory bowel disease // *Gut*. – 2000. - Vol. 46. – P. 436-9.
355. McDougal D.B., Yuan M.J.C., Johnson E.M. Effect of capsaicin upon fluoride sensitive acid phosphatases in selected ganglia and spinal cord and upon neuronal size and number in dorsal root ganglion // *Brain Res.* – 1985 - Vol. 331. – P. 63-70.
356. Mckemy D.D., Neuhausser W.M., Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation // *Nature*. – 2002. - Vol. 416. P. 52–58.

357. Medda B.K., Sengupta J.N., Lang I.M., Shaker R. Response properties of the brainstem neurons of the cat following intra-esophageal acid-pepsin infusion // *Neuroscience*. – 2005 - Vol. 135. – P. 1285–1294.
358. Meyer G., Beinborn M., Sewing K.F. Characterization of CCKa receptor mediated pepsinogen secretion in porcine chief cells // *Pharmacology*. – 1996. - Vol. 53. – P. 48-59.
359. Mezey E., Toth Z.E., Cortright D.N., Arzubi M.K., Krause J.E., Elde R., Guo A., Blumberg P.M. & Szallasi A. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2000. - Vol. 97. – P. 3655–3660.
360. Miller T.A., Henagan J.M., Watkins L.A, Loy T.M. Prostaglandin-induced bicarbonate secretion in the canine stomach: characteristics and evidence for a cholinergic mechanism // *J. Surg. Res.* – 1983. - Vol. 35. – P. 105-12.
361. Minghetti L. and Levi G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide // *Prog. Neurobiol.* – 1998. - Vol. 54. – P. 99–125.
362. Minghetti L., Nicolini A., Polazzi E., Créminon C., Maclof J., Levi G. Inducible nitric oxide synthase expression in activated rat microglial cultures is downregulated by exogenous prostaglandin E2 and by cyclooxygenase inhibitors // *Glia*. – 1997. - Vol. 19. – No. 2. – P. 152-60.
363. Mitsui R., Hashitani H. Mechanisms underlying spontaneous constrictions of postcapillary venules in the rat stomach // *Pflugers Arch.* – 2016. - Vol. 468. – P. 279-91.
364. Mizuno H., Sakamoto C., Matsuda K., Wada K., Uchida T., Noguchi H., Akamatsu T., Kasuga M. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice // *Gastroenterology*. – 1997. -Vol. 112. -No 2. -P. 387-97.
365. Modlin I.M., Kidd M., Lye K.D., Wright N.A. Gastric stem cells: an update // *Keio J. Med.* – 2003. - Vol. 52. – P. 134–137.
366. Mollace V., Colasanti V., Rodino P. NMDA-dependent prostaglandin E2 release by human cultured astroglial cells is driven by nitric oxide // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1995. - Vol. 215. – P. 793–799
367. Moncada S., Higgs E.A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide // *FASEB J.* – 1995. - No 9. – P. 1319–1330.
368. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology // *Pharmacol. Rev.* – 1991. - Vol. 43. – P. 109–142.
369. Montell C. New light on TRP and TRPL // *Mol. Pharmacol.* – 1997. - Vol. 52. – P. 755–763.

[Type here]

370. Montell C., Birnbaumer L., Flockerzi V., Bindels R.J., Bruford E.A., Caterina M.J., Clapham D.E., Harteneck C., Heller S., Julius D., Kojima I., Mori Y., Penner R., Prawitt D., Scharenberg A.M., Schultz G., Shimizu N. & Zhu M.X. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels // *Mol. Cell.* – 2002. – No. 9. – P. 229–231.
371. Montrose M.H., Akiba Y., Takeuchi K., Kaunitz J.D. Gastroduodenal mucosal defense / *Physiology of the Gastrointestinal Tract.* – Johnson L.R. editor. - Fourth Edition.- Academic Press. - San Diego. - 2006. – P. 1259-1291.
372. Moore E.W. The alkaline tide // *Gastroenterology.* – 1967. - Vol. 52. – P. 1052-1054.
373. Moore E.W., Scarlata R.W. The determination of gastric acidity by the glass electrode // *Gastroenterology.* - 1965. - Vol. 49. – p. 178-88.
374. Moore P. K., Babbedge R. C., Wallace P., Gaffen Z. A., Hart S. L. 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure // *Br. J. Pharmacol.* – 1993. - Vol. 108. – P. 296-7.
375. Moreno L., Martínez-Cuesta M.A., Piqué J.M., Bosch J., Esplugues J.V. Anatomical differences in responsiveness to vasoconstrictors in the mesenteric veins from normal and portal hypertensive rats // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 1996. - Vol. 354. – P. 474-80.
376. Morgado M., Cairrão E., Santos-Silva A.J, Verde I. Cyclic nucleotide dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2012. - Vol. 69. – P. 247–266.
377. Muallem S., Blissard D., Cragoe E.J. Jr., Sachs G. Activation of the Na^+/H^+ and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange by stimulation of acid secretion in the parietal cell // *J. Biol. Chem.* – 1988. - Vol. 263. – No. 29. – P. 14703-11.
378. Murray L. J., Gabello M., Rudolph D. S., Farrell C. P., Morgan M., Martin A. P., Underwood J. C., Valenzano M. C., Mullin J. M. Transmucosal gastric leak induced by proton pump inhibitors // *Dig. Dis. Sci.* – 2009. - Vol. 54. – P. 1408-1417.
379. Murthy K.S. Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle // *Biochem. J.* – 2001. - Vol. 360 (Pt 1). – P. 199-208.
380. Muscará M.N., Wallace J.L. Nitric Oxide. V. therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors // *Am. J. Physiol.* – 1999 - Vol. 276. – No.6 (Pt 1). – P. G1313-6.
381. Muto N., Murayama K., Akahane K., Tani S. Biochemical and immunological characterization of rat pepsinogens and pepsins // *J. Biochem.* - 1980. - Vol. 87. – P. 717-723.

382. Mutoh H., Ota S., Hiraishi H., Ivey K.J., Terano A., Sugimoto T. Adaptive cytoprotection in cultured rat gastric mucus-producing cells. Role of mucus and prostaglandin synthesis // *Dig. Dis. Sci.* – 1995. - Vol. 40. – P. 872-8.
383. Nakahari T., Fujiwara S., Shimamoto C., Kojima K., Katsu K., Imai Y. cAMP modulation of Ca^{2+} -regulated exocytosis in ACh-stimulated antral mucous cells of guinea pig // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2002. - Vol. 282. – P. G844–G856.
384. Nakashima M., Aoi M., Aihara E., Takeuchi K. No role for prostacyclin IP receptors in duodenal HCO_3^- secretion induced by mucosal acidification in mice: Comparison with capsaicin-induced response // *Digestion.* - 2004. - Vol. 70. – P. 16-25.
385. Narumiya S., Sugimoto Y., Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions // *Physiol. Rev.* – 1999. - Vol.79. – P. 1193-226.
386. Needleman P., Turk J., Jakschik B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B. Arachidonic acid metabolism // *Annu. Rev. Biochem.* – 1986 - Vol. 55. – P. 69–102.
387. Neuhuber W.L. Sensory vagal innervation of the rat esophagus and cardia: light and electron microscopic anterograde tracing study // *J. Auton. Nerv. Syst.* – 1987. - Vol. 20. – P. 243-255.
388. Nguyen T., Chai J., Li A., Akahoshi T., Tanigawa T., Tarnawski A. Novel roles of local IGF-1 activation in rat gastric ulcer healing: promotes actin polymerization, cell proliferation, re-epithelisation and induces COX-2 in PI3K-dependent manner // *Am. J. Pathol.* – 2007. - Vol. 170. – P. 1219–28.
389. Nicola C., Timoshenko A.V., Dixon S.J., Lala P.K., Chakraborty C. EP1 receptor-mediated migration of the first trimester human extravillous trophoblast: the role of intracellular calcium and calpain // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. - Vol. 90. – P. 4736–4746.
390. Niv Y. Pentagastrin-induced urinary alkaline tide - a repeatable phenomenon that is abolished after vagotomy // *Isr. J. Med. Sci.* – 1992. - Vol. 28. – P. 97-8.
391. Niv Y., Abu-Avid S., Newman G. Further applications of blood gas analysis to gastric acidity determination // *Clin. Chim. Acta.* – 1993. - Vol. 215. – P. 9-19.
392. Niv Y., Asaf V. Abolition of postprandial alkaline tide in arterialized venous blood of duodenal ulcer patients with cimetidine and after vagotomy // *Am. J. Gastroenterol.* – 1995. - Vol. 90. – P. 1135-7.
393. Niv Y., Fraser G. M. The alkaline tide phenomenon // *J. Clin. Gastroenterol.* – 2002. - Vol. 5. – P. 5-8.

394. Niv Y., Vardi I. Calcium channel blocker decreases pentagastrin-stimulated alkaline tide: a role for extracellular calcium in gastric acid secretion // *Isr. J. Med. Sci* – 1995. - Vol. 31. – P. 215-17.
395. North R.A. Molecular physiology of P2X receptors // *Physiol. Rev.* – 2002. - Vol. 82. – P. 1013–1067.
396. Northey A., Denis D., Cirino M., Metters K.M., Nantel F. Cellular distribution of prostanoid EP receptors mRNA in the rat gastrointestinal tract // *Prostaglandins. Other. Lipid. Mediat.* – 2000. - Vol. 62. – P. 145–156.
397. Notoya K., Jovanovic D.V., Reboul P., Martel-Pelletier J., Mineau F., Pelletier J.P. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by NO is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of COX-2 // *J. Immunol.* – 2000. - Vol. 165. – P. 3402–3410.
398. Nozawa Y., Nishihara K., Yamamoto A., Nakano M., Ajioka H., Matsuura N. Distribution and characterization of vanilloid receptors in the rat stomach // *Neurosci. Lett.* – 2001. - Vol. 309. – P. 33-6.
399. Odes H.S., Hogan D.L., Steinbach J.H., Ballesteros M.A., Koss M.A., Isenberg J.I. Measurement of gastric bicarbonate secretion in the human stomach: different methods produce discordant results // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1992. - Vol. 27. – P. 829-836.
400. Ohnishi A., Shimamoto C., Katsu K., Ito S., Imai Y., Nakahari T. EP1 and EP4 receptors mediate exocytosis evoked by prostaglandin E2 in guinea-pig antral mucous cells // *Exp. Physiol.* – 2001. - Vol. 86. – P. 451–460.
401. Ohno T., Hattori Y., Komine R. Roles of calcitonin generelated peptide in maintenance of gastric mucosal integrity and in enhancement of ulcer healing and angiogenesis // *Gastroenterology.* – 2008. - Vol. 134. – P. 215–225.
402. Ohno T., Katori M., Majima T., Saeki K., Boku K., Nishiyama H., Hayashi K., Saigenji K. Dilatation and constriction of rat gastric mucosal microvessels through prostaglandin EP2 and EP3 receptors // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 1999. - Vol. 13. – No. 9. – P. 1243-50.
403. Ohta T., Ikemi Y., Murakami M., Imagawa T., Otsuguro K., Ito S. Potentiation of transient receptor potential V1 functions by the activation of metabotropic 5-hydroxytryptamine receptors in rat primary sensory neurons // *J. Physiol.* – 2006. - Vol. 576. – P. 809–822.
404. Okayama N., Itoh M., Joh T., Miyamoto T., Takeuchi T., Moriyama A., Kato T. Effects of dibutyryl guanosine 3',5'-cyclic monophosphate and sodium nitroprusside in pepsinogen secretion from guinea pig chief cells with respect to intracellular Ca^{2+} // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. - Vol. 1268. – P. 185-90.

