

На правах рукописи

ЗОЛОТАРЕВ
Василий Авенирович

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

Специальность 1.5.5 – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург - 2022

Работа выполнена в лаборатории физиологии пищеварения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Гриневич Владимир Борисович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий 2 кафедрой (терапии усовершенствования врачей) ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации.

Тюренков Иван Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки Российской Федерации, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой фармакологии и фармации Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Пасечников Виктор Дмитриевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой терапии с курсом диетологии ФГБОУ ВО Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__» 2022 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.137.01 (Д 002.020.01) по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6) и на сайте Института <http://infran.ru>

Автореферат разослан «__» 2022 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор биологических наук _____ Н.Э. Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 желудка (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. Холлантера (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 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 агентов: факторов роста тканей, гастрина, холецистокинина, тиротропин-релизинг гормона, бомбезина, кортикотропин-релизинг гормона, пептида YY, нейрокинина A, соматостатина, лептина, оксида азота, агонистов аденоцина 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 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 факторов: 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, что 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 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 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 гастродуodenальную 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 (cNOS) описывается в литературе как главный механизм гастропротекции (Ко, Cho, 1999). Защитное действие оказывают малые (не влияющие на секрецию кислоты) дозы не только экзогенных ПГ, но и экзогенного NO (Wallace, Miller, 2000). В то же время Нитрергическая регуляция секреции бикарбонатов в желудке представляет собой сложный многоуровневый процесс. Изоформы кальций - кальмодулин зависимой cNOS, 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 ульцерогенез и гиперемию 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

катализитической 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 гипертонии, 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 капсицин-чувствительных первичных афферентных нервных окончаний в желудке в управлении активностью nNOS и eNOS.
5. Оценена степень взаимодействия нитрергической и простагландиновой систем в желудке при ирритации 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 допплеровской флюметрии 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 фармакологическая блокада синтеза 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 ирритации СОЖ, для чего использован селективный блокатор nNOS 7-нитроиндазол и неселективный блокатор обеих изоформ cNOS №-нитро-L-аргинин.

Положения, выносимые на защиту

1. Физиологический уровень кислотности и осмотическое давление близкий к показателям желудочного химуса при пищеварении является 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 эfferентным 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) обусловливает значительное усиление работы котранспортеров $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NB Ce-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 желудке 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 луминальную 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 конститтивной NOS на циклоксигеназу (ЦОГ) и синтеза 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 receptor 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 конститтивной 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 капсицин-чувствительных первичных афферентов и, в частности, роль рецептора переменного потенциала ванилоидного 1-го типа (TRPV1) 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 циклоксигеназой 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 Совещание 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 диссидентом 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 условиях слабой ирритации СОЖ. Развитие этого направления опиралось на проведенную автором разработку и верификацию экспериментальной

системы для непрерывной количественной оценки рН и РСО₂ 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 46 научных работ, включая 16 статей в рецензируемых журналах.

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.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено под контролем Комиссии по биоэтике Института физиологии им. И.П. Павлова РАН на крысах линии Спрг-Доули (Колтуши) массой 280-350 г (ЦКП "Биоколлекция ИФ РАН", Программа по сохранению и развитию биоресурсных коллекций ФАНО России). Всего в результативных экспериментах было использовано 570 половозрелых самцов. За 18-20 часов до опыта животные лишились пищи, но имели свободный доступ к воде. В хроническом опыте хирургическое выведение фистулы желудка на кожу живота проводили за 2 недели до начала эксперимента. Для наркотизации использовали Золетил 50 (10 мг/кг; Vibrac, Франция), который вводили внутрибрюшинно (в.б.). Хирургические вмешательства и экспериментальные воздействия в остром опыте выполнялись под уретановым наркозом (1.2 г/кг в.б.; Sigma-Aldrich Co., США). Перфузия желудка у

бодрствующих животных, подвижность которых была ограничена в клетке Боллмана, проводилась через коаксиальный зонд, введенный через фистулу в полость органа. В остром опыте перфузационный раствор поступал в желудок через пищеводный зонд. Отток жидкости происходил через введенную в бежелезистую часть органа (преджелудок) канюлю, проксимальный конец которой располагали в железистой части органа. В опытах под наркозом двенадцатиперстная кишка перевязывалась выше луковицы.

Полость желудка, перфузировали с постоянной скоростью и при постоянной температуре (1 мл/мин, 37 °C) растворами различной кислотности и осмотического давления: изотоническим относительно низкой кислотности (154 mM NaCl, pH 4.0), либо гипертоническими раствором (0.5 и 1 M NaCl) повышенной кислотности (pH 2.0 и 3.0). Концентрация H^+ и HCO_3^- в желудочном перфузате рассчитывалась по величинам pH и парциального давления углекислого газа (P_{CO_2}) в оттекающем из желудка растворе, которые измерялись с помощью комбинированного датчика, изготовленного в мастерских ИФ РАН (Золотарев и др. 1996).

Расчеты скорости 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. Концентрация свободных ионов бикарбоната, находящихся в равновесии с CO_2 , вычислялась по уравнению Гендерсона-Хассельбаха (Fandriks, Stage, 1986). В пробах перфузационного раствора также определяли концентрацию пепсиногена по разложению гемоглобинового стандарта (Гинодман, Соловьев, 1967; Blandizzi et al., 1999).

Для оценки скорости кровотока в стенке желудка использовали лазер-допплеровский флюметр (PeriFlux 2200 Peri-FluxPF3; Perimed, Швеция). Датчик PF 308 (диаметр рабочей части 3 мм) укреплялся на гибком кронштейне вертикально над серозной оболочкой передней стенки железистой части желудка. Выходной сигнал флюметра в милливольтах преобразовался в перфузионные единицы. Во всех опытах проводили

непрерывную регистрацию системного артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС).

В отдельной серии экспериментов производилась препаровка левого поддиафрагмального ствола блуждающего нерва и левого шейного блуждающего нерва. Поддиафрагмальный участок левого (центрального) блуждающего нерва очищали от соединительной ткани дистальнее печеночной ветви, помещали на биполярные Ag/AgCl электроды и защищали от высыхания каплей вазелинового масла. Для измерения скорости проведения нервного импульса в группах волокон субдиафрагмального вагуса регистрирующие электроды устанавливали на шейном участке левого ствола. Электрическая стимуляция производилась после перевязки левого и правого стволов вагуса под диафрагмой крациальнее раздражающих электродов. Кроме того, перерезались большие чревные нервы и перевязывались оба надпочечника.

По окончании эксперимента желудок изымали, вскрывали по большой кривизне и производили подсчет макроскопических изменений эпителия в соответствии со шкалой поражений, предложенной Гутом и соавт. (Guth et al., 1979).

В экспериментах использовались нижеперечисленные препараты. Омепразол (OME, 10 мг/кг; Astra, Швеция) инъецировали дважды: внутрибрюшно за 16-18 часов до опыта, а также внутривенно (в.в.) за 50 мин до воздействия ирритантов. Индометацин (ИНД, 5 мг/кг, в.в.) вводили за 50 мин до ирритации, N^ω-нитро-L-аргинин (L-NNA, 10 мг/кг, в.в.) и 7-нитроиндазол (7-NI, 10 мг/кг, в.в.), произведенные Sigma-Aldrich Co. (США), инъецировали за 15 мин до воздействия. Также производили близкую внутриартериальную (в.а.) инъекцию препаратов в спланхнический кровоток ретроградно через селезеночную артерию в дозе 1 мг/кг (L-NNA, либо 7-NI). Нитропруссид натрия (SNP, Sigma-Aldrich Co., USA) инъецировали в.а. в дозе 0.2 мг/кг за 5 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 (Sigma-Aldrich Co., USA) инъецировали в.в. за 15 мин до ирритации в дозе 50 мг/кг. Блокатор анионных транспортеров 4,4'-дизотиоцианостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота (DIDS; Sigma-Aldrich Co., USA) вводили в дозе 5 мг/кг за 15 мин до ирритации. Хлорид аммония (4 mM, Sigma-Aldrich Co., USA) апплицировали внутрижелудочно (в.ж.) в течение 10 мин, начиная введение за 15 мин до ирритации. Десенситизация капсацин-чувствительных нейронов достигалась с помощью подкожных инъекций капсацина (50 мг/кг, Sigma-Aldrich Co., USA), повторявшихся ежедневно в течение 3-х дней за неделю до эксперимента. Для инъекций капсацин растворяли сначала в смеси Tween 80 и этилового спирта (1:1) и затем в физиологическом растворе. Блокатор TRPV1 рецепторов капсазепин (Sigma-Aldrich Co., USA) вводили в.а. в течение 20 мин со скоростью $0.6 \text{ мг}^* \text{кг}^{-1} \text{ч}^{-1}$, начиная инфузию за 5 мин до ирритации. Блокатор ASIC, амилорида гидрохлорид (Sigma-Aldrich Co., USA), добавлялся в течение 15 мин до ирритации в перфузионный раствор в концентрации 0.2 mM. Уретан, атропина сульфат и гексаметония гидрохлорид (Sigma-Aldrich Co., USA) растворяли в физиологическом растворе. Блокаторы NOS, ИНД, ацетазоламид, DIDS и капсазепин растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO, Вектон, Россия), после чего доводили до нужной концентрации физиологическим раствором. Контрольные группы животных получали равный объем растворителя, 0.1% DMSO, эмульгированный в физиологическом растворе.

Сигналы от кардиографических электродов, датчика артериального давления (ПДП-300, Москва) и ректального термометра передавались в усилитель биопотенциалов. ЭДС датчиков pH и РCO₂ регистрировалась с помощью высокоточных pH-милливольтметров П-215 (Гомельприбор, Белоруссия). Усиленные сигналы направлялись в аналого-цифровой преобразователь ADC-PCI 6024E (National instruments Co., США). Выходной сигнал лазер-допплеровского флюметра передавался через интерфейс RS232. Компьютерный анализ и обработка данных экспериментов производились с помощью пакетов программирования LabView 8.5 (National instruments Co.,

США). В экспериментах текущие значения рН, РСО₂, частоты сердечных сокращений, АД и температуры тела усреднялись раз в 30 с. Сигнал допплеровского флоуметра усредняли за 3 сек. Результаты экспериментов представлены как скорость секреции и продукция Н⁺, НСО₃⁻ и пепсиногена, нормированные на сырой вес желудка. 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 ($M \pm m$). Величина выборки (n) соответствовала числу экспериментальных животных, поскольку к животному применялось только одно воздействие. Статистические сравнения эффектов блокаторов сNOS, ИНД и эффектов капсазепина проведены с помощью смешанного дисперсионного анализа (ANOVA). 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 сNOS. 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).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Желудочная секреция НСО₃⁻ в ответ на изменение полостной кислотности и осмотического давления. В работах, сформировавших современные представления о действии химических раздражителей на желудочную секрецию бикарбонатов (Aihara et al., 2005) и пепсиногена (Blandizzi et al., 1997), подавление секреции кислоты было обязательным условием эксперимента. В то же время естественная ацидификация существенно влияет на функции желудка, в частности, при ней гастропротективные процессы протекают активнее, чем при искусственном

увеличении кислотности (Phillipson et al., 2002). В проведенных экспериментах рассчитанная по измеренным значениям pH и PCO₂ желудочная секреция бикарбонатов, как базальная, так и вызванная ирритацией СОЖ, была впервые изучена при сохраненной секреции кислоты.

У бодрствующих крыс после 18-20-часового голодания при перфузии желудка изотоническим раствором NaCl низкой кислотности (154 mM, pH 4.0) стабильно регистрировалась значительная базальная кислотность (pH 2.4 - 3.0), которой соответствовала секреция хлороводородной кислоты 3.53 ± 0.23 мкмоль \times г $^{-1} \times$ мин $^{-1}$ (n=15). Базальная секреция бикарбонатов равнялась 1.41 ± 0.08 мкмоль \times г $^{-1} \times$ мин $^{-1}$. Подавление эндогенной секреции кислоты с помощью ОМЕ закономерно снижало базальную кислотность (pH 3.8-4.6), т.е. секреция уменьшалась до 0.44 ± 0.03 мкмоль \times мин $^{-1} \times$ г $^{-1}$ ($p < 10^{-4}$, n=12). Важно отметить, что 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).

Непродолжительное (10 мин) введение в полость желудка раствора слабых ирритантов (150 mM NaCl, pH 2.0 либо 500 mM NaCl, pH 4.0) приводило к угнетению базальной секреции кислоты и увеличению секреции бикарбонатов как у бодрствующих, так и у наркотизированных животных. В присутствии ОМЕ аппликация слабых ирритантов не влияла на низкий уровень кислотности в желудке. В то же время, на фоне ОМЕ происходило увеличение удельной продукции и относительной секреции HCO₃⁻ в ответ на внутрижелудочное введение кислоты (140 mM NaCl, pH 2.0) по сравнению с реакцией в нормализованном желудке. Показано, что основной причиной такого усиления секреции является увеличение градиента pH в полости при раздражении СОЖ.

Таким образом, в опытах как на бодрствующих, так и на наркотизированных животных с использованием метода непрерывной регистрации pH/PCO₂ впервые показано, что для запуска реакций адаптивной гастропротекции достаточно повышения кислотности и осмолярности в полости желудка в физиологических пределах близких к нормальным

показателям пищеварения. При этом желудочная продукция HCO_3^- зависела от уровня собственной секреции кислоты.

Изоформы конститутивной синтазы оксида азота на фоне ирритации СОЖ опосредуют разнонаправленные эффекты на желудочную секрецию бикарбонатов и пепсиногена. 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., 2010). Также сформировалось четкое представление об участии NO в управлении желудочной секрецией кислоты и пепсиногена (Berg et al., 1994, 2005; Kim, Kim, 1996; Hasebe et al., 2005; Fiorucci et al., 1995; Garcia-Vitoria et al., 2000; Raufman, 1992). В то же время влияние эндогенного NO на желудочную секрецию HCO_3^- по данным литературы не очевидно. В связи с этим в работе рассматривалось специфическое действие эндотелиальной (eNOS) и нейрональной синтазы NO (nNOS) на состояние защитного бикарбонатного барьера и продукцию пепсиногена, которое ранее не было установлено. Впервые была проведена оценка селективного влияния eNOS и nNOS при разных уровнях эндогенной секреции кислоты.