405. Okazaki M., Shimizu I., Ishikawa M., Fujiwara S., Yamamoto H., Shiraishi T., Horie T., Iuchi A., Ito S. Gastric mucosal levels of prostaglandins and leukotrienes in patients with gastric ulcer after treatment with rabeprazole in comparison to treatment with ranitidine // *J. Med. Invest.* – 2007. - Vol. 54. – P. 83-90.
406. Olaibi O.K., Ijomone O.M., Ajibade A.J. Histomorphometric study of stomach and duodenum of aspirin treated Wistar rats // *J. Exp.Clin. Anat.* – 2014. – No. 13. – P. 12-16.
407. O-Lee T.J., Wei J.Y., Tache Y. Intracisternal TRH and RX 77368 potently activate gastric vagal efferent discharge in rats // *Peptides.* – 1997. – No. 18. - P. 213–219.
408. Page A.J., O'Donnell T.A., Cooper N.J., Young R.L., Blackshaw L.A. Nitric oxide as an endogenous peripheral modulator of visceral sensory neuronal function // *J. Neurosci.* – 2009. - Vol. 29. – No.22. – P. 7246-55.
409. Pai R., Soreghan B.A., Szabo I.L. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy // *Nat. Med.* – 2002. - Vol. 8. – P. 289–93.
410. Paimela H., P.J. Goddard & W. Silen. Present views on restitution of gastrointestinal epithelium // *Dig. Dis. Sci.* – 1995. - Vol. 40. – P. 2495– 2496.
411. Palacios-Callender M., Quintero M., Hollis V.S., Springett R.J., Moncada S. Endogenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2004. - Vol. 101. – P. 7630-7635.
412. Palileo C., Kaunitz J.D. Gastrointestinal defense mechanisms // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2011. - Vol. 27. – No. 6. - P. 543-8.
413. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium- derived relaxing factor // *Nature.* - 1987. - Vol. 327. – P. 524-526.
414. Palmer R.M., Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1989. - Vol. 158. – P. 348-52.
415. Paradiso A.M., Townsley M.C., Wenzl E., Machen T.E. Regulation of intracellular pH in resting and in stimulated parietal cells // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 1989. - Vol. 257. – P. C554–C561.
416. Park J., Chiba T., Yamada T. Mechanisms for direct inhibition of canine gastric parietal cells by somatostatin // *J. Biol. Chem.* -1987. - Vol. 262. – P. 14190–96.
417. Parker M.D., Boron W.F. The divergence, actions, roles, and relatives of sodium-coupled bicarbonate transporters // *Physiol. Rev.* – 2013. - Vol. 93. – P. 803-959.

418. Pastoreková S., Parkkila S., Parkkila A.K., Opavský R., Zelník V., Saarnio J., Pastorek J. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts // *Gastroenterology*. – 1997. - Vol. 112. – P. 398-408.
419. Paterson C., Anvari A.M., Tougas G., Huizinga J.D. Nitroergic and cholinergic vagal pathways involved in the regulation of canine proximal gastric tone: an in vivo study // *Neurogastroenterol. Motil.* – 2000. - Vol. 12. – No. 4. – P. 301-6.
420. Patterson L.M., Zheng H., Ward S.M., Berthoud H.R. Vanilloid receptor (VR1) expression in vagal afferent neurons innervating the gastrointestinal tract // *Cell Tissue Res.* – 2003. - Vol. 311. – P. 277–287.
421. Pavlov J. Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. - Weisbaden,- Germany: Bergman. - 1898.
422. Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C., Reeve A.J., Andersson D.A., Story G.M., Earley T.J., Dragoni I., McInyre P., Bevan S. & Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol // *Cell*. – 2002. - Vol. 108. – P. 705–715.
423. Peña-Münzenmayer G., George A.T, Shull G.E, Melvin J.E, Catalán M.A. Ae4 (Slc4a9) is an electroneutral monovalent cation-dependent $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger // *J. Gen. Physiol.* – 2016. - Vol. 147. – No. 5. – P. 423-436.
424. Peng X., Feng J.B., Yan H., Zhao Y., Wang S.L. Distribution of nitric oxide synthase in stomach myenteric plexus of rats // *World J. Gastroenterol.* – 2001. - Vol. 7. – P. 852-4.
425. Peskar B.M. Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2001. - Vol. 52. – No. 4 (Pt 1). – P. 555-68.
426. Peskar B.M. On the synthesis of prostaglandins by human gastric mucosa and its modification by drugs // *Biochim. Biophys. Acta*. 1977. - Vol. 487. – P. 307–314.
427. Peskar B.M., Gunter B., Peskar B.A. Prostaglandins and prostaglandin metabolites in human gastric juice // *Prostaglandins*. – 1980. - Vol. 20. – P. 419–427.
428. Petersen M., LaMotte R.H. Effects of protons on inward current evoked by capsaicin in isolated dorsal root ganglion cells // *Pain*. – 1993. - Vol. 54. – P. 37-42.
429. Petrovic S., Ju X., Barone S., Seidler U., Alper S.L., Lohi H., Kere J., Soleimani M. Identification of a basolateral $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger specific to gastric parietal cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 2003. - Vol. 284. – No.6. – P. G1093-103.
430. Petrovic S., Wang Z., Ma L., Seidler U., Forte J.G. Shull G.E, Soleimani M. Colocalization of the apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger PAT1 and gastric H-K-ATPase in stomach parietal cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 2002. - Vol. 283. – P. G1207-16.

431. Pettitt J.M., van Driel I.R., Toh B.H., Gleeson P.A. From coiled tubules to a secretory canaliculus: a new model for membrane transformation and acid secretion by gastric parietal cells // *Trends. Cell. Biol.* - 1996. - Vol. 6. – P. 49–52
432. Phillipson M. Acid transport through gastric mucus // *Ups. J. Med. Sci.* – 2004. - Vol. 109. – P. 1-24.
433. Phillipson M., Atuma C., Henriksnas J., Holm L. The importance of mucus and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2002. - Vol. 282. – P. G211–G219.
434. Phillipson M., Henriksnäs J., Holstad M., Sandler S., Holm L. Inducible nitric oxide synthase is involved in acid-induced gastric hyperemia in rats and mice // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2003. - Vol. 285. – P. G154-162.
435. Phillipson M., Johansson M.E., Henriksnäs J., Petersson J., Gendler S.J., Sandler S., Persson A.E., Hansson G.C., Holm L. The gastric mucus layers: constituents and regulation of accumulation // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 2008. - Vol. 295. – P. G806-12.
436. Pierce K.L., Regan J.W. Prostanoid receptor heterogeneity through alternative mRNA splicing // *Life Sci.* – 1998. - Vol. 62. – P. 1479–1483.
437. Pinter E., Helyes Z., Szolcsanyi J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception // *Pharmacol. Ther.* – 2006. – No. 2. – P. 440-456.
438. Pluss C., Werner E.R., Blau N., Wachter H., Pfeilschifter J. Interleukin 1 β and cAMP trigger the expression of GTP cyclohydrolase I in rat mesangial cells // *Biochem. J.* – 1996. - Vol. 318. – P. 665–671.
439. Pohl D., Fox M., Fried M., Göke B., Prinz C, Mönnikes H., Rogler G., Dauer M., Keller J., Lippl F., Schiefke I., Seidler U., Allescher H.D., Kandahar Study Group. Do we need gastric acid? // *Digestion.* – 2008. - Vol. 77. – P. 184–197.
440. Premaratne S., Xue C., McCarty J.M., Zaki M., McCuen R.W., Johns R.A., Schepp W., Neu B., Lippman R., Melone P.D., Schubert M.L. Neuronal nitric oxide synthase: expression in rat parietal cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2001. - Vol. 280. – P. G308-13.
441. Premkumar L.S., Bishnoi M. Disease-related changes in TRPV1 expression and its implications for drug development // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2011. - Vol. 11. – No. 17. – P. 2192-209.

442. Price K., Hanson P. Constitutive nitric oxide synthases in rat gastric mucosa: subcellular distribution, relative activity and different carboxylterminal antigenicity of the neuronal form compared with cerebellum // *Digestion*. -1998. - Vol. 59. – P. 308–313.
443. Price K.J., Hanson P.J., Whittle B.J. Localization of constitutive isoforms of nitric oxide synthase in the gastric glandular mucosa of the rat // *Cell Tissue Res*. – 1996. - Vol. 285. – P. 157–163.
444. Price K.J., Hanson P.J., Whittle B.J. Stimulation by carbachol of mucus gel thickness in rat stomach involves nitric oxide // *Eur. J. Pharmacol.* – 1994. - Vol. 263. – P. 199-202.
445. Price T.J., Flores C.M. Critical evaluation of the colocalization between calcitonin generelated peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse // *J. Pain*. – 2007. – No. 3. – P. 263-272
446. Puscas I., Coltau M., Baican M., Domuta G., Hecht A. Calcium, carbonic anhydrase and gastric acid secretion // *Physiol. Res*. – 2001. - Vol. 50. – P. 359–364.
447. Puurunen J., Westermann E. Osmotic stimulation of pepsin secretion in the rat // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 1978. - Vol. 304. – P. 63-7.
448. Quintana E., Hernández C., Alvarez-Barrientos A., Esplugues J.V., Barrachina M.D. Synthesis of nitric oxide in postganglionic myenteric neurons during endotoxemia: implications for gastric motor function in rats // *FASEB J*. – 2004. - Vol. 18. – P. 531-3.
449. Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium // *Lancet*. – 1987. - Vol. 2. – P. 1057–1058.
450. Raimura M., Tashima K., Matsumoto K., Tobe S., Chino A., Namiki T., Terasawa K., Horie S. Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide is involved in gastric mucosal hyperemic response to capsaicin in rats // *Pharmacology*. – 2013. - Vol. 92. – P. 60-70.
451. Rao R., Redha R., Macias-Perez I., Su Y., Hao C, Zent R., Breyer M.D., Pozzi A. Prostaglandin E2-EP4 receptor promotes endothelial cell migration via ERK activation and angiogenesis in vivo // *J. Biol. Chem*. – 2007. - Vol. 282. – P. 16959–16968.
452. Raufman J.P. Gastric chief cells: receptors and signal-transduction mechanisms // *Gastroenterology*. – 1992. - Vol. 102. – No.2. – P. 699-710.
453. Raufman J.P. Peptic activity and gastroduodenal mucosal damage // *Yale J. Biol. Med*. – 1996. - Vol. 69. – P. 85-90.
454. Regev A., Drori R., Fraser G.M., Niv Y. Abolition of pentagastrin-stimulated alkaline tide using the carbonic anhydrase inhibitor acetazolamide // *Isr. Med. Assoc. J*. – 2001. - Vol. 3. – No. 4. – P. 247-50.

455. Reiche D., Schemann M. Mucosa of the guinea pig gastric corpus is innervated by myenteric neurones with specific neurochemical coding and projection preferences // J. Comp. Neurol. – 1999. - Vol. 410. – P. 489-502.
456. Reichstein B.J., Cohen M.M. Effect of acetazolamide on rat gastric mucosal protection and stimulated bicarbonate secretion with 16,16-dimethyl PGE2 // J. Lab. Clin. Med. – 1984. - Vol. 104. – No.5. – P. 797-804.
457. Rettori V., Gimeno M., Lyson K. Nitric oxide mediates norepinephrine induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. - Vol. 89. – P. 11543–11546.
458. Ristimaki A., Honkanen N., Jankala H., Sipponen P., Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma //Cancer Res. – 1997. - Vol. 57. – P. 1276-80.
459. Robert A., Nezamis J. E., Lancaster C., Davis J. P., Field S. O, Hanchar A. J. Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. - 1983. - Vol. 245. – P. G113-G121.
460. Robert A., Nezamis J.E., Lancaster C., Hanchar A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury // Gastroenterology. – 1978. - Vol. 77. – P. 433-43.
461. Robert A., Ruwart M. Effects of prostaglandin on the digestive system / In: Prostaglandins. - ed. By Lee J.B. - NY, Elsevier. – 1982. – P. 113-176.
462. Robinson D.R., McNaughton P.A., Evans M.L., Hicks G.A. Characterization of the primary spinal afferent innervation of the mouse colon using retrograde labelling //Neurogastroenterol. Motil. – 2004. - Vol. 16. – P. 113–124.
463. Romero M.F., Chen A.P., Parker M.D., Boron W.F. The SLC4 family of bicarbonate (HCO_3^-) transporters // Mol. Aspects Med. – 2013 - Vol. 34. – No. 2-3. – P. 159-182.
464. Rossmann H., Alper S.L., Nader M., Wang Z., Gregor M., Seidler U. Three 5-variant mRNAs of anion exchanger AE2 in stomach and intestine of mouse, rabbit, and rat // Ann. NY Acad. Sci. – 2000. - Vol. 915. – P. 81–91.
465. Rossmann H., Bachmann O., Vieillard-Baron D., Gregor M., Seidler U. $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport and expression of NBC1 and NBC2 in rabbit gastric parietal and mucous cells //Gastroenterology. – 1999. - Vol. 116. – No. 6. – P. 1389-98.
466. Rossmann H., Bachmann O., Wang Z., Shull G.E., Obermaier B., Stuart-Tilley A., Alper S.L., Seidler U. Differential expression and regulation of AE2 anion exchanger subtypes in rabbit parietal and mucous cells // J. Physiol. - 2001a. - Vol. 534(Pt 3). – P. 837-48.