Поскольку в предшествовавших работах для угнетения NOS в желудке применялись только структурные аналоги L-Arg, в проведенных экспериментах также был использован препарат этой группы №-нитро-L-аргинин, неселективный блокатор конститутивных NOS, что позволило корректно сопоставить полученные данные с литературными. Другой примененный здесь ингибитор NOS – это селективный *in vivo* блокатор nNOS 7-нитроиндазол (Southan, Szabo, 1996), который ранее не использовался для оценки роли NO в регуляции желудочной секреции.

Применение в одной и той же экспериментальной модели как селективного блокатора nNOS, так и блокатора обеих изоформ (eNOS и nNOS) дало возможность теоретически оценить эффект избирательного угнетения eNOS. Интерпретация полученных результатов основывается на том, что L-

NNA и 7-NI имеют сходную фармакодинамику и фармакокинетику (Bush, Pollack, 2001; Víteček et al., 2012). Приняв, что eNOS и nNOS действуют независимо и аддитивно и имея независимые выборки данных, полученные при использовании одинаковых доз блокатора, эффект угнетения eNOS можно представить 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. Статистическая достоверность различий между рассчитанной величиной реакции при блокаде eNOS и контролем может быть формально установлена путем сравнения разности (A-B) с нулем.

Системное введение 7-NI (10 мг/кг, в.в.) ослабляло базальную секрецию HCO_3^- и подавляло продукцию HCO_3^- , вызванную ирритацией СОЖ. В аналогичных условиях неселективная блокада обеих изоформ конститутивной NOS с помощью такой же дозы L-NNA (10 мг/кг, в.в.) не приводила к достоверными изменениям базальной и стимулированной ирритацией секреции HCO_3^- . Ранее сходный эффект наблюдали под действием L-NAME (Takeuchi et al., 1999). Вычитание эффекта 7-NI из эффекта L-NNA, как предложено выше, дало разность достоверно больше нуля, т.е. продукция HCO_3^- должна увеличиваться после избирательного угнетения eNOS. Разнонаправленное действие 7-NI и L-NNA также было выявлено при локальной аппликации блокаторов в спланхнический кровоток в дозе на порядок меньшей, чем при системном введении (1 мг/кг, в.а.). При этом локальная инъекция блокаторов cNOS производилась после субдиафрагмальной двусторонней ваготомии, спланхникотомии и перевязки надпочечников. Как показали опыты с применением метиленовой сини, ингибитора растворимой гуанилатциклазы (ГЦ-1), действие NO полностью опосредуется ГЦ-1.

Получено подтверждение, что связанное с ирритацией усиление щелочного барьера практически полностью зависит от транспорта бикарбонатов из подслизистого слоя на люминальную поверхность эпителия.

Определяющую роль в этом процессе играют базолатеральные котранспортеры $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, NBCe-1,-2. Блокада этих мембранных переносчиков с помощью DIDS приводила к полному угнетению стимулированной ирритантами секреции HCO_3^- . Как показали эксперименты с блокадой карбоангидразы ацетазоламидом, синтез $\text{HCO}_3^- de novo$ не влияет на состояние бикарбонатного барьера.

Дополнительно было установлено, что основную роль в усилении продукции пепсиногена в ответ на внутрижелудочную аппликацию ирритантов играет nNOS экстрамуральной локализации.

В целом результаты экспериментов и проведенная теоретическая оценка вклада eNOS показали, что селективное угнетение эндотелиальной, либо нейрональной изоформы NOS оказывает различное действие на желудочную секрецию бикарбонатов, как базальную, так и вызванную ирритацией. Активация eNOS теоретически сопровождается ослаблением стимулированной продукции HCO_3^- . В то же время экспериментально доказано, что стимуляция nNOS приводит к увеличению продукции HCO_3^- . Получены также доказательства, что в этой реакции задействованы изоформы cNOS, локализованные преимущественно интрамурально.

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) от уровня секреции кислоты и отсутствие такой зависимости при действии селективного ингибитора nNOS (7-NI). На фоне ОМЕ 7-NI сохранял свое угнетающее влияние, снижая продукцию HCO_3^- почти до 30% от контроля ($p<0.05$, $n=9$). В то же время в присутствии ОМЕ эффект L-NNA менялся практически на противоположный, независимо от пути введения блокатора. Наблюдалось подавление реакции до 35% от контрольного уровня ($p<0.001$, $n=7\sim 9$), т.е. исчезали различия в действии L-NNA и 7-NI на продукцию HCO_3^- , вызванную ирритацией СОЖ (Рис. 1А,Б). Расчёты показали, что на фоне ОМЕ

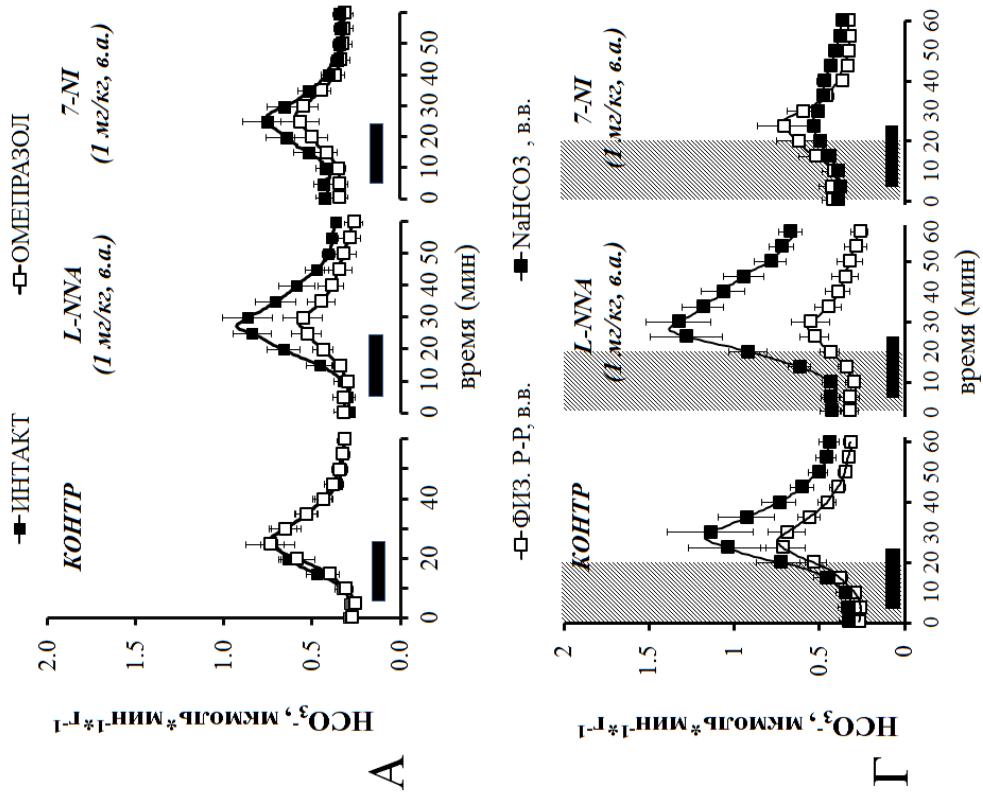
эффективность eNOS в управлении стимулированной секрецией HCO_3^- теоретически снижается до нуля (Рис. 1В).

В связи со значительным сокращением на фоне ОМЕ эффекта eNOS экспериментально проверялась гипотеза о том, что eNOS влияет на накопление HCO_3^- в подслизистом слое, которое зависит от секреции H^+ обкладочными клетками и известно как «щелочной прилив» (Niv, Fraser, 2002). Классическое исследование Т. Теорелла показало, что на каждый секретируемый в полость желудка протон приходится один ион HCO_3^- , направляющийся в подслизистый слой (Teorell, 1951). Следовательно, кровоток в капиллярах подслизистого слоя, направленный из глубоких участков к поверхности эпителия (Gannon et al., 1982), перемещает на фоне ИПП меньше бикарбонатов к базальной поверхности эпителиальных клеток. Несмотря на обильное присутствие карбоангидраз в цитоплазме желудочных эпителиоцитов, в самих клетках синтез HCO_3^- сравнительно невелик (Flemström, Sachs, 1975), и основным резервом для поддержания градиента pH в преэпителиальном слое слизи являются бикарбонаты тканевой жидкости (Allen, Flemström, 2005; Phillipson et al., 2002). Таким образом, изоформы cNOS в силу их локализации могут по-разному влиять на доступность резерва HCO_3^- для трансэпителиального переноса.

Расчёт дозы NaHCO_3 для в.в. инфузии, имитирующей колебания концентрации бикарбонатов в подслизистом слое, сопровождающие секрецию кислоты, был произведен на основе данных о базальной ($<5 \text{ мкмоль} \times \text{г}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$) и стимулированной у наркотизированных крыс электрическим раздражением блуждающего нерва ($\sim 40 \text{ мкмоль} \times \text{г}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$) продукции кислоты. Инфузия раствора NaHCO_3 ($10 \text{ ммоль} \times \text{кг}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$, в.в., 20 мин) не вызвала существенных изменений секреции бикарбонатов ни в нормацайдном состоянии, ни на фоне ОМЕ, что подтверждает незначительное участие парациеллюлярного транспорта в трансэпителиальном переносе HCO_3^- . Это наблюдение также позволяет заключить, что активность анионных транспортеров в эпителиальных клетках мало зависит от концентрации субстрата (HCO_3^-) в подслизистом слое, но меняется в ответ на паракринные сигналы.

Внутривенная инфузия NaHCO_3 при сохраненной базальной секреции кислоты не влияла на усиление секреции бикарбонатов, вызванное ирритацией СОЖ. Когда же собственная продукция кислоты подавлялась ОМЕ, инфузия NaHCO_3 значительно потенцировала продукцию HCO_3^- ($p<0.01$; Рис. 1Г,Д). При сохраненной собственной секреции кислоты внутривенное введение рассчитанной дозы NaHCO_3 не изменяло эффект блокаторов конститутивной NOS. В то же время увеличение концентрации бикарбонатов в кровотоке на фоне ОМЕ, приводило к изменению действия блокаторов NOS, что показано впервые. В частности, ингибиторное влияние L-NNA на продукцию HCO_3^- сменялось слабым потенцирующим действием, хотя статистически недостоверным ($p<0.05$, $n=10\sim7$). Расчеты подтвердили, что избирательное подавление активности eNOS приводит в этом случае к усилению секреции HCO_3^- (Рис. 1Е). В тех же условиях донор оксида азота (нитропруссид натрия), введенный внутривенно, угнетал секрецию HCO_3^- , стимулированную ирритацией СОЖ. В свою очередь, селективный *in vivo* блокатор nNOS, 7-NI, при повышении концентрации NaHCO_3 в желудочном кровотоке полностью сохранял свое ингибиторное действие (Рис. 1Г,Д; $p<0.01$, $n=10\sim6$). Инфузия NaHCO_3 не оказала существенного влияния на секрецию пепсиногена при интактной нитрергической системе и в присутствии блокаторов cNOS (L-NNA и 7-NI).

Таким образом, при ирритации СОЖ влияние эндотелиальной изоформы NOS на желудочную продукцию HCO_3^- зависит от величины эндогенной продукции кислоты, либо от концентрации бикарбонатов в кровеносных сосудах подслизистого слоя. Стимуляция nNOS обеспечивает усиление желудочной секреции HCO_3^- независимо от присутствия эндогенной кислоты, а равно от концентрации бикарбонатов в подслизистом кровотоке. От активности eNOS зависит транспорт на поверхность СОЖ дополнительного количества HCO_3^- , при изменении концентрации этого иона в подслизистом слое, в том числе во время «щелочного прилива».



26 Рис. 1.

Рис. 1.

А-В) Влияние блокаторов конститутивных синтаз оксида азота, L-NNA и 7-NI, на вызванную ирритацией СОЖ секрецию бикарбонатов в желудке при интактной собственной секреции кислоты (ИНТАКТ) и после угнетения секреции кислоты омепразолом (n=7~9).

Г-Е) Потенциация желудочной секреции бикарбонатов, вызванной ирритацией СОЖ, при внутривенной инфузии NaHCO_3 (КОНТР) в условиях угнетения секреции кислоты омепразолом. Влияние блокаторов конститутивных синтаз оксида азота, L-NNA и 7-NI (n=7~12).

А,Г) Скорость секреции. Б,Д) Удельная продукция. Г,Е) Относительные величины продукции бикарбонатов при избирательной блокаде eNOS либо nNOS, рассчитанные путем сопоставления значений, полученных под действием L-NNA и 7-NI (подробности в тексте с. 21). Реакция при интактной NOS (ИНТАКТ) принята за 100%.

Ирритация СОЖ путем полостной перфузии органа кислым гипертоническим раствором (1 M NaCl, pH 2.0) в течение 20 мин отмечена полосой на графиках А и Г. L-NNA и 7-NI (оба 1 мг/кг) инъецировали ретроградно в селезеночную артерию за 15 мин до ирритации. Контрольным группам вводили DMSO (0.1%, 0.3 мл). Омепразол (10 мг/кг) вводили за 18 ч и за 50 мин до аппликации ирританта внутрибрюшинно и внутривенно (в.в.), соответственно. Период в.в. инфузии раствора NaHCO_3 ($10 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1} \times \text{ч}^{-1}$) либо равного объема физиологического раствора отмечен на графике Г заштрихованным прямоугольником.

Абсолютные величины нормированы на сырой вес желудка. Статистические сравнения с соответствующей контрольной группой проведены с помощью теста Фишера LSD: * - $p < 0.05$; **, ## - $p < 0.01$.

Участие 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^- логично связать с особенностями локализации изоформ ферmenta в тканях органа. Эндотелиальная NOS в кровеносных сосудах мышечного и подслизистого слоя является основным ферментом, влияющим на кровоток в желудке (Whittle 1990; Price et al., 1996). Ранее установлено, что желудочная секреция HCO_3^- зависит от артериального давления, в частности, повышается при портальной гипертензии (Lamarque et al., 1997). Нейрональная изоформа ферmenta широко распространена в тканях органа вне кровеносных сосудов (Bredt et al., 1990; Garcia-Vitoria et al., 2000), в связи с чем вовлечена в управление многими физиологическими процессами.

Ирритация СОЖ сопровождается вазодилатацией, в результате чего усиливаются защитные процессы (Szabo et al., 2012). В течение 1-5 мин в

основном под действием ПГЕ₂ увеличивается проницаемость капилляров подслизистого слоя, и в зоне базальной пластиинки формируется отек, имеющий согласно концепции Ш. Шабо протективное значение как «тканевой барьер разведения», задерживающий диффузию H⁺ и токсинов из полости в стенку органа (Szabo, 2014). Со скоростью кровотока в подслизистом слое, очевидно, связана доступность бикарбонатов, накапливающихся в тканевой жидкости. Этому способствует архитектура субэпителиальных капилляров, восходящих от нижних отделов желудочных желез к поверхностному эпителию (Gannon et al., 1996) и задающих направление оттока HCO₃⁻ от обкладочных клеток.