467. Rossmann H., Sonnentag T., Heinzmann A., Seidler B., Bachmann O., Vieillard-Baron D., Gregor M., Seidler U. Differential expression and regulation of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoforms in rabbit parietal and mucous cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* - 2001b. - Vol. 281. – No. 2. – P. G447-58.
468. Roth J.A., Ivy A.C. The synergistic effect of caffeine upon histamine in relation to gastric secretion // *Am. J. Physiol.* – 1944. - Vol. 142. – P. 107–13.
469. Rouzer C.A., Marnett L.J. Cyclooxygenases: structural and functional insights // *J. Lipid. Res.* – 2009. - 50 Suppl. – P. S29–S34.
470. Rune S.J. The metabolic alkalosis following aspiration of gastric acid secretion // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 1965. - Vol. 17. – P. 305-10.
471. Runnels L.W., Yue L., Clapham D.E. The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis // *Nat. Cell Biol.* – 2002. – No. 4. – P. 329–336.
472. Russell F.A., King R., Smillie S.J., Kodji X., Brain S.D. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology // *Physiol. Rev.* – 2014. - Vol. 94. – No. 4. – P.1099-142
473. Saad A.H., Shimamoto C., Nakahari T., Fujiwara S., Katsu K., Marunaka Y. cGMP modulation of ACh-stimulated exocytosis in guinea pig antral mucous cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2006. - Vol. 290. – No.6. – P.G1138-48.
474. Saeki T., Ohno T., Boku K., Saigenji K., Katori M., Majima M. Mechanism of prevention by capsaicin of ethanol-induced gastric mucosal injury -a study in the rat using intravital microscopy // *Aliment. Pharmacol. Ther.* - 2000. – Suppl. 1.- P. 135–144.
475. Salvemini D., Kim S.F., Mollace V. Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2013. - Vol. 304. – No. 7. – P. R473-87.
476. Salvemini D., Masferrer J.L. Interactions of nitric oxide with cyclooxygenase: in vitro, ex vivo, and in vivo studies // *Methods Enzymol.* – 1996. - Vol. 269. – P. 12–25.
477. Salvemini D., Settle S.L., Masferrer J.L. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis // *Br. J. Pharmacol.* – 1995. - Vol. 114. – P. 1171–1178.
478. Sandvik A.K., Kleaveland P.M., Waldum H.L. Stimulated pepsin secretion after omeprazole-induced acid suppression in the totally isolated, vascularly perfused rat stomach // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1987. - Vol. 22. -P. 362–366.
479. Santos A.R., Calixto J.B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice // *Neurosci. Lett.* -1997. - Vol. 235. – P. 73–76.

480. Saperas E., Mourelle M., Santos J., Moncada S., Malagelada J-R. Central vagal activation by an analogue of TRH stimulates gastric nitric oxide release in rats // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 1995. - Vol. 268. – P. G895–G899.
481. Sasaki Y., Aihara E., Ohashi Y., Okuda S., Takasuka H., Takahashi K., Takeuchi K. Stimulation by sparkling water of gastroduodenal HCO_3^- secretion in rats // *Med. Sci. Monit.* – 2009. - Vol. 15. – No. 12. – P. BR349-56.
482. Schemann M., Wood J.D. Synaptic behaviour of myenteric neurones in the gastric corpus of the guinea-pig // *J. Physiol.* – 1989. - Vol. 417. – P. 519–35.
483. Schepp W., Schmidtler J., Tatge C., Schusdziarra V., Classen M. Effect of substance P and neurokinin A on rat parietal cell function // *Am. J. Physiol.* – 1990. - Vol. 259. – No. 4 (Pt 1). – P. G646-54.
484. Schicho R., Florian W., Liebmann I., Holzer P., Lippe I.T. Increased expression of TRPV1 receptor in dorsal root ganglia by acid insult of the rat gastric mucosa // *Eur. J. Neurosci.* - 2004. - Vol. 19. – P. 1811–1818.
485. Schicho R., Schemann M., Holzer P., Lippe I.T. Mucosal acid challenge activates nitrergic neurons in myenteric plexus of rat stomach // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* - 2001. - Vol. 281. – P. G1316–21.
486. Schicho R., Schemann M., Pabst M.A., Holzer P., Lippe I.T. Capsaicin-sensitive extrinsic afferents are involved in acid-induced activation of distinct myenteric neurons in the rat stomach // *Neurogastroenterol. Motil.* – 2003. – Vol. 15. – P. 33–44.
487. Schierbeck N. P. Fernere Untersuchungen über das Auftreten der Kohlensäure im Magen // *Skand. Arch. f. Physiol.* – 1895. – No. 5. – P. 1-12.
488. Schmidt P.T., Holst J.J. Tachykinins in regulation of gastric motility and secretion // *Cell Mol. Life Sci.* – 2000. - Vol. 57. – No. 4. – P. 579-88.
489. Schmidt P.T., Rasmussen T.N., Holst J.J. Tachykinins stimulate acid and pepsinogen secretion in the isolated porcine stomach // *Acta Physiol. Scand.* – 1999. - Vol. 166. – No.4. – P. 335-40.
490. Schubert M.L. Functional anatomy and physiology of gastric secretion // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2015. – Vol. 31. – No. 6. – P. 479-85.
491. Schubert M.L. Gastric secretion// *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2000. -Vol.16. -No 6. -P. 463-8.
492. Schuligoi R., Jocic M., Heinemann A., Schöninkle E., Pabst M.A., Holzer P. Gastric acid-evoked c-fos messenger RNA expression in rat brainstem is signaled by capsaicin-resistant vagal afferents // *Gastroenterology.* – 1998. - Vol. 115. – P. 649–660.

493. Schultheis P.J., Clarke L.L., Meneton P., Harline M., Boivin G.P., Stemmermann G., Duffy J.J., Doetschman T., Miller M.L., Shull G.E. Targeted disruption of the murine Na^+/H^+ exchanger isoform 2 gene causes reduced viability of gastric parietal cells and loss of net acid secretion // *J. Clin. Invest.* – 1998. - Vol. 101. – No.6. – P. 1243-53.
494. Schultz H.D., Ustinova E.E. Capsaicin receptors mediate free radical-induced activation of cardiac afferent endings // *Cardiovasc. Res.* – 1998. - Vol. 38. – P. 348-55.
495. Seidler U. Acta Physiologica symposium: acid-base transporters and epithelial electrolyte transport // *Acta Physiol. (Oxf)* – 2011. - Vol. 201. – P. 1-2.
496. Seidler U., Hubner M., Roithmaier S., Classen M. pHi and HCO_3^- dependence of proton extrusion and Cl-base exchange rates in isolated rabbit parietal cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 1994. - Vol. 266. – P. G759–G766.
497. Seidler U., Rossmann H., Jacob P., Bachmann O., Christiani S., Lamprecht G., Gregor M. Expression and function of $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporters in the gastrointestinal tract // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2000. - Vol. 915. – P. 1-14.
498. Sellers L. A., Allen A., Bennett M. K. Formation of fibrin based gelatinous coat over repairing rat gastric epithelium after acute ethanol damage: interaction with adherent mucus // *Gut.* – 1987. - Vol. 28. – P. 835–843.
499. Sellers L.A., Allen A., Morris E.R., Ross-Murphy S.B. Mucus glycoprotein gels. Role of glycoprotein polymeric structure and carbohydrate side-chains in gel-formation // *Carbohydr Res.* – 1988. - Vol. 178. – P. 93-110.
500. Sharkey K.A., Williams R.G., Dockray G.J. Sensory substance P innervation of the stomach and pancreas. Demonstration of capsaicin-sensitive sensory neurons in the rat by combined immunohistochemistry and retrograde tracing // *Gastroenterology.* – 1984. - Vol. 87. – No. 4. – P. 914-21.
501. Shay H., Sun D.C.H. Etiology and pathology of gastric and duodenal ulcer / Bockus H.L. *Gastroenterology.* - Philadelphia-London. - Saunders Elsevier. – 1968. – P. 420-465.
502. Shi W., Hoganson C.W., Espe M. Electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopic identification and characterization of the tyrosyl radicals in prostaglandin H synthase 1 // *Biochemistry.* - 2000. - Vol. 39. - P. 4112–4121.
503. Shimamoto C., Fujiwara S., Kato M., Ito S., Katsu K., Mori H., Nakahari T. Inhibition of ACh-stimulated exocytosis by NSAIDs in guinea pig antral mucous cells: autocrine regulation of mucin secretion by PGE2 // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2005. - Vol. 288. – P. G39–G47.

504. Shimozawa N., Okajima K., Harada N., Arai M., Ishida Y., Shimada S., Kurihara H., Nakagata N. Contribution of sensory neurons to sex difference in the development of stress-induced gastric mucosal injury in mice // *Gastroenterology*. – 2006. - Vol. 131. – P. 1826–1834.
505. Shulkes A., Baldwin G.S., Giraud A.S. Regulation of gastric acid secretion / Johnson L.R., editor. - *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. - Fourth Edition. - Academic Press. - San Diego. - 2006. - P. 1223-1258.
506. Silen W., Ito S. Mechanisms for rapid re-epithelialisation of the gastric mucosal surface // *Annu. Rev. Physiol.* – 1985. - Vol. 47. – P. 217–229.
507. Simmons D.L., Botting R.M., Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition // *Pharmacol. Rev.* – 2004. - Vol. 56. – P. 387–437.
508. Simpson L, Goldenberg D., Hirschowitz B.I. Pepsinogen secretion by frog esophagus in vitro // *Am. J. Physiol.* – 1980. - Vol. 238. – P. G79-84.
509. Sjoval H., Forssell H., Olbe L. Simultaneous measurement of gastric acid and bicarbonate secretion in man // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1989. - Vol. 24. – P. 1163-71.
510. Skouho-Kristensen E, Fryklund J. Adrenergic stimulation of pepsinogen release from rabbit isolated gastric glands // *Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol.* – 1985. - Vol. 330. – P. 37-41.
511. Slomiany B.L., Sarosiek J., Slomiany A. Gastric mucus and the mucosal barrier // *Dig. Dis. (Basel, Switz)*. – 1987. - Vol. 5. – No. 3. – P. 125–45.
512. Smart D., Gunthorpe M.J., Jerman J.C., Nasir S., Gray J., Muir, A.I., Chambers J.K., Randall A.D., Davis J.B. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1) // *British. Journ. of Pharm.* – 2000. - Vol. 129. – P. 227 – 230.
513. Smith J.L., Torres E. L. Effect of topical acid on pepsinogen secretion in man // *Scand. J. Gastroenterol.* – 1990. - Vol. 25. – P. 372–378.
514. Smolka A.J., Schubert M.L. *Helicobacter-pylori*-induced changes in gastric acid secretion and upper gastrointestinal disease // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2017. - Vol. 400. – P. 227–252.
515. Southan G. J., Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms // *Biochem. Pharmacol.* – 1996. - Vol. 51. – No. 4. – P. 383-94.
516. Sowa G., Pypaert M., Sessa W.C. Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. - Vol. 98. – P. 14072 –14077.

517. Steen K.H., Reeh P.W., Anton F., Handwerker H.O. Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin, in vitro // J. Neurosci. – 1992. - Vol. 12. – P. 86–95.
518. Steer H. The source of carbon dioxide for gastric acid production // Anat. Rec. (Hoboken). – 2009. - Vol. 292. – P. 79-86.
519. Sterling D., Reithmeier R.A., Casey J.R. A Transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and Chloride/Bicarbonate exchangers // J. Biol. Chem. – 2001. - Vol. 276. – P. 47886-94.
520. Sternini C. Enteric and visceral afferent CGRP neurons. Targets of innervation and differential expression patterns // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1992. – P. 170-186.
521. Stevens M.H., Thirlby R.C., Feldman M. Mechanism for high PCO₂ in gastric juice: Roles of bicarbonate secretion and CO₂ diffusion // Am. J. Physiol. - 1987. - Vol. 253. – P. G527–30.
522. Streb H., Bayerdorffer E., Haase W., Irvine R.F., Schulz I. Effects of inositol-1,4,5-triphosphate on isolated subcellular fractions of rat pancreas // J. Membr. Biol. – 1984. - Vol. 81. – P. 241-53.
523. Streb H., Irvine R.F., Berridge M.J., Schulz I. Release of Ca²⁺ from a non-mitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol 1,4,5-triphosphate // Nature Lond. – 1983. - Vol. 306. – P. 67-9.
524. Sugamoto S., Kawauchi S., Furukawa O., Mimaki T.H., Takeuchi K. Role of endogenous nitric oxide and prostaglandin in duodenal bicarbonate response induced by mucosal acidification in rats // Dig. Dis. Sci. – 2001. - Vol. 46. – No. 6. – P. 1208-16.
525. Sugimoto Y., Negishi M., Hayashi Y., Namba T., Honda A., Watabe A., Hirata M., Narumiya S., Ichikawa A. Two isoforms of the EP3 receptor with different carboxyl-terminal domains. Identical ligand binding properties and different coupling properties with Gi proteins // J. Biol. Chem. – 1993. - Vol. 268. – P. 2712–2718.
526. Sugiura T., Bielefeldt K., Gebhart G.F. Mouse colon sensory neurons detect extracellular acidosis via TRPV1 // Am. J. Physiol. – 2007. - Vol. 292. – P. C1768–C1774.
527. Sugiura T., Dang K., Lamb K., Bielefeldt K., Gebhart G.F. Acid-sensing properties in rat gastric sensory neurons from normal and ulcerated stomach // J. Neurosci. – 2005. - Vol. 25. – P. 2617–2627.