Проведенная лазер-допплеровская оценка объемного кровотока показала, что локальная инъекция L-NNA (1 мг/кг, в.а.) в спланхническое русло вызывает продолжительное сокращение базального кровоснабжения желудка, но не влияет на показатели системной гемодинамики. Локальное введение 7-NI (1 мг/кг, в.а.) не имело статистически значимых последствий для базального желудочного кровотока. Перфузия полости желудка подкисленным гипертоническим раствором (1 М NaCl, pH 2.0) сопровождалась быстрым увеличением кровотока. Ингибиторы конститутивных синтаз оксида азота, L-NNA и 7-NI, в равной степени подавляли эту реакцию. Сходным образом действовала в.в. инъекция 5 мг/кг ИНД.

Сравнение результатов одновременной блокады eNOS и nNOS (с помощью L-NNA) с действием 7-NI, селективного блокатора nNOS, проведенное по описанной выше схеме, позволяет утверждать, что базальный кровоток в стенке желудка поддерживается за счет локальной стимуляции eNOS и не связан с активностью nNOS. Многократно подтвержденные литературные данные свидетельствуют, что желудочный кровоток регулируется капсаицин-чувствительными афферентными нервыми окончаниями (Holzer et al., 1994; Luo et al., 2013), активность которых в значительной мере является следствием реакции TRPV1 рецепторов. В проведенных экспериментах внутривенная инфузия блокатора TRPV1,

капсазепина, сопровождалась ослаблением базального кровотока. Вазодилатация, вызванная ирритацией СОЖ, преимущественно зависела от активности nNOS, так как кровоток в равной мере ослабевал в присутствии L-NNA и 7-NI, что говорит о незначительной вовлеченности eNOS. Этот результат, показанный впервые, не стал, однако, полной неожиданностью. Ранее nNOS была выявлена в периваскулярных капсицин-чувствительных нервных окончаниях, а также было описано сосудорасширяющее действие nNOS, индуцированное местной аппликацией капсицина (Raimura et al., 2013).

Подтверждение сосудистых эффектов слабой ирритации и влияния блокаторов cNOS и ЦОГ получено по результатам измерения зон умеренной гиперемии СОЖ, характеризующих вазодилатацию в подслизистом слое. Выявлено, что площадь гиперемированных участков существенно сокращалась под действием 7-NI и ИНД, но не L-NNA, что говорит о преобладающем значении nNOS и ЦОГ в регуляции локальной сосудистой реакции.

Проведенная оценка 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 этих ионов в подслизистом слое. Сокращение базального кровотока при блокаде eNOS препятствует вымыванию из подслизистого слоя накопившихся вследствие «щелочного прилива» ионов HCO_3^- . В результате образуется дополнительный резерв HCO_3^- для транспорта этих ионов на поверхность желудочного эпителия. Увеличение концентрации NO в стенке сосудов, в том числе за счет экзогенных доноров, напротив, усиливает объемный кровоток и способствует вымыванию «щелочного прилива», т.е. сокращению подслизистого резерва HCO_3^- . С другой стороны, ни nNOS, ни ЦОГ в данной экспериментальной модели не влияли на базальный тонус сосудов. Активация этих ферментов в ответ на химическое раздражение СОЖ сопровождалась кратковременным увеличением объемной скорости кровотока, что, однако, не оказалось принципиального действия на

транспорт бикарбонатов. 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).

Взаимодействие нитрергической и простагландиновой систем при регуляции желудочной секреции бикарбонатов и пепсиногена на фоне ирритации СОЖ. В желудочном эпителии и подслизистом слое NO и ПГ синтезируются в непосредственной близости друг от друга, хотя полного перекрывания сайтов сNOS и ЦОГ-1 не происходит. Вместе с тем хорошо известно о взаимодействии конститутивных NOS и ЦОГ при агрегации тромбоцитов, адгезии лейкоцитов, регуляции тонуса сосудов и реализации других цитопротективных процессов в ЖКТ (Cuzzocrea, Salvemani, 2007). Ранее также было установлено, 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^- целиком зависели от ГЦ-1/цГМФ-опосредованного синтеза ПГЕ₂, который в свою очередь активирует через receptor EP₁ белок Gqa и высвобождение внутриклеточного Ca^{2+} в цитоплазму (Takeuchi et al., 2005). В проведенных экспериментах применение на фоне кислотосупрессии блокатора ЦОГ индометацина подтвердило, что стимулирующее действие эндогенного NO/ГЦ-1 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 ирритацией СОЖ, но не оказалось влияния на базальную секрецию, что хорошо согласуется с данными литературы (Peskar, 2001). Селективный блокатор nNOS (7-NI) на фоне ИНД

не влиял на удельную продукцию HCO_3^- , т.е. действие nNOS практически полностью реализуется через усиление синтеза ПГ. Таким образом, существующие представления уточняются тем, что взаимодействие ГЦ-1/цГМФ/ЦОГ, происходящее в СОЖ при регуляции продукции HCO_3^- , является результатом активности nNOS.

Функциональные проявления взаимодействия eNOS и ЦОГ при управлении продукцией HCO_3^- значительно отличаются от эффектов взаимодействия nNOS/ПГ. В проведенных экспериментах на фоне кислотосупрессии и ИНД подавление активности eNOS приводило к увеличению продукции HCO_3^- . Причиной этому может быть усиление продукции NO при блокаде ЦОГ, выявленное ранее в культуре эндотелиальных клеток (Vassale et al., 2003). Описанное выше увеличение продукции HCO_3^- происходило при относительно низкой концентрации HCO_3^- в подслизистом слое, близкой к значениям в плазме крови натощак. При искусственном увеличении концентрации NaHCO_3 в желудочном кровотоке взаимное влияние ИНД и L-NNA, влияющее на секрецию бикарбонатов, прекращалось.

В тех же экспериментальных условиях показано, что базальная секреция пепсиногена не зависела от синтеза ПГ. Простагландины отчасти угнетали стимулированную секрецию пепсиногена и ослабляли реакцию на 7-NI, что указывает на частичное взаимодействие nNOS/NO/ЦОГ при регуляции продукции пепсиногена при ирритации СОЖ.

В целом влияние NO на транспорт HCO_3^- из подслизистого слоя на поверхность желудочного эпителия преимущественно зависит от активности ЦОГ. В частности, активирующий эффект nNOS полностью реализуется через взаимодействие NO/цГМФ/ЦОГ. При регуляции продукции HCO_3^- прямого опосредования эффектов eNOS простагландинами не происходит. Эксперименты данной серии предоставили новые сведения о механизмах взаимного влияния распространенных классов препаратов. Показано, что

применение нового поколения НПВП, конъюгированных с донорами NO, на фоне ИПП может ослабить защитный бикарбонатный барьер СОЖ.

Слабая ирритация слизистой оболочки желудка потенцирует секрецию, вызванную раздражением вагуса; роль нитрергической и простагландиновой систем. Парасимпатическая иннервация регулирует продукцию как основных ульцерогенных факторов, кислоты и пепсиногена, так и процессы адаптивной гастропротекции. Наряду со стимуляцией экзокринной секреции блуждающий нерв посредством мускариновой передачи активирует синтез ПГ и NO в желудке (Ko, Cho, 2011).

В опытах на наркотизированных животных электрическое раздражение периферического отрезка левого субдиафрагмального ствола вагуса (10В, 1 мс, 8Гц, 10 мин) вызывало значительное усиление секреции кислоты, бикарбонатов и пепсиногена. Эти реакции полностью зависели от Н- и М-холинергической передачи. Дополнительно показано, что секреция HCO_3^- , хотя и в малой степени, но зависела от капсаицин-чувствительных афферентных окончаний. Антидромная электрическая стимуляция этой группы волокон в составе желудочных ветвей блуждающего нерва приводила к увеличению продукции HCO_3^- , но не влила на секрецию H^+ и пепсиногена.

Впервые установлено, что продолжительная перфузия полости желудка раствором небольшой кислотности и осмотического давления ($\text{pH } 3.0$, 500 mM NaCl, 40 мин) значительно потенцирует холинергическую секрецию H^+ и HCO_3^- . При этом эндогенное закисление полостного перфузата не влияло на вагусную секрецию HCO_3^- . Вагусная продукция пепсиногена при ирритации СОЖ не изменилась.

Поскольку результаты получены в условиях нервной децентрализации желудка можно полагать, что усиление вагусной секреции H^+ и HCO_3^- происходит преимущественно под действием периферического NO, синтезируемого в ответ на раздражение желудочного эпителия кислым

гипертоническим раствором, и мало зависит от выделения NO из центробежных НАНХ нервных окончаний в составе блуждающего нерва. Кроме того, на фоне ирритации СОЖ блокаторы сNOS (L-NNA и 7-NI) в равной мере подавляли рост вагусной секреции H^+ и HCO_3^- , но были неэффективны при перфузии желудка изотоническим раствором низкой кислотности. Сопоставление эффектов неселективной блокады изоформ сNOS (с помощью L-NNA) и блокады nNOS (с помощью 7-NI) обосновывает ведущую роль nNOS в потенциации вагусной секреции H^+ и HCO_3^- . Также было установлено, что эндогенные ПГ тормозят вагусную секрецию в отсутствии химического раздражения СОЖ, однако, при слабой ирритации теряют свою эффективность, т.е. в условиях слабой ирритации СОЖ усиление вагусной продукции H^+ и HCO_3^- не связано с взаимодействием nNOS/ЦОГ.

Капсицин-чувствительные первичные афференты – основное звено в управлении секрецией бикарбонатов и пепсиногена в желудке при слабой ирритации СОЖ; роль TRPV1 рецепторов. Экспериментально доказано, что капсицин-чувствительные первичные афференты являются основным посредником при стимуляции защитной секреции HCO_3^- и сосудистых реакций, связанных с увеличением полостной кислотности в желудке. (Takeuchi, Aihara, 2002, Takeuchi et al., 2014). Тем не менее блокада главных сайтов связывания протонов, ассоциированных с капсицин-чувствительными афферентами, а именно TRPV1 и кислоточувствительных ионных каналов (ASIC), парадоксальным образом не оказывала влияния на секрецию бикарбонатов (Aihara et al., 2005; Sasaki et al., 2009).

Проведенная работа в целом подтвердила ведущую роль капсицин-чувствительных афферентов в качестве локальных интеграторов гастропротективных реакций. В частности, было выяснено, что действие изоформ сNOS на удельную желудочную продукцию HCO_3^- при раздражении СОЖ кислотой полностью зависит от возбуждения этих нервных окончаний.

Их десенситизация с помощью алкалоида капсацина приводила к значительному сокращению базальной секреции бикарбонатов и практически полностью подавляла удельную продукцию HCO_3^- при ирритации СОЖ подкисленным гипертоническим раствором. Впервые установлено, что базальная секреция HCO_3^- отчасти обусловлена реакцией основных молекулярных сенсоров H^+ , а именно TRPV1 и ASIC. Также было доказано, что эти реакции были связаны с местным возбуждения капсацин-чувствительных афферентов, т.к. развивались в условиях нервной децентрализации желудка.

Сенсоры протонов (TRPV1, ASIC) не играли заметной роли в увеличении продукции HCO_3^- при раздражении СОЖ экзогенной кислотой, однако, было отмечено участие TRPV1 в усилении кровотока во время ирритации СОЖ. Анализ эффектов L-NNA, и 7-NI при закислении желудочного содержимого показал, что стимуляция TRPV1 является достаточным сигналом для увеличения активности eNOS. С другой стороны, реакция на 7-NI на фоне действия блокатора TRPV1 капсазепина не изменилась. Кроме того, исследование показало, что активация TRPV1 не была достаточным стимулом для изменения секреции пепсиногена при ирритации, в том числе на фоне блокаторов cNOS.

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 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-I/ЦОГ независимо от уровня собственной секреции кислоты в желудке и концентрации бикарбонатов в подслизистом слое. С другой стороны, эндогенные ПГ угнетают эффект 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 нехолинергическим 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 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-І/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 преэпителиального бикарбонатного барьера и кровоснабжения подслизистого слоя.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК

1. Золотарев В. А., Р. П. Хропычева. Взаимодействие синтаз оксида азота с циклооксигеназами при регуляции физиологических и патофизиологических процессов и его роль в механизмах адаптивной гастропротекции // Усп. физиол. наук. - 2021. - Т. 52, №4. - С. 3–17.
2. 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.
3. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Вершинина Е.А., Хропычева Р.П. Участие TRPV1 в регуляции продукции бикарбонатов и кровотока в желудке при увеличении полостной кислотности // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. - 2018. -Т. 104(10). - С. 1202-1214.
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. (Перевод: Zolotarev V.A., Andreeva Y.V., Khropyscheva R.P. Effect of TRPV1 on activity of isoforms of constitutive nitric oxide synthase during regulation of bicarbonate secretion in the stomach //Bull Exp. Biol. Med. - 2019. - V. 166(3). - P. 310-312)
5. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Силин Л.В., Хропычева Р.П. Нитрергическая регуляция транспорта бикарбонатов из подслизистого слоя желудка наркотизированных крыс //Рос. Физиол. Журн. им. И. М. Сеченова. - 2017. -Т. 103(4). –С. 432-445.
6. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Вершинина Е.А., Хропычева Р.П. Взаимодействие конститутивных синтаз оксида азота с циклооксигеназами при управлении секрецией бикарбонатов в слизистой оболочке желудка // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. - 2017.- Т. 163(1). -С. 9-13. (Перевод: Zolotarev V.A., Andreeva Y.V., Vershinina E.A., Khropyscheva R.P. Interaction of constitutive nitric oxide synthases with cyclooxygenases in

regulation of bicarbonate secretion in the gastric mucosa //Bull. Exp. Biol. Med. -2017. -V. 163(1). – P. 6-9).

7. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Вершинина Е.А., Хропычева Р.П. Роль конститутивных синтаз оксида азота в регуляции желудочной секреции бикарбонатов на фоне слабой ирритации слизистой оболочки // Рос. Физиол. Журн. им. И. М. Сеченова. - 2015. –Т. 101(4). - С. 415-432.
8. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Хропычева Р.П. Действие слабых ирритантов на желудочную продукцию бикарбонатов и пепсиногена зависит от уровня секреции кислоты //Рос. Физиол. Журн. им. И. М. Сеченова. - 2012; -Т.98 (6). - С. 744-756.
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. (Перевод: Zolotarev V.A., Khropyscheva R.P. Effect of proton pump inhibitors on the secretion of bicarbonates and pepsinogen induced by chemical stimulation of the gastric mucosa// Bull. Exp. Biol. Med. - 2013. -V.154(4). - P. 415-418).
- 10.Золотарев В.А., Хропычева Р.П., Поленов С.А. Паттернзависимая вагусная регуляция желудочной секреции. Роль гистаминового опосредования //Докл. Акад. Наук. - 2005. - Т. 401(3). - С. 1-4. (Перевод: Zolotarev V. A., Khropyscheva R. P., Polenov S. A. Pattern-dependent vagal control of gastric secretion: the role of histamine mediation// Dokl. Biol. Sci. -2005. -V. 401. - P. 92–94).
- 11.Жуйкова С.Е., Хропычева Р.П., Золотарев В.А., Поленов С.А., Самонина Г.Е. Новые пептидные регуляторы желудочной секреции крыс (амилин, PGP и семакс) //Эксп. Клин. Гастроэнтерол. - 2003. -№2. - С.86-89.
- 12.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. Мед. - 2002. -Т. 133(3). - С.210-213. (Перевод: Zolotarev V.A., Khropyscheva R.P., Polenov S.A. Selective regulation of acid, pepsinogen, and bicarbonate

- secretion in the stomach by different C-fiber populations of vagus nerve //Bull. Exp. Biol. Med. - 2002. -V.133(3). - P. 210-213).
13. Золотарев В.А., Ноздрачев А.Д. Капсицин-чувствительные афференты блуждающего нерва //Рос. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова - 2001. - Т.87(2). - С. 182-207.
14. 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. Мед. -2000, - Т. 129(1). - С. 12-15. (Перевод: Khropycheva R.P., Zolotarev V.A., Polenov S.A. Quantitative analysis of the role of cholinergic, gastrin, and histamine regulatory mechanisms of pepsinogen production in the stomach of narcotized rats //Bull. Exp. Biol. Med. -2000. - V. 129(1). - P. 7-9).
15. Хропычева Р.П., Золотарев В.А., Поленов С.А. Роль гистаминового звена в механизмах вагусных и гастриновых влияний на секреторную функцию желудка крыс //Рос. Физиол. Журн. им. И. М. Сеченова -2000. - Т. 86(11). - С. 1539-1547.
16. Золотарев В.А., Поленов С.А., Лепнев Г.П., Разумова Н.А. Метод непрерывной количественной оценки секреции кислоты и бикарбонатов в желудке наркотизированных крыс //Рос. Физиол. журн. им. И. М. Сеченова. -1996, -Т.82(7). - С.111-116.
- Публикации в сборниках научных трудов и материалах конференций***
17. Золотарев В.А. Роль TRPV1 в нитрергической регуляции адаптивной гастропротекции //Журн. Эволюц. Физиол. Биохим. - 2020. - Т.56(7). - С. 597. Материалы XVI Всероссийской конференции с международным участием и XVI «Совещания по эволюционной физиологии имени академика Л.А. Орбели», С-Петербург.19-22 октября 2020 г.
18. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Хропычева Р.П. Взаимодействие изоформ конститутивных синтаз оксида азота с циклооксигеназой при регуляции протективной секреции бикарбонатов в желудке. //Тезисы докладов. Всероссийской конференции с международным участием,

посвященной 95-летию Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 9-11 декабря 2020 г. – 2020. – СПб. - С. 180.

19. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Хропычева Р.П. Роль TRPV1, эндотелиальной и нейрональной синтаз оксида азота в регуляции секреции бикарбонатов в желудке //Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.- 2018.- № 2.- С. 67-67.
20. Золотарев В. А. Взаимодействие TRPV1 с нейрональной и эндотелиальной синтазами оксида азота при регуляции секреции бикарбонатов и кровотока в желудке //Тезисы докладов Всероссийской конференции с международным участием, посвященная 170-летию со дня рождения И.П. Павлова «Интегративная физиология», Санкт-Петербург, 24–26 сентября 2019 г. – СПб – 2019. – С. 108-109.
21. Андреева Ю. В., Р. П. Хропычева, В. А. Золотарев. Нитрергическая регуляция трансэпителиального переноса бикарбонатов при ирритации слизистой оболочки желудка //Тезисы докладов Всероссийской конференции с международным участием, посвященная 170-летию со дня рождения И.П. Павлова «Интегративная физиология», Санкт-Петербург, 24–26 сентября 2019 г. – СПб – 2019. – С. 24-25.
22. Хропычева Р.П., Андреева Ю.В., Силин Л.В., Золотарев В.А. Нитрергическая регуляция транспорта бикарбонатов из подслизистого слоя желудка на поверхность слизистой оболочки у крыс //Материалы Санкт-Петербургского научного форума, посвященного 100-летию Физиологического общества им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 17–19 апреля 2017 г. – СПб – 2017. – С. 111–112.
23. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Хропычева Р.П. Участие нейрональной и эндотелиальной синтаз оксида азота в поддержании защитного бикарбонатного барьера на поверхности слизистой оболочки желудка // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова, посвященный 100-летию Физиологического общества им. И.П. Павлова, Воронеж, 18-22 сентября 2017 г. - 2017. – С. 499–501.

24. Zolotarev V. A., J. V. Andreeva, R. P. Khropycheva. Blockades of neuronal or endothelial synthases of nitric oxide have opposite effects on gastric bicarbonate secretion induced by mild irritation of the mucosa// FASEB. Experimental Biology. Meeting Abstracts. -2016, -V. 30(S1) -p. 1253.1 doi.org/10.1096/fasebj.30.1_supplement.1253.1
25. Золотарев В. А., Андреева Ю. В., Силин Л. В., Хропычева Р. П. Разнонаправленное действие нейрональной и эндотелиальной синтаз оксида азота на формирование защитного бикарбонатного барьера слизистой оболочки желудка //Тез. докл. Всероссийского симпозиума с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты физиологии пищеварения и питания», посвященного 90-летию со дня рождения академика А.М. Уголева, Санкт-Петербург, 15–17 марта 2016 г. -2016. - С. 50-51.
26. Андреева Ю.В., Хропычева Р.П., Золотарев В.А.. Роль нейрональной и эндотелиальной синтаз оксида азота в регуляции желудочной секреции бикарбонатов на фоне слабой ирритации слизистой оболочки. //Гастроэнтерол. Санкт-Петербург. -2015. -№1-2. –С. М1. Тез. докл. 15го Юбилейного съезда научного общества гастроэнтерологов России «Гастро-2015». Санкт-Петербург 25-27 мая 2015 г.
27. Золотарев В.А., Андреева Ю.В., Хропычева Р.П. Действие слабых ирритантов на желудочную продукцию бикарбонатов и пепсиногена зависит от уровня секреции кислоты //Тезисы докладов VIII Всероссийской конференции с международным участием, посвященная 220-летию со дня рождения академика К.М. Бэра «Механизмы функционирования висцеральных систем». Санкт-Петербург, Россия. 25-28 сентября 2012 года. - С. 93.
28. Khropycheva R.P., Andreeva J.V., Zolotarev V.A.. Effect of proton pump inhibitors on gastric secretion of bicarbonates and pepsinogen induced by chemical irritation of the gastric mucosa /6th International Symposium On Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection (Focus on GI Tract), St. Petersburg, Russia, 12-14 October 2011 //Abstract book -201.1- P. 27.