528. Sutliff V.E., Rattan S., Gardner J.D., Jensen R.T. Characterization of cholinergic receptors mediating pepsinogen secretion from chief cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 1989. - Vol. 257. – P. G226–G234.
529. Suzuki K., Araki H., Mizoguchi H., Furukawa O., Takeuchi K. Prostaglandin E inhibits indomethacin-induced gastric lesions through EP-1 receptors // *Digestion.* – 2001. - Vol. 63. – No. 2. – P. 92-101.
530. Suzuki T., Kagoshima M., Shibata M., Inaba N., Onodera S., Yamaura T. Effects of several denervation procedures on distribution of calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactive in rat stomach // *Dig. Dis. Sci.* – 1997. – No. 6. – P. 1242-1254.
531. Svanes K., Gislason H., Guttu K., Herfjord J.K., Fevang J., Grønbech J.E. Role of blood flow in adaptive protection of the cat gastric mucosa // *Gastroenterology.* – 1991. - Vol. 100. – No. 5 (Pt 1). – P. 1249-58.
532. Svanes K., Takeuchi K., Ito S., Silen W. Effect of luminal pH and nutrient bicarbonate concentration on restitution after gastric surface cell injury // *Surgery.* – 1983. - Vol. 94. – P. 494–500.
533. Synnerstad, Johansson M., Nylander O., Holm L. Intraluminal acid and gastric mucosal integrity: the importance of blood-borne bicarbonate // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2001. – Vol. 280. – P. G121-9.
534. Szabo S. "Gastric cytoprotection" is still relevant // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2014. - Vol. 29. - Suppl 4. – P. 124-32.
535. Szabo S., Tache Y., Tarnawski A. The 'Gastric cytoprotection' concept of Andre Robert and the origins of a new series of International Symposia / Filaretova L.P., Takeuchi K. (eds). - *Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection in the Gastrointestinal Tract: mechanisms, prevention and treatment* // *Front Gastrointest. Res.* – Basel. Karger. – 2012. - Vol 30. – P. 1–23.
536. Szabo S., Trier J.S., Brown A., Schnoor J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat // *Gastroenterology.* - 1985. - Vol. 88. – P. 228– 236.
537. Szallasi A., Blumberg P.M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms // *Pharmacol. Rev.* - 1999. – No. 2. – P. 159-212.
538. Szallasi A., Joo F., Blumberg P.M. Duration of desensitization and ultrastructural changes in dorsal root ganglia in rats treated with resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog // *Brain Res.* – 1989. - Vol. 503. – P. 68-72.

539. Szolcsanyi J. Capsaicin, irritation and desensitization. Neurophysiological basis and future perspectives. / Irritation, chemical senses. - Eds. B.G.Green, J.R.Masson, and M.R.Kare. - Marcel Dekker. - N.Y. and Basel. - 1989. - 2. - P.141-168.
540. Szolcsanyi J., Jancso-Gabor A. Sensory effects of capsaicin congeners. II. Importance of chemical structure and pungency of pungent agents // Drug Res. - 1976. - Vol. 26. - P. 33-37.
541. Szolcsanyi J., Jancso-Gabor A., Joo F. Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effects of capsaicin // Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. - 1975. - Vol. 287. - P. 157-169.
542. Szolcsanyi J., Nemeth J., Orosz G., Helyes Z., Pinter E. Effect of capsaicin and resiniferatoxin on the release of sensory neuropeptides in the rat isolated trachea // Br. J. Pharmacol. - 1998. - Vol. 124. - P. 8P.
543. Tache Y. Brainstem neuropeptides and vagal protection of the gastric mucosal against injury: role of prostaglandins, nitric oxide and calcitonin-gene related peptide in capsaicin afferents // Curr. Med. Chem. - 2012. - Vol. 19. - P. 35-42.
544. Tache Y., Pappas T., Lauffenburger M., Goto Y., Walsh J.H., Debas H. Calcitonin gene-related peptide: potent peripheral inhibitor of gastric acid secretion in rats and dogs // Gastroenterology. - 1984. - Vol. 87. - P. 344-349.
545. Taché Y., Yoneda M., Kato K., Király A., Sütő G., Kaneko H. Intracisternal thyrotropin-releasing hormone-induced vagally mediated gastric protection against ethanol lesions: central and peripheral mechanisms // J. Gastroenterol. Hepatol.- 1994. - Vol. 9(suppl 1). - P. S29-S35.
546. Takafuji V.A., Evans A., Lynch K.R., Roche J.K. PGE2 receptors and synthesis in human gastric mucosa: perturbation in cancer // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty. Acids. - 2002. - Vol. 66. - P. 71-81.
547. Takeeda M., Hayashi Y., Yamato M., Murakami M., Takeuchi K. Roles of endogenous prostaglandins and cyclooxygenase isoenzymes in mucosal defense of inflamed rat stomach // J. Physiol. Pharmacol. - 2004. - Vol. 55. - No. 1 (Pt 2). - P. 193-205.
548. Takeuchi K. Gastric cytoprotection by prostaglandin E₂ and prostacyclin: relationship to EP1 and IP receptors // J. Physiol. Pharmacol. - 2014. - Vol. 65. - P. 3-14.
549. Takeuchi K. Prostaglandin EP receptors and their roles in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract // Adv. Clin. Chem. - 2010. - Vol. 51. - P. 121-44.

550. Takeuchi K., Szabo S. 7th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection - Focus on the Gastrointestinal Tract. - Honolulu Hawaii, USA. - September 9-11. – 2012 // *Digestion*. – 2013. - Vol. 87. – P. 160-162.
551. Takeuchi K., Aihara E. Mechanism of capsaicin-stimulated gastric HCO_3^- secretion – comparison with mucosal acidification / Capsaicin - sensitive neural afferentation and the gastrointestinal tract: from bench to bedside. - Edited by Gyula Mozsik, Omar M. E. Abdel-Salam and Koji Takeuchi. - InTech, Chapters published under CC BY 3.0 license 2014. – P. 142-156.
552. Takeuchi K., Aihara E., Sasaki Y., Nomura Y., Ise F. Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E2 and EP1 receptors in acid-induced HCO_3^- secretion in stomach // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 57. – No. 4. – P. 661-76.
553. Takeuchi K., Araki H., Umeda M., Komoike Y., Suzuki K. Adaptive gastric cytoprotection is mediated by prostaglandin EP1 receptors: a study using rats and knockout mice // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2001a - Vol. 297. – No. 3. – P. 1160-5.
554. Takeuchi K., Kagawa S., Mimaki H., Kawauchi S. COX and NOS isozymes involved in duodenal bicarbonate response induced by mucosal acidification in rats // *Dig. Dis. Sci.* – 2002. - Vol. 47. – P. 2116-2124
555. Takeuchi K., Kato S., Amagase K. Prostaglandin EP receptors involved in modulating gastrointestinal mucosal integrity // *J. Pharmacol. Sci.* – 2010a. - Vol. 114. – No. 3. – P. 248-61.
556. Takeuchi K., Kato S., Ogawa Y., Kanatsu K., Umeda M. Role of endogenous prostacyclin in gastric ulcerogenic and healing responses: a study using IP-receptor knockout mice // *J. Physiol. (Paris)*. - 2001b. - Vol. 95. – P. 75-80.
557. Takeuchi K., Kato S., Takeeda M., Ogawa Y., Nakashima M., Matsumoto M. Facilitation by endogenous prostaglandins of capsaicin-induced gastric protection in rodents through EP2 and IP receptors // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2003. - Vol. 304. – P. 1055-1062.
558. Takeuchi K., Koyama M., Hayashi S., Aihara E. Prostaglandin EP receptor subtypes involved in regulating HCO_3^- secretion from gastroduodenal mucosa // *Curr. Pharm. Des.* – 2010b. - Vol. 16. – No. 10. – P. 1241-51.
559. Takeuchi K., Matsumoto J., Ueshima K., Okabe S. Role of capsaicin-sensitive afferent neurons in alkaline secretory response to luminal acid in the rat duodenum // *Gastroenterology*. - 1991a. - Vol. 101. – P. 954-61.
560. Takeuchi K., Merhav A., Silen W. Mechanism of luminal alkalization by bullfrog fundic mucosa // *Am. J. Physiol.* – 1982. - Vol. 243. – No. 5. – P. G377-88.

561. Takeuchi K., Nagahama K. Animal model of acid-reflux esophagitis: pathogenic roles of acid/pepsin, prostaglandins, and amino acids // *Biomed. Res. Int.* – 2014.
562. Takeuchi K., Niida H., Matsumoto J., Ueshima K., Okabe S. Gastric motility changes in capsaicin-induced cytoprotection in the rat stomach // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1991b. - Vol. 55. – P. 147-155.
563. Takeuchi K., Nishiwaki H., Ishihara Y., Okabe S. Roles of gastric motility changes in cytoprotection induced by acetazolamide and cysteamine in rats // *Jpn. J. Pharmacol.* - 1987a. - Vol. 44. – P. 269–81.
564. Takeuchi K., Ohuchi T., Miyake H., Okabe S. Stimulation by nitric oxide synthase inhibitors of gastric and duodenal HCO_3^- secretion in rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1993. - Vol. 266. – No. 3. – P. 1512-9.
565. Takeuchi K., Ohuchi T., Okabe S. Endogenous nitric oxide in gastric alkaline response in the rat stomach after damage // *Gastroenterology.* - 1994a. - Vol. 106. – No. 2. – P. 367-74.
566. Takeuchi K., Ohuchi T., Tachibana M., Okabe S. The mechanism underlying stimulation of gastric HCO_3^- secretion by the nitric oxide synthase inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester in rats // *J. Gastroenterol. Hepatol.* - 1994b. - Vol. 9. – Suppl. 1. – P. S50-4.
567. Takeuchi K., Suzuki K., Araki H., Mizoguchi H., Sugamoto S., Umeda M. Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide in gastroduodenal ulcerogenic responses induced in rats by hypothermic stress // *J. Physiol. Paris.* – 1999. - Vol. 93. – No. 5. – P. 423-31.
568. Takeuchi K., Takeeda M., Amagase K., Nakashima M. Regulatory mechanism of the gastric hyperemic response following barrier disruption: roles of cyclooxygenase-1, the prostaglandin E2/EP1 receptor and sensory neurons // *Curr. Pharm. Des.* – 2015. - Vol. 21. – P. 3002-11.
569. Takeuchi K., Takehara K., Kato S., Asada Y., Yasuhiro T. Changes in gastric HCO_3^- secretory response to NG-nitro-L-arginine methyl ester in rats following repeated administration // *J. Gastroenterol. Hepatol.* – 1996. - Vol. 11. – No. 12. – P. 1164-70.
570. Takeuchi K., Takehara K., Kato S., Yagi K. PACAPs stimulate duodenal bicarbonate secretion at PACAP receptors in the rat // *Am. J. Physiol.* - 1997a. - Vol. 272. – P. G646-G653.
571. Takeuchi K., Tanaka H., Furukawa O., Okabe S. Gastroduodenal HCO_3^- secretion in anesthetized rats: effects of 16,16-dimethyl PGE_2 , topical acid and acetazolamide // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1986. - Vol. 41. – P. 87-99.

572. Takeuchi K., Ueshima K., Matsumoto J., Okabe S. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in acid-induced bicarbonate secretion in rat stomach // *Dig. Dig. Sci.* – 1992. - Vol. 37. – P. 737-43.
573. Takeuchi K., Yagi K., Kato S., Kitamura M. Role of prostaglandin E receptor subtypes in gastric and duodenal bicarbonate secretion in rats // *Gastroenterology.* - 1997b. - Vol. 113. – P. 1553-1559.
574. Tamma G., Wiesner B., Furkert J., Hahm D., Oksche A., Schaefer M. The prostaglandin E2 analogue sulprostone antagonizes vasopressin-induced antidiuresis through activation of Rho // *J. Cell. Sci.* – 2003. - Vol. 116. – P. 285–294.
575. Tan L.L., Bornstein J.C., Anderson C.R. Neurochemical and morphological phenotypes of vagal afferent neurons innervating the adult mouse jejunum // *Neurogastroenterol. Motil.* – 2009. - Vol. 9. – P. 994-1001.
576. Tanaka S., Podolsky D.K., Engel E., Guth P.H., Kaunitz J.D. Human spasmolytic polypeptide decreases proton permeation through gastric mucus in vivo and in vitro // *Am. J. Physiol.* – 1997. - Vol. 272. – No. 6 (Pt 1). – P. G1473-80.
577. Tang C.H., Yang R.S., Fu W.M. Prostaglandin E2 stimulates fibronectin expression through EP1 receptor, phospholipase C, protein kinase Calpha, and c-Src pathway in primary cultured rat osteoblasts // *J. Biol. Chem.* – 2005. - Vol. 280. – P. 22907–22916.
578. Tao C., Yamamoto M., Mimo H., Inoue M., Masujina T., Kajiyoma G. Pepsinogen secretion coupling of exocytosis visualised by videomicroscopy and Ca^{2+} in single cells // *Am. J. Physiol.* – 1998. - Vol. 274. – P. G1166-77.
579. Tarnawski A., Ahluwalia A., Jones M.K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids // *Curr. Pharm. Des.* – 2013. - Vol. 19. – No.1. – P. 126–32.
580. Tarnawski A., Hollander D. Cytoprotection of gastric and duodenal mucosa // *The Royal Society of Medicine. Curr. Med. Literature (Gastroenterol).* - 1987. – No. 6. – P. 3-11.
581. Tarnawski A., Hollander D., Stachura J., Krause W.J., Gergely H. Prostaglandin protection of the gastric mucosa against alcohol injury -a dynamic time-related process. Role of the mucosal proliferative zone // *Gastroenterology.* – 1985. - Vol. 88. – No. 1 (Pt 2). – P. 334-52.
582. Tarnawski A., Stachura J., Durbin T. Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats // *Gastroenterology.* – 1992. - Vol. 102. – P. 695–98.

583. Tarnawski A., Stachura J., Hollander D., Sarfeh I.J., Bogdal J. Cellular aspects of alcohol-induced injury and prostaglandin protection of mechanism for its mucosal healing action // *Eur. J. Gastroenterol and Hepatology*. – 1993. - Vol. 5. – No. 3. – P. S125-32.
584. Tarnawski A., Stachura J., Ivey K.J., Mach T., Bogdal J., Klimczyk B. Ethanol-induced duodenal lesions in man. Protective effect of prostaglandin // *Prostaglandins*. – 1981. - Vol. 21(Suppl). – P. 147-53.
585. Tarnawski A.S., Ahluwalia A., Jones M.K. The mechanisms of gastric mucosal injury: focus on microvascular endothelium as a key target // *Curr. Med. Chem*. – 2012 - Vol. 19. – No. 1. – P. 4–15.
586. Tashian R.E. The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function // *Bioessays*. – 1989. - Vol. 10. – P. 186-192.
587. Tashima K., Nakashima M., Kagawa S., Kato S., Takeuchi K. Gastric hyperemic response induced by acid back-diffusion in rat stomachs following barrier disruption - relation to vanilloid type-1 receptors // *Med. Sci. Monit*. – 2002. - Vol. 8. – No. 5. – P. BR157-163.
588. Tatsuguchi A., Sakamoto C., Wada K., Akamatsu T., Tsukui T., Miyake K., Futagami S., Kishida T., Fukuda Y., Yamanaka N., Kobayashi M. Localisation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* related gastritis and gastric ulcer tissues in humans // *Gut*. – 2000. - Vol. 46. – P. 782–789.
589. Teorell T. The acid-base balance of the secreting isolated gastric mucosa // *J. Physiol*. – 1951. - Vol. 114. – No. 3. – P. 267-76.
590. Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S., Flores-Santana W., Switzer C.H., Donzelli S., Hussain P., Vecoli C., Paolucci N., Ambs S., Colton C.A., Harris C.C., Roberts D.D., Wink D.A. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling // *Free Radic. Biol. Med*. – 2008. - Vol. 45. – P. 18-31.
591. Thomson A. B., Sauve M. D., Kassam N., Kamitakahara H. Safety of the long-term use of proton pump inhibitors // *World J. Gastroenterol*. - 2010. - Vol. 16. – No. 19. – P. 2323-2330.
592. Thornell I.M., Bevensee M.O. Regulators of Slc4 bicarbonate transporter activity // *Front. Physiol*. – 2015. - Vol. 6. – P. 166.
593. Tian J., Kim S.F., Hester L., Snyder S.H. S-nitrosylation/activation of COX-2 mediates NMDA neurotoxicity // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2008. - Vol. 105. – P. 10537–10540.
594. Toda N., Herman A.G. Gastrointestinal function regulation by nitrergic efferent nerves // *Pharmacol. Rev*. – 2005. - Vol. 57. – No. 3. – P. 315-38.

595. Todisco A., Ramamoorthy S., Pausawasdi N., Tacey K. Carbachol activates IkappaB kinase in isolated canine gastric parietal cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1999. - Vol. 261. – P. 877–84.
596. Todisco A., Takeuchi Y., Yamada J., Sadoshima J.I., Yamada T. Molecular mechanisms for somatostatin inhibition of c-fos gene expression // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 1997. - Vol. 272. – P. G721–9.
597. Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli // *Neuron.* – 1998. - Vol. 21. – P. 531–543.
598. Tomura H., Mogi C., Sato K., Okajima F. Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors // *Cell Signal.* – 2005. - Vol. 17. – P. 1466–1476.
599. Tousova K., Vyklicky L., Susankova K., Benedikt J., Vlachova V. Gadolinium activates and sensitizes the vanilloid receptor TRPV1 through the external protonation sites // *Mol. Cell Neurosci.* – 2005. - Vol. 30. – No. 2. – P. 207-17.
600. Tsai A.L, Wei C., Kulmacz R.J. Interaction between nitric oxide and prostaglandin H synthase // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1994. - Vol. 313. - P. 367–372.
601. Tsuganezawa H., Kobayashi K., Iyori M., Araki T., Koizumi A., Watanabe S., Kaneko A., Fukao T., Monkawa T., Yoshida T., Kim D.K., Kanai Y., Endou H., Hayashi M., Saruta T. A new member of the HCO₃ transporter superfamily is an apical anion exchanger of - intercalated cells in the kidney // *J. Biol. Chem.* – 2001. - Vol. 276. – P. 8180–8189.
602. Tsujii M., DuBois R.N. Alterations in cellular adhesions and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2 // *Cell.* – 1995. - Vol. 83. – P. 493-501.
603. Tulassay Z., Herszenyi L. Gastric mucosal defense and cytoprotection // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 2010. - Vol. 24. – No. 2. – P. 99–108.
604. Uchida M., Yano S., Watanabe K. The role of capsaicin sensitive afferent nerves in protective effect of capsaicin against absolute ethanol-induced gastric lesions in rats // *Jpn. J. Pharmacol.* – 1991. - Vol. 55. – P. 279-282.
605. Uno H., Arakawa T., Fukuda T., Yu H., Fujiwara Y., Higuchi K., Inoue M., Kobayashi K. Nitric oxide stimulates prostaglandin synthesis in cultured rabbit gastric cells // *Prostaglandins.* – 1997. – Vol. 53. – No. 3. – P. 153-62.
606. Uno K., Iuchi Y., Fujii J., Sugata H., Iijima K., Kato K., Shimosegawa T., Yoshimura T. In vivo study on cross talk between inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase in rat

[Type here]

- gastric mucosa: effect of cyclooxygenase activity on nitric oxide production // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2004. - Vol. 309. – No. 3. – P. 995-1002.
607. Urban L., Dray A. Capsazepine, a novel capsaicin antagonist, selectively antagonises the effects of capsaicin in the mouse spinal cord in vitro // *Neurosci. Lett.* – 1991. - Vol. 134. – P. 9–11
 608. Urushidani T., Forte J.G. Signal transduction and activation of acid secretion in the parietal cell // *J. Membr. Biol.* – 1997. - Vol. 159. – P. 99–111.
 609. Vaandrager A.B., Smolenski A., Tilly B.C., Houtsmuller A.B., Ehlert E.M., Bot A.G., Edixhoven M., Boomaars W.E., Lohmann S.M., Jonge H.R. Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. - Vol. 95. – P. 1466–1471.
 610. Van Der Stelt M., Di Marzo V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels // *Eur. J. Biochem.* – 2004. - Vol. 271. – P. 1827–1834
 611. Vane J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs // *Nat. New Biol.* – 1971. – 231. – Vol. 25. – P. 232-5.
 612. Vane J.R., Botting R.M. A better understanding of anti-inflammatory drugs based on isoforms of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) // *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* – 1995. - Vol. 23. – P. 41-8.
 613. Vassalle C., Domenici C., Lubrano V., L'Abbate A. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways in endothelial cells // *J. Vasc. Res.* – 2003. - Vol. 40. – No. 5. – P. 491-9.
 614. Vigna S.R., Mantyh C.R., Soll A.H., Maggio J.E., Mantyh P.W. Substance P receptors on canine chief cells: localization, characterization, and function // *J. Neurosci.* – 1989. - Vol. 9. – No. 8. – P. 2878-86.
 615. Vítěček J., Lojek A., Valacchi G., Kubala L. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges // *Mediators Inflamm.* – 2012. - Vol. 2012. – P. 1-22. Article ID 318087.
 616. Vriens J., Appendino G., Nilius B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels // *Mol. Pharmacol.* – 2009. - Vol. 75. – No. 6. – P. 1262-79.
 617. Wachter C.H., Heinemann A., Donnerer J., Pabst M.A., Holzer P. Mediation by 5-hydroxytryptamine of the femoral vasoconstriction induced by acid challenge of the rat gastric mucosa // *J. Physiol. (London).* – 1998. - Vol. 509. – P. 541–550.

618. Waddel P.J., Lawson S.N. The C-fiber conduction block caused by capsaicin on rat vagus nerve in vitro// *Pain*. – 1989. – Vol. 39. – P. 237-242.
619. Wagner S., Haruma K., Gladziwa U. Helicobacter pylori infection and serum pepsinogen A, pepsinogen C, and gastrin in gastritis and peptic ulcer: significance of inflammation and effect of bacterial eradication // *Am. J. Gastroenterol.* – 1994. - Vol. 89. – P. 211–18.
620. Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Heurteaux C., Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing // *Nature*. – 1997. - Vol. 386. – P. 173–177.
621. Walker K.M., Urban L., Medhurst S.J., Patel S., Panesar M., Fox A.J., McIntyre P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2003 - Vol. 304. – P. 56–62.
622. Wallace J. L., Miller M. J. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way // *Gastroenterology*. – 2000. - Vol. 119. – P. 512–520.
623. Wallace J.L. Cooperative modulation of gastrointestinal mucosal defense by prostaglandins and nitric oxide // *Clin. Invest. Med.* – 1996. - Vol. 19. – P. 346–351.
624. Wallace J.L., Cirino G., De Nucci G., McKnight W., MacNaughton WK. Endothelin has potent ulcerogenic and vasoconstrictor actions in the stomach // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 1989. - Vol. 256. – P. G661–G666.
625. Wallace J.L., Granger D.N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense // *FASEB J.* – 1996. - Vol. 10. – No. 7. – P. 731-40.
626. Wallace J.L., McKnight G.W. The mucoid cap over superficial gastric damage in the rat. A high-pH microenvironment dissipated by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and endothelin // *Gastroenterology*. – 1990. - Vol. 99. – P. 295–304.
627. Wallace J.L., McKnight W., Reuter B.K., Vergnolle N. NSAID induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2 // *Gastroenterology*. – 2000. - Vol. 119. – P. 706–714.
628. Wallace J.L., Whittle B.J.R. Role of prostanoids in the protective actions of BW755C on the gastric mucosa // *Eur. J. Pharmacol.* – 1985. - Vol. 115. – P. 45–52.
629. Wang Z., Petrovic S., Mann E., Soleimani M. Identification of an apical Cl⁻/HCO₃⁻-exchanger in the small intestine // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2002. - Vol. 282. – No. 3. – P. G573-9.
630. Wang Z., Schultheis P.J., Shull G.E.J Three N-terminal variants of the AE2 Cl⁻/HCO₃⁻-exchanger are encoded by mRNAs transcribed from alternative promoters // *Biol. Chem.* – 1996. - Vol. 271. – No. 13. – P. 7835-43.