- 29.Хропычева Р.П., Андреева Ю.В., Золотарев В.А. Влияние омепразола на секрецию бикарбонатов и пепсиногена в желудке //Тезисы докладов XIV международного совещания и VII школа по эволюционной физиологии. Санкт-Петербург, 24 - 29 октября 2011 г. – СПб - 2011. – С. 197.
- 30.Золотарев В.А., Хропычева Р.П., Кочергинский Е.Б., Поленов С.А. Рефлекторная и местная регуляция желудочной секреции бикарбонатов. //Тезисы докл. XX съезда физиологического общества им. И.П.Павлова. Москва - 2007. - С.39.
- 31.Хропычева Р.П., Кочергинский Е.Б, Золотарев В.А. Механизм усиления бикарбонатного барьера в желудке под действием гастрина и гистамина. //Тезисы докл. XX съезда физиологического общества им. И.П.Павлова. Москва – 2007. - С.102.
- 32.Хропычева Р.П., Кочергинский Е.Б, Золотарев В.А. Желудочная секреция бикарбонатов, вызванная пролостной аппликацией слабых ирритантов угнетается ионами аммония. //Тезисы докл. V Всероссийской конф. с межд. участием, посвящ. 100-летию со дня рожд. В.Н.Черниговского «Механизмы функционирования висцеральных систем», 16-19 октября 2007 г., С-Пб. - 2007.- С. 338.
- 33.Хропычева Р.П., Золотарев В.А. Гистаминовое опосредование вагусной регуляции желудочной секреции. //Тезисы докл. Всероссийского симп. с межд. участием «Гормональные механизмы адаптации», 3-5 октября 2007 г., С-Пб. - 2007. - С. 86-87.
- 34.Золотарев В.А. , Р.П.Хропычева, С.А.Поленов. Выделение бикарбонатов слизистой оболочки желудка под действием пентагастрина и гистамина. /Материалы конференции «Актуальные проблемы физиологии пищеварения и питания» //Тез докл. Всероссийской конференции с международным участием, посвященная 80-летию акад. А.М.Уголева. С-Пб. - 3-5 октября 2006. – С. 40
- 35.Золотарев В.А. , Е.В. Бабкин, О.А. Саблин, В.Б. Гриневич, С.А. Поленов. Базальная и стимулированная продукция бикарбонатов в желудке пациентов клиники гастроэнтерологии. //Тез докл. VI Всероссийской

конференции «Механизмы функционирования висцеральных систем»
Санкт-Петербург. - 4-6 октября 2005.- С. 99.

- 36.Золотарев В.А., Хропычева Р.П., Поленов С.А. Паттерн-зависимая вагусная регуляция желудочной секреции //Проблемы интеграции функций в физиологии и медицине. Минск. ПЧУП Бизнес-оффсет - 2004. - С. 148-149.
- 37.Zolotarev V.A., R.P. Kropycheva, S.A. Polenov. Increases in basal and vagally-induced HCO_3^- productions stimulated by mild irritants in the rat stomach are mediated by different peripheral mechanisms //Pavlov Centenary Symposium “Integrative physiology and behaviour”. St-Peterburg. - 2004. - P.43.
- 38.Поленов С.А., Золотарев В.А., Хропычева Р.П., Кульчицкий В.А. Оксид азота (NO) в регуляции желудочной секреции //Росс. Физиол журн. Им. Сеченова. - 2004. - Т.90 - №8.- Приложение. -С. 21. Докл. XIX съезда физиологического общества им. И.П.Павлова.
- 39.Хропычева Р.П., Руденко С.А., Кочергинский Е.Б., Золотарев В.А.. Роль эндогенных простагландинов в модуляции слабыми ирритантами желудочной секреции у крыс //Росс. Физиол журн. Им. Сеченова -2004.- Т.90- №8 - Приложение. -С. 29. Докл. XIX съезда физиологического общества им. И.П.Павлова.
- 40.Хропычева Р.П., Золотарев В.А., Поленов С.А. Роль «щелочного прилива» в усиении бикарбонатного барьера в желудке крысы в ответ на полостную аппликацию слабых ирритантов //Мат. III Всероссийской конф. «Механизмы функционирования висцеральных систем». Санкт-Петербург - 2003.- С.339-340.
- 41.Золотарев В.А., Хропычева Р.П., Поленов С.А. Участие капсаицин-чувствительных аfferентов в регуляции желудочной секреции бикарбонатов. //Мат. Юбилейной конференции Института физиологии НАНБ. Минск - 2003.- С. 58-59.
- 42.Золотарев В.А., Р.П. Хропычева, С.А. Поленов. Усиление защитного бикарбонатного барьера в желудке крыс в ответ на полостную

- аппликацию слабых ирритантов //XIX Всероссийская научная конференция «Физиология и патология пищеварения». Сочи. -2003.- С. 45.
- 43.Поленов С.А., Ленцман М.В., Золотарев В.А., Демьяненко В.С., Хропычева Р.П. Новые механизмы и принципы нервной регуляции вегетативных функций // Мат. симпозиума "Интеграция механизмов регуляции висцеральных функций". Краснодар. - 1996.- С.65-66.
- 44.Zolotarev V.A., Hropycheva R.P., Polenov S.A. Gastric secretion depending on frequency and pattern of vagus nerve stimulation. //33 IUPS Congress Abstracts. -1997.- P009.11.
- 45.Хропычева Р.П., Золотарев В.А. Участие разных групп С-волокон абдоминального блуждающего нерва в регуляции секреции кислоты, пепсиногена и бикарбонатов в желудке наркотизированных крыс //Межд. конф., посвящ.150-летию И.П.Павлова. "Механизмы функционирования висцеральных систем". СПб. -1999. - С.387-388.
- 46.Золотарев В.А., Хропычева Р.П. Участие капсаицин-чувствительных С-волокон блуждающего нерва в регуляции секреции кислоты, пепсиногена и бикарбонатов в желудке наркотизированных крыс //Межд. конф., посвящ.150-летию И.П.Павлова. "Механизмы функционирования висцеральных систем". СПб. -1999 .- С.143-144.

Сокращения

7-NI – 7-нитроиндазол;
DIDS – диизоцианостильбен-2,2'-дисульфоновая кислота;
DMSO – диметилсульфоксид;
eNOS, nNOS – эндотелиальная и нейрональная синтаза оксида азота,
соответственно ;
L-NAME – N-нитро-L-аргинин метиловый эфир;
L-NNA - N ω -нитро-L-аргинин;
SNP – нитропруссид натрия;
TRPV1 - рецептор переменного потенциала ванилоидный 1-го типа.
АД – артериальное давление;

в.а. – внутриартериальное;
в.б. – внутрибрюшинное;
в.в. – внутривенное;
в.ж. – внутрижелудочное;
ГЦ-І – растворимая гуанилатциклаза;
ДПК – двенадцатиперстная кишка;
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;
ИНД – индометацин;
ИПП – ингибиторы протонной помпы;
КГРП – кальцитонин ген-родственный пептид;
НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты;
ОМЕ – омепразол;
ПГ – простагландины;
СОЖ – слизистая оболочка желудка;
ЦОГ – циклооксигеназа;
ЧСС – частота сердечных сокращений.