631. Wang Z., Wang T., Petrovic S., Tuo B., Riederer B., Barone S., Lorenz J.N., Seidler U., Aronson P.S., Soleimani M. Renal and intestinal transport defects in Slc26a6-null mice // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2005. - Vol. 288. – No. 4. P. C957-65.
632. Ward S.M., Bayguinov J., Won K.J., Grundy D., Berthoud H.R. Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract // *J. Comp. Neurol.* – 2003. - Vol. 465. - P. 121-135
633. Warner T.D., Giuliano F., Vojnovic I., Bukasa A., Mitchell J.A., Vane J.R. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1999. - Vol. 96. – No. 13. – P. 7563-8.
634. Watanabe H., Vriens J., Prehen J., Droogmans G., Voets T., Nilius B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels // *Nature.* – 2003. - Vol. 424. – P. 434–438.
635. Watkins D.N., Garlepp M.J., Thompson P.J. Regulation of the inducible cyclo-oxygenase pathway in human cultured airway epithelial (A549) cells by nitric oxide // *Br. J. Pharmacol.* – 1997. - Vol. 121. – No. 7. – P. 1482-8.
636. Wemmie J.A., Price M.P., Welsh M.J. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities // *Trends Neurosci.* – 2006. - Vol. 29. – P. 578–586.
637. Werther J.L. The gastric mucosal barrier // *Mt. Sinai J. Med.* – 2000. - Vol. 67. – P. 41-53.
638. Whittle B. J., Lopez-Belmonte J., Moncada S. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat // *Br. J. Pharmacol. Mar.* – 1990. - Vol. 99. – No. 3. – P. 607-11.
639. Whittle B.J., Lopez B.J., Moncada S. Nitric oxide mediates rat mucosal vasodilation induced by intragastric capsaicin // *Eur. J. Pharmacol.* – 1992. - Vol. 218. – P. 339–341.
640. Wilde M.I., McTavish D. Omeprazole. An update of its pharmacology and therapeutic use in acid-related disorders // *Drugs.* – 1994. - Vol. 48. – P. 91–132.
641. Williams S.E., Turnberg L.A. Demonstration of a pH gradient across mucus adherent to rabbit gastric mucosa: evidence for a 'mucus-bicarbonate' barrier// *Gut* – 1981. – Vol. 22. – No 2. – P. 94-96.
642. Williamson J.R., Cooper R.H., Joseph S.K., Thomas A.P. Inositol triphosphate and diacylglycerol as intracellular second messengers in liver // *Am. J. Physiol.* – 1985. - Vol. 248. – No. 19. – P. C203-16.

643. Wilson K.T., Vaandrager A.B., De Vente J., Musch M.W., De Jonge H.R., Chang E.B. Production and localization of cGMP and PGE₂ in nitroprusside-stimulated rat colonic ion transport // *Am. J. Physiol.* – 1996. - Vol. 270. – No. 3(Pt 1). – P. C832-40.
644. Winter J., Dray A., Wood J.N., Yeats J., Bevan S. Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin // *Brain Res.* – 1990. - Vol. 520. – P. 131-140.
645. Wollin A., Soll A.H., Samloff I.M. Actions of histamine, secretin and PGE₂ on cyclic AMP production by isolated canine fundic mucosal cells // *Am. J. Physiol.* – 1979. - Vol. 237. – No. 6. – P. E437-43.
646. Wood J., Garthwaite J. Models for diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties. *Neuropharmacology.* – 1994. - Vol. 33. – P. 1235–1244.
647. Wood J.N., Winter J., James I.F., Rang H.P., Yeats J., Bevan S. Capsaicin- induced ion fluxes in dorsal root ganglion cell culture // *J. Neurosci.* – 1988. - Vol. 8. – P. 3208-3220.
648. Woodward D.F., Jones R.L., Narumiya S. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress // *Pharmacol. Rev.* – 2011. - Vol. 63. – P. 471–538.
649. Wultsch T., Painsipp E., Shahbazian A., Mitrovic M., Edelsbrunner M., Waldmann R., Lazdunski M., Holzer P. Deletion of the acid-sensing ion channel ASIC3 prevents gastritis-induced acid hyperresponsiveness of the stomach-brainstem axis // *Pain.* – 2008. - Vol. 134. – P. 245–253.
650. Xia R., Dekermendjian K., Lullau E., Dekker N. TRPV1: a therapy target that attracts the pharmaceutical interests // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2011. - Vol. 704. – P. 637-65.
651. Xu G.Y., Huang L.Y. Peripheral inflammation sensitizes P2X receptor-mediated responses in rat dorsal root ganglion neurons // *J. Neurosci.* – 2002. - Vol. 22. – P. 93–102.
652. Xu J., Barone S., Petrovic S., Wang Z., Seidler U., Riederer B., Ramaswamy K., Dudeja P.K., Shull G.E., Soleimani M. Identification of an apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in gastric surface mucous and duodenal villus cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2003. - Vol. 285. – P. G1225–G1234.
653. Xu J., Henriksnas J., Barone S., Witte D., Shull G.E., Forte J.G., Holm L., Soleimani M. SLC26A9 is expressed in gastric surface epithelial cells, mediates Cl⁻/HCO₃⁻ exchange, and is inhibited by NH₄⁺ // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2005. - Vol. 289. – P. 493–505.

654. Xu J., Song P., Miller M.L., Borgese F., Barone S., Riederer B., Wang Z., Alper S.L., Forte J.G., Shull G.E., Ehrenfeld J., Seidler U., Soleimani M. Deletion of the chloride transporter Slc26a9 causes loss of tubulovesicles in parietal cells and impairs acid secretion in the stomach // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2008. - Vol. 105. – No. 46. – P. 17955-60.
655. Yamamoto H., Tanaka A., Kunikata T., Hirata T., Kato S., Takeuchi K.J. Inducible types of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in adaptive cytoprotection in rat stomachs. *Physiol Paris.* – 1999. - Vol. 93. – No. 5. – P. 405-12.
656. Yamato M., Nagahama K., Kotani T., Kato S., Takeuchi K. Biphasic effect of prostaglandin E2 in a rat model of esophagitis mediated by EP1 receptors: relation to pepsin secretion // *Digestion.* – 2005. - Vol. 72. – No. 2-3. – P. 109-18.
657. Yandrapu H., Sarosiek J. Protective factors of the gastric and duodenal mucosa: an overview // *Curr. Gastroenterol. Rep.* – 2015. - Vol. 17. – No. 6. – P. 24
658. Yano T., Zissel G., Muller Q.J., Jae S.S., Satoh H., Ichikawa T. Prostaglandin E2 reinforces the activation of Ras signal pathway in lung adenocarcinoma cells via EP3 // *FEBS Lett.* – 2002. - Vol. 518. – P. 154–158.
659. Yao X., Forte J.G. Cell biology of acid secretion by the parietal cell // *Annu. Rev. Physiol.* – 2003. - Vol. 65. – P. 103-31.
660. Yokotani K., Fujiwara M. Effects of substance P on cholinergically stimulated gastric acid secretion and mucosal blood flow in rats // *J. Pharmacol. Exp Ther.* – 1985. - Vol. 232. – No. 3. – P. 826-30.
661. Yokoyama U., Iwatsubo K., Umemura M., Fujita T., Ishikawa Y. The prostanoid EP4 receptor and its signaling pathway // *Pharmacol. Rev.* – 2013. - Vol. 65. – No. 3. – P. 1010-52.
662. Young G.O., Stemmet N., Lastovica A. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates gastric mucosal pepsinogen secretion // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 1992. - Vol. 6. – P. 169–77.
663. Zanelli J.M., Stracca-Gasser M., Gaines-Das R.E., Guidobono F. The shortterm effect of peripherally administered brain-gut peptides on gastric acid secretion in rats // *Agents Actions.* – 1992. - Vol. 35. – No. 1-2 – P. 122-9.
664. Zheng H., Berthoud H.R. Functional vagal input to gastric myenteric plexus as assessed by vagal stimulation-induced Fos expression // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2000. – Vol. 279. – P. G73–G81.

665. Zheng Z.L., Rogers R.C., Travagli R.A. Selective gastric projections of nitric oxide synthase-containing vagal brainstem neurons // Neuroscience. – 1999. – Vol. 90. – P. 685–694.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АХ –ацетилхолин;
 ГЦ-I – растворимая гуанилатциклаза;
 ДМЯ – дорзальное моторное ядро;
 ДПК- двенадцатиперстная кишка;
 ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;
 ИНД – индометацин;
 ИПП – ингибиторы протонной помпы;
 КА –карбоангидраза;
 КПЗП – капсазепин;
 КАПС – капсаицин;
 КГРП – кальцитонин-ген родственный пептид;
 КРФ – кортикотропин релизинг фактор
 КЧПА – капсаицин-чувствительные первичные афференты;
 НПВП – нестероидные противовоспалительные средства;
 ПГ- простагландин;
 СОЖ – слизистая оболочка желудка;
 ТРГ – тиреотропин релизинг гормон;
 ФАД - флаavin аденин динуклеотид;
 ФМН – флаavinмононуклеотид;
 цАМФ - циклический аденозин монофосфат;
 цГМФ - циклический гуанозинмонофосфат;
 ЦОГ – циклооксигеназа;

AE – анионный обменник;
 ATF2 – активирующий фактор транскрипции 2;
 CFTR – трансмембранный муковисцидозный регулятор проводимости;
 CIC – хлорный канал 2 типа;
 CREB – фактор транскрипции, белок связывающий элемент ответа цАМФ;
 dbcГМФ -дибутирил производное циклического гуанозин монофосфата;
 ECL – энтерохромаффиноподобные клетки;
 EGFR- эпидермальный рецептор ростовых факторов;
 IGF- инсулиноподобный фактор роста;
 IP3 - инозитол трифосфат;
 H₄B – тетрагидробиоптерин;
 L-NAME – N-нитро-L-аргинин метиловый эфир;
 L-NNA - Nω-нитро-L-аргинин;
 MUC- муцин;
 NADPH - никотинамид-β-аденин динуклеотид фосфат;
 NBC – натрий бикарбонатный котранспортер
 NF- κB - ядерный фактор κB;
 NOS – синтаза оксида азота;
 PIP2 - фосфатидилинозитол -4-5-дифосфат;
 PKA – протеинкиназа A;
 PLA2α – фосфолипаза A2α;
 PLC – фосфолипаза C;
 SNP – нитропруссид натрия;
 SP – субстанция P;
 SST-соматостатин;
 TF- пептид трилистника;
 TGF – трансформирующий фактор роста;
 TRPV1 - рецептор переменного потенциала ванилоидный 1-го типа.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ДИСПЕРСИОННОГО АНАЛИЗА; ГЛАВНЫЕ ЭФФЕКТЫ

Таблица 1

А. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции бикарбонатов. Факторы: раздражение, омепразол, блокада NOS. Приложение к рисунку 9А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 49)=2.50	p=0.12
Блокада NOS	F(2, 49)=3.66	p<0.05
Омепразол × блокада NOS	F(2, 49)=4.63	p<0.05
Ирритация	F(119, 5831)=32.40	p<10 ⁻⁶
Ирритация × омепразол	F(119, 5831)=1.48	p<0.01
Ирритация × блокада NOS	F(238, 5831)=1.90	p<10 ⁻⁶
Ирритация × омепразол × блокада NOS	F(238, 5831)=1.52	p<10 ⁻⁵

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения базальной секреции бикарбонатов. Факторы: омепразол, блокада NOS. Приложение к рисунку 9Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 14)=0.94	p=0.35
Блокада NOS	F(2, 28)=0.91	p=0.41
Омепразол × блокада NOS	F(2, 28)=2.88	p=0.07

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения удельной продукции бикарбонатов. Факторы: омепразол, блокада NOS. Приложение к рисунку 9В.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 14)=2,86	p=0.11
Блокада NOS	F(2, 28)=8,82	p<0.01
Омепразол × блокада NOS	F(2, 28)=5.41	p<0.05

[Type here]

Г. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения относительной скорости секреции бикарбонатов. Факторы: омепразол, блокада NOS, раздражение. Приложение к рисунку 9Г.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 49)=3,15	p=0.07
Блокада NOS	F(2, 49)=1.46	p=0.26
Омепразол × блокада NOS	F(2, 49)=2.84	p<0.05
Ирритация	F(119, 5831)=48.39	p<10 ⁻⁶
Ирритация × омепразол	F(119, 5831)=0.91	p=0.75
Ирритация × блокада NOS	F(238, 5831)=0.55	p=1
Ирритация × омепразол × блокада NOS	F(238, 5831)=2.53	p<10 ⁻⁶

Д. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения пиковая относительная скорость секреции бикарбонатов. Факторы: омепразол, блокада NOS. Приложение к рисунку 9В.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 14)=5.67	p<0.05
Блокада NOS	F(2, 28)=4.67	p<0.05
Омепразол × блокада NOS	F(2, 28)=4.85	p<0.05

Таблица 2

А. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции бикарбонатов. Факторы: омепразол, блокада NOS, раздражение. Приложение к рисунку 10А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 33)=8.38	p<0.01
Блокада NOS	F(2, 33)=2.61	p=0.09
Омепразол × блокада NOS	F(2, 33)=3.07	p=0.06
Ирритация	F(119, 3927)=80.42	p<10 ⁻⁶
Ирритация × омепразол	F(119, 3927)=5.86	p<10 ⁻⁶
Ирритация × блокада NOS	F(238, 3927)=4.39	p<10 ⁻⁶

[Type here]

Ирритация × омепразол × блокада NOS	F(238, 3927)=2.41	p<10 ⁻⁶
-------------------------------------	-------------------	--------------------

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения базальной секреции бикарбонатов. Факторы: омепразол, блокада NOS. Приложение к рисунку 10Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 9)=0.58	p=0.46
Блокада NOS	F(2, 18)=0.41	p=0.67
Омепразол × блокада NOS	F(2, 18)=0.12	p=0.89

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения удельной продукции бикарбонатов. Факторы: омепразол, блокада NOS. Приложение к рисунку 2В.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 9)=23.28	p<0.001
Блокада NOS	F(2, 18)=9.34	p<0.01
Омепразол × блокада NOS	F(2, 18)=4.87	p<0.05

Г. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения относительной скорости секреции бикарбонатов. Факторы: омепразол, блокада NOS, ирритация. Приложение к рисунку 10Г.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 33)=12,66	p<0.01
Блокада NOS	F(2, 33)=14,47	p<0.0001
Омепразол × блокада NOS	F(2, 33)=4.76	p<0.05
Ирритация	F(119, 3927)=86.00	p<10 ⁻⁶
Ирритация × омепразол	F(119, 3927)=4.41	p<10 ⁻⁶
Ирритация × блокада NOS	F(238, 3927)=5.29	p<10 ⁻⁶
Ирритация × омепразол × блокада NOS	F(238, 3927)=2.04	p<10 ⁻⁶

Д. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения пиковой относительной скорости секреции бикарбонатов. Факторы: омепразол, блокада NOS. Приложение к рисунку 10Д.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 9)=10.10	p<0.05
Блокада NOS	F(2, 18)=16.99	p<0.0001
Омепразол × блокада NOS	F(2, 18)=4.61	p<0.05

Таблица 3

А. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции пепсиногена. Факторы: омепразол, блокада NOS, раздражение. Приложение к рисунку 11А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 42)=11.71	p<0.01
Блокада NOS	F(2, 42)=11.24	p<0.001
Омепразол × блокада NOS	F(2, 42)=0.12	p=0.88
Ирритация	F(4, 168)=39.70	p<10 ⁻⁶
Ирритация × омепразол	F(4, 168)=7.40	p<0.0001
Ирритация × блокада NOS	F(8, 168)=4.88	p<0.0001
Ирритация × омепразол × блокада NOS	F(8, 168)=3.10	p<0.01

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции пепсиногена. Факторы: омепразол, блокада NOS. Приложение к рисунку 11Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 13)=17.28	p<0.01
Блокада NOS	F(2, 26)=5.28	p<0.05
Омепразол × блокада NOS	F(2, 26)=0.81	p=0.45

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения продукции пепсиногена. Факторы: омепразол, блокада NOS. Приложение к рисунку 11В.

[Type here]

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 13)=17.40	p<0.001
Блокада NOS	F(2, 26)=9,20	p<0.01
Омепразол × блокада NOS	F(2, 26)=1,37	p=0.28

Таблица 4

А. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции пепсиногена. Факторы: омепразол, блокада NOS, ирритация. Приложение к рисунку 12А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 32)=1.7	p=0.20
Блокада NOS	F(2, 32)=2.69	p=0.09
Омепразол × блокада NOS	F(2, 32)=2.03	p=0.15
Ирритация	F(4, 128)=83.11	p<10 ⁻⁶
Ирритация × омепразол	F(4, 128)=1.18	p=0.32
Ирритация × блокада NOS	F(8, 128)=2.90	p<0.01
Ирритация × омепразол × блокада NOS	F(8, 128)=0.66	P=0.72

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения базальной секреции пепсиногена. Факторы: омепразол, блокада NOS. Приложение к рисунку 12Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 9)=0.90	p=0.37
Блокада NOS	F(2, 18)=1.46	p=0.26
Омепразол × блокада NOS	F(2, 18)=1.98	p=0.17

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения продукции пепсиногена бикарбонатов. Факторы: омепразол, блокада NOS. Приложение к рисунку 12В.

[Type here]

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 9)=0.73	p=0.41
Блокада NOS	F(2, 18)=2,85	p=0.08
Омепразол × блокада NOS	F(2, 18)=1.97	p=0.16

Таблица 5

А. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции бикарбонатов. Факторы: блокада ЦОГ, блокада NOS, раздражение. Приложение к рисунку 13А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Блокада ЦОГ	F(1, 46)=1.32	p=0.26
Блокада NOS	F(2, 46)=0.84	p=0.44
Блокада ЦОГ × блокада NOS	F(2, 46)=3.41	p<0.05
Ирритация	F(119, 5474)=29.24	p<10 ⁻⁶
Ирритация × блокада ЦОГ	F(119, 5474)=4.62	p<10 ⁻⁶
Ирритация × блокада NOS	F(238, 5474)=1.71	p<10 ⁻⁶
Ирритация × блокада ЦОГ × блокада NOS	F(238, 5474)=1.79	p<10 ⁻⁶

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения базальной секреции бикарбонатов. Факторы: блокада ЦОГ, блокада NOS. Приложение к рисунку 13Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Блокада ЦОГ	F(1, 11)=2,96	p=0.11
Блокада NOS	F(2, 22)=1.46	p=0.78
Блокада ЦОГ × блокада NOS	F(2, 22)=3,76	p<0.05

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения продукции бикарбонатов. Факторы: блокада ЦОГ, блокада NOS. Приложение к рисунку 13В.

[Type here]

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Блокада ЦОГ	F(1, 11)=0.36	p=0.56
Блокада NOS	F(2, 22)=4.26	p<0.05
Блокада ЦОГ × блокада NOS	F(2, 22)=15.01	p<0.0001

Г. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения относительной скорости секреции бикарбонатов. Факторы: блокада ЦОГ, блокада NOS, ирритация. Приложение к рисунку 13Г.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Блокада ЦОГ	F(1, 46)=9.21	p<0.01
Блокада NOS	F(2, 46)=10.00	p<0.001
Блокада ЦОГ × блокада NOS	F(2, 46)=13.94	p<0.0001
Ирритация	F(119, 5474)=60.74	p<10 ⁻⁶
Ирритация × блокада ЦОГ	F(119, 5474)=7.44	p<10 ⁻⁶
Ирритация × блокада NOS	F(238, 5474)=3.14	p<10 ⁻⁶
Ирритация × блокада ЦОГ × блокада NOS	F(238, 5474)=4.22	p<10 ⁻⁶

Д. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения относительной пиковой скорости секреции бикарбонатов. Факторы: блокада ЦОГ, блокада NOS. Приложение к рисунку 13Д.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Блокада ЦОГ	F(1, 11)=7.13	p<0.05
Блокада NOS	F(2, 22)=6.29	p<0.01
Блокада ЦОГ × блокада NOS	F(2, 22)=16.53	p<0.0001

Таблица 6

А. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции пепсиногена. Факторы: блокада ЦОГ, блокада NOS, ирритация. Приложение к рисунку 14А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости

[Type here]

Блокада ЦОГ	F(1, 35)=13.18	p<0.001
Блокада NOS	F(2, 35)=0.07	p=0.94
Блокада ЦОГ × блокада NOS	F(2, 35)=3.79	p<0.05
Ирритация	F(4, 140)=52.49	p<10 ⁻⁶
Ирритация × блокада ЦОГ	F(4, 140)=6.26	p<0.001
Ирритация × блокада NOS	F(8, 140)=4.16	p<0.001
Ирритация × блокада ЦОГ × блокада NOS	F(8, 140)=2.08	p<0.05

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения базальной секреции пепсиногена. Факторы: блокада ЦОГ, блокада NOS. Приложение к рисунку 14Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Блокада ЦОГ	F(1, 10)=8,78	p<0.05
Блокада NOS	F(2, 20)=0.98	p=0.39
Блокада ЦОГ × блокада NOS	F(2, 20)=3,91	p<0.05

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения продукции пепсиногена. Факторы: блокада ЦОГ, блокада NOS. Приложение к рисунку 14В.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Блокада ЦОГ	F(1, 10)=5.20	p<0.05
Блокада NOS	F(2, 20)=0.14	p=0.86
Блокада ЦОГ × блокада NOS	F(2, 20)=5.72	p<0.05

Таблица 7

А. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции бикарбонатов. Факторы: омепразол, инфузия NaHCO₃, ирритация. Приложение к рисунку 21А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 30)=1.51	p=0.23

[Type here]

Инфузия NaHCO_3	$F(1, 30)=2.69$	$p=0.11$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ омепразол	$F(1, 30)=6.73$	$p<0.05$
Ирритация	$F(119, 3570)=11.49$	$p<10^{-6}$
Ирритация \times инфузия NaHCO_3	$F(119, 3570)=2.37$	$p<10^{-6}$
Ирритация \times омепразол	$F(119, 3570)=1.85$	$p<10^{-6}$
Ирритация \times инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ омепразол	$F(119, 3570)=1.94$	$p<10^{-6}$

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения базальной секреции бикарбонатов. Факторы: омепразол, инфузия NaHCO_3 . Приложение к рисунку 21 Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	$F(1, 14)=0.58$	$p=0.46$
Инфузия NaHCO_3	$F(1, 14)=0.03$	$p=0.87$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ омепразол	$F(1, 14)=3.02$	$p=0.10$

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения удельной продукции бикарбонатов. Факторы: омепразол, инфузия NaHCO_3 . Приложение к графику 21 В.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	$F(1, 14)=7.63$	$p<0.05$
Инфузия NaHCO_3	$F(1, 14)=9.10$	$p<0.01$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ омепразол	$F(1, 14)=3.32$	$p=0.09$

Г. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения относительной скорости секреции бикарбонатов. Факторы: омепразол, инфузия NaHCO_3 , ирритация. Приложение к рисунку 21Г.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	$F(1, 30)=4.39$	$p<0.05$
Инфузия NaHCO_3	$F(1, 30)=3.66$	$p=0.07$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ омепразол	$F(1, 30)=0.18$	$p=0.67$

[Type here]

Ирритация	F(119, 3570)=61.81	$p < 10^{-6}$
Ирритация × инфузия NaHCO_3	F(119, 3570)=3.48	$p < 10^{-6}$
Ирритация × омепразол	F(119, 3570)=1.98	$p < 10^{-6}$
Ирритация × инфузия NaHCO_3 × омепразол	F(119, 3570)=1.05	$p = 0.34$

Д. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения пиковой относительной скорости секреции бикарбонатов. Факторы: омепразол, инфузия NaHCO_3 . Приложение к графику 21 Д.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Инфузия NaHCO_3	F(1, 14)=4,98	$p < 0.05$
Омепразол	F(1, 14)=6.62	$p < 0.05$
Инфузия NaHCO_3 × омепразол	F(1, 14)=0.32	$p = 0.58$

Таблица 8

А. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции пепсиногена. Факторы: омепразол, инфузия NaHCO_3 , ирритация. Приложение к рисунку 22А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Омепразол	F(1, 24)=6.09	$p < 0.05$
Инфузия NaHCO_3	F(1, 24)=0.01	$p = 0.94$
Инфузия NaHCO_3 × омепразол	F(2, 24)=0.49	$p = 0.49$
Ирритация	F(4, 96)=29.28	$p < 10^{-6}$
Ирритация × инфузия NaHCO_3	F(4, 96)=0.92	$p = 0.46$
Ирритация × омепразол	F(4, 96)=2.84	$p < 0.05$
Ирритация × инфузия NaHCO_3 × омепразол	F(4, 96)=0.90	$p = 0.47$

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения базальной скорости секреции пепсиногена. Факторы: омепразол, инфузия NaHCO_3 . Приложение к графику 22Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Инфузия NaHCO_3	$F(1, 11)=0.32$	$p=0.58$
Омепразол	$F(1, 11)=3.23$	$p=0.10$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ омепразол	$F(1, 11)=0.35$	$p=0.56$

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения продукции пепсиногена. Факторы: омепразол, инфузия NaHCO_3 . Приложение к графику 22В.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Инфузия NaHCO_3	$F(1, 11)=0.38$	$p=0.55$
Омепразол	$F(1, 11)=14.41$	$p<0.01$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ омепразол	$F(1, 11)=0.06$	$p=0.80$

Таблица 9

А. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции бикарбонатов. Факторы: инфузия NaHCO_3 , блокада cNOS, ирритация. Приложение к рисунку 23А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Инфузия NaHCO_3	$F(1, 48)=17.26$	$p<0.001$
Блокада cNOS	$F(2, 48)=0.37$	$p=0.69$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ блокада cNOS	$F(2, 48)=1.17$	$p=0.32$
Ирритация	$F(119, 5712)=47.39$	$p<10^{-6}$
Ирритация \times инфузия NaHCO_3	$F(119, 5712)=9.29$	$p<10^{-6}$
Ирритация \times блокада cNOS	$F(238, 5712)=1.84$	$p<10^{-6}$
Ирритация \times инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ блокада cNOS	$F(238, 5712)=1.07$	$p=0.23$

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения базальной скорости секреции бикарбонатов. Факторы: инфузия NaHCO_3 , блокада cNOS. Приложение к графику 23Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
--------------------------------	-------------------	--------------------

[Type here]

Инфузия NaHCO_3	$F(1, 14)=0.11$	$p=0.75$
Блокада cNOS	$F(2, 28)=0.80$	$p=0.46$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ блокада cNOS	$F(2, 28)=2.28$	$p<0.01$

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения удельной продукции бикарбонатов. Факторы: инфузия NaHCO_3 , блокада cNOS. Приложение к графику 23В.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Инфузия NaHCO_3	$F(1, 14)=20.88$	$p<0.001$
Блокада cNOS	$F(2, 28)=13.81$	$p<10^{-4}$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ блокада cNOS	$F(2, 28)=8.20$	$p<0.01$

Г. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения относительной скорости секреции бикарбонатов. Факторы: инфузия NaHCO_3 , блокада cNOS, ирритация. Приложение к рисунку 23Г.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Инфузия NaHCO_3	$F(1, 48)=14.31$	$p<0.001$
Блокада cNOS	$F(2, 48)=15.06$	$p<10^{-5}$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ блокада cNOS	$F(2, 48)=4.76$	$p<0.05$
Ирритация	$F(119, 5712)=58.50$	$p<10^{-6}$
Ирритация \times инфузия NaHCO_3	$F(119, 5712)=6.692$	$p<10^{-6}$
Ирритация \times блокада cNOS	$F(238, 5712)=7.31$	$p<10^{-6}$
Ирритация \times инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ блокада cNOS	$F(238, 5712)=2.08$	$p<10^{-6}$

Д. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения пиковой относительной скорости секреции бикарбонатов. Факторы: инфузия NaHCO_3 , блокада cNOS. Приложение к графику 23Д.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Инфузия NaHCO_3	$F(1, 14)=5.12$	$p<0.05$
Блокада cNOS	$F(2, 28)=16.74$	$p<10^{-4}$

Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ блокада cNOS	$F(2,28)=6.48$	$p<0.01$
--	----------------	----------

Таблица 10

Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции пепсиногена. Факторы: инфузия NaHCO_3 , блокада cNOS, ирритация. Приложение к рисунку 24А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Инфузия NaHCO_3	$F(1, 35)=0.60$	$p=0.44$
Блокада cNOS	$F(2, 35)=9.22$	$p<0.001$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ блокада cNOS	$F(2, 35)=4.66$	$p<0.05$
Ирритация	$F(4, 140)=41.37$	$p<10^{-6}$
Ирритация \times инфузия NaHCO_3	$F(4, 140)=1.77$	$p=0.14$
Ирритация \times блокада cNOS	$F(8, 140)=3.13$	$p<0.01$
Ирритация \times инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ блокада cNOS	$F(8, 140)=2.27$	$p<0.05$

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения базальной скорости секреции пепсиногена. Факторы: инфузия NaHCO_3 , блокада cNOS. Приложение к графику 24Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Инфузия NaHCO_3	$F(1, 10)=0,00$	$p=0.99$
Блокада cNOS	$F(2, 20)=1.51$	$p=0.25$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ блокада cNOS	$F(2, 20)=0.42$	$p=0.66$

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения продукции пепсиногена. Факторы: инфузия NaHCO_3 , блокада cNOS. Приложение к графику 24В.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Инфузия NaHCO_3	$F(1, 10)=0.19$	$p=0.67$
Блокада cNOS	$F(2, 20)=9.14$	$p<0.01$
Инфузия $\text{NaHCO}_3 \times$ блокада cNOS	$F(2, 18)=5.51$	$p<0.05$

Таблица 11

[Type here]

А. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции бикарбонатов. Факторы: индометацин (ИНД), блокада cNOS, ирритация. Приложение к рисунку 26А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
ИНД	F(1, 38)=5.17	p<0.05
Блокада cNOS	F(2, 38)=11.26	p<0.001
ИНД × блокада cNOS	F(2, 38)=7.62	p=0.65
Ирритация	F(119, 4522)=36.60	p<10 ⁻⁶
Ирритация× ИНД	F(119, 4522)=1.42	p<0.01
Ирритация × блокада cNOS	F(238, 4522)=4.80	p<10 ⁻⁶
Ирритация × ИНД × блокада cNOS	F(238, 4522)=1.99	p<10 ⁻⁶

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости базальной секреции бикарбонатов. Факторы: индометацин (ИНД), блокада cNOS. Приложение к рисунку 26 Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
ИНД	F(1, 11)=0.16	p=0.69
Блокада cNOS	F(2, 22)=3.73	p<0.05
ИНД × блокада cNOS	F(2, 22)=0.19	p=0.83

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения удельной продукции бикарбонатов. Факторы: индометацин (ИНД), блокада cNOS, Приложение к рисунку 26 В.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
ИНД	F(1, 11)=6,04	p<0.05
Блокада cNOS	F(2, 22)=14.54	p<10 ⁻⁴
ИНД × блокада cNOS	F(2, 22)=2.66	p=0.09

Г. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения относительной скорости секреции бикарбонатов. Факторы: индометацин (ИНД), блокада cNOS, ирритация, Приложение к рисунку 26Г.

[Type here]

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
ИНД	F(1, 38)=2.21	p=0.14
Блокада cNOS	F(2, 38)=6.34	p<0.01
ИНД × блокада cNOS	F(2, 38)=0.77	p=0.47
Ирритация	F(119, 4522)=33.27	p<10 ⁻⁶
Ирритация× ИНД	F(119, 4522)=0.94	p=0.64
Ирритация× блокада cNOS	F(238, 4522)=4.41	p<10 ⁻⁶
Ирритация × ИНД × блокада cNOS	F(238, 4522)=1.66	p<10 ⁻⁶

Д. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения относительной пиковой скорости секреции бикарбонатов. Факторы: индометацин (ИНД), блокада cNOS, Приложение к рисунку 26Д.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
IND	F(1, 11)=0.79	p=0.39
Блокада cNOS	F(2, 22)=6.39	p<0.01
ИНД × блокада cNOS	F(2, 22)=1.29	p=0.29

Таблица 12

А. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции бикарбонатов. Факторы: капсазепин (КПЗП), блокада cNOS, ирритация. Приложение к рисунку 32А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
КПЗП	F(1, 43)=4.39	p<0.05
Блокада cNOS	F(2, 43)=6.34	p<0.05
КПЗП × блокада cNOS	F(2, 43)=2.90	p=0.065
Ирритация	F(119, 5117)=27.06	p<10 ⁻⁶
Ирритация× КПЗП	F(119, 5117)=2.26	p<10 ⁻⁶
Ирритация × блокада cNOS	F(238, 5117)=1.36	p<0.001
Ирритация × КПЗП × блокада cNOS	F(238, 5117)=1.36	p<0.001

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения базальной секреции бикарбонатов. Факторы: капсазепин (КПЗП), блокада cNOS. Приложение к рисунку 32Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
КПЗП	F(1, 12)=1.07	p=0.32
Блокада cNOS	F(2, 24)=0.39	p=0.68
КПЗП × блокада cNOS	F(2, 24)=4.26	p<0.05

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения удельной продукции бикарбонатов. Факторы: капсазепин (КПЗП), блокада cNOS. Приложение к рисунку 32В.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
КПЗП	F(1, 12)=2.25	p=0.16
Блокада cNOS	F(2, 24)=5.34	p<0.05
КПЗП × блокада cNOS	F(2, 24)=3.45	p<0.05

Г. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения относительной скорости секреции бикарбонатов. Факторы: капсазепин (КПЗП), блокада cNOS, ирритация. Приложение к рисунку 32Г.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
КПЗП	F(1, 43)=1.15	p=0.29
Блокада cNOS	F(2, 43)=1.85	p=0.17
КПЗП × блокада cNOS	F(2, 43)=0.10	p=0.90
Ирритация	F(119, 5117)=26.55	p<10 ⁻⁶
Ирритация× КПЗП	F(119, 5117)=2.61	p<10 ⁻⁶
Ирритация × блокада cNOS	F(238, 5117)=1.22	p<0.01
Ирритация × КПЗП × блокада cNOS	F(238, 5117)=1.64	p<10 ⁻⁶

Д. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения относительной пиковой скорости секреции бикарбонатов. Факторы: капсазепин (КПЗП), блокада cNOS. Приложение к рисунку 31Д.

[Type here]

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
КПЗП	F(1, 12)=0.11	p=0.74
Блокада cNOS	F(2, 24)=1.88	p=0.17
КПЗП × блокада cNOS	F(2, 24)=2.28	p=0.12

Таблица 13

Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: относительные значения объемного кровотока. Факторы: капсазепин (КПЗП), ирритация. Приложение к рисунку 34 Б.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
КПЗП	F(1, 12)=4.94	p=0.09
Ирритация	F(29,348)=5.07	p<10 ⁻⁶
Ирритация× КПЗП	F(29, 348)=1.79	p<0.01

Таблица 14

А. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции кислоты. Факторы: ирритация, блокада cNOS, стимуляция вагуса. Приложение к рисунку 40А.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Ирритация	F(1, 33)=5.12	p<0.05
Блокада cNOS	F(2, 33)=3.54	p<0.05
Ирритация × блокада cNOS	F(2, 33)=0.10	p=0.07
Стимуляция вагуса	F(79, 2607)=17,30	p<10 ⁻⁶
Стимуляция × ирритация	F(79, 2607)=1,78	p<10 ⁻⁴
Стимуляция × блокада cNOS	F(158, 2607)=3.22	p<10 ⁻⁶
Стимуляция×ирритация × блокада cNOS	F(158, 2607)=2.22	p<10 ⁻⁶

Б. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения удельной продукции кислоты. Факторы: ирритация, блокада cNOS. Приложение к рисунку 40Б.

[Type here]

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Ирритация	F(1, 10)=1.60	p<10 ⁻⁵
Блокада cNOS	F(2, 20)=4.59	p<0.05
Блокада cNOS×ирритация	F(2, 20)=4.78	p<0.05

В. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции бикарбонатов. Факторы: ирритация, блокада cNOS, стимуляция вагуса. Приложение к рисунку 40В.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Ирритация	F(1, 33)=14.83	p<0.001
Блокада cNOS	F(2, 33)=6.84	p<0.01
Ирритация × блокада cNOS	F(2, 33)=8.02	p<0.01
Стимуляция вагуса	F(79, 2607)=20.71	p<10 ⁻⁶
Стимуляция × ирритация	F(79, 2607)=7.96	p<10 ⁻⁴
Стимуляция× блокада cNOS	F(158, 2607)=6.33	p<10 ⁻⁶
Стимуляция×ирритация × блокада cNOS	F(158, 2607)=5.14	p<10 ⁻⁶

Г. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения удельной продукции бикарбонатов. Факторы: ирритация, блокада cNOS. Приложение к рисунку 40Г.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Ирритация	F(1, 10)=9.43	p<0.05
Блокада cNOS	F(2, 20)=6.03	p<0.05
Блокада cNOS×ирритация	F(2, 20)=4.25	p<0.05

Д. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения скорости секреции пепсиногена. Факторы: ирритация, блокада cNOS, стимуляция вагуса. Приложение к рисунку 40Д.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости

[Type here]

Ирритация	F(1, 35)=0.76	p=0.39
Блокада cNOS	F(2, 35)=0.89	p=0.42
Ирритация × блокада cNOS	F(2, 35)=1.16	p=0.33
Стимуляция вагуса	F(3, 105)=49.29	p<10 ⁻⁶
Стимуляция × ирритация	F(3, 105)=0.94	p=0.42
Стимуляция× блокада cNOS	F(6, 105)=2.94	p<0.05
Стимуляция×ирритация × блокада cNOS	F(6, 105)=2.31	p<0.05

Е. Смешанный дисперсионный анализ, Mixed ANOVA. Зависимые переменные: значения удельной продукции пепсиногена. Факторы: ирритация, блокада cNOS. Приложение к рисунку 40Е.

Фактор/взаимодействие факторов	Статистика Фишера	Уровень значимости
Ирритация	F(1, 11)=1.31	p=0.28
Блокада cNOS	F(2, 22)=4.46	p<0.05
Блокада cNOS×ирритация	F(2, 22)=0.45	p=0.64