

DOI: 10.7868/S0869813918100076

УЧАСТИЕ TRPV1 В РЕГУЛЯЦИИ ПРОДУКЦИИ БИКАРБОНАТОВ И КРОВОТОКА В ЖЕЛУДКЕ ПРИ УВЕЛИЧЕНИИ ПОЛОСТНОЙ КИСЛОТНОСТИ

© В. А. Золотарев, Ю. В. Андреева, Е. А. Вершинина,
Р. П. Хропычева

Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: zolotarevva@infran.ru

Целью работы было выяснить, как влияет взаимодействие ванилоидных рецепторов переменного потенциала 1-го типа TRPV1 с эндотелиальной (eNOS) и нейрональной (nNOS) изоформами синтазы оксида азота на секрецию бикарбонатов (HCO_3^-) и кровотока в теле желудка на фоне аппликации кислоты на слизистую оболочку желудка (СОЖ). У наркотизированных крыс концентрация HCO_3^- в полостном перфузате желудка рассчитывалась на основе измеренных значений pH/PCO_2 , а объемный кровоток в стенке органа регистрировался с помощью лазерной доплеровской флоуметрии. Раздражение СОЖ подкисленным гипертоническим раствором (1 М NaCl, pH 2.0) значительно усиливало секрецию HCO_3^- . Деструкция капсаицин-чувствительных первичных афферентов большими дозами капсаицина устраняла эту реакцию. Блокада TRPV1 не влияла на продукцию HCO_3^- и увеличение кровотока, вызванные внутрижелудочной аппликацией кислоты. Тем не менее было показано, что TRPV1 активируют eNOS, что приводит к усилению желудочного кровотока и ослаблению транспорта HCO_3^- на поверхность СОЖ. На активность nNOS, усиливающую продукцию HCO_3^- , TRPV1 влияния не оказывали.

Ключевые слова: желудок, секреция бикарбонатов, кровотока, эндотелиальная и нейрональная синтазы оксида азота, капсаицин, TRPV1.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 10. С. 1202—1214. 2018

V. A. Zolotarev, Ju. V. Andreeva, E. A. Vershinina, R. P. Khropycheva. THE INVOLVEMENT OF TRPV1 IN CONTROL OF BICARBONATE PRODUCTION AND BLOOD FLOW IN THE STOMACH DURING INCREASE OF LUMINAL ACIDITY. Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia; e-mail: zolotarevva@infran.ru.

The aim of the study was to elucidate whether an interplay between transient receptor potential vanilloid 1 channels (TRPV1) and endothelial (eNOS) or neuronal (nNOS) isoform of nitric oxide synthase affects secretion of HCO_3^- and blood flow in the gastric corpus during application of acid on the gastric mucosa (GM). In anaesthetized rats, concentration of HCO_3^- in gastric lumen perfusate was calculated from measured values of pH/PCO_2 , and blood flow in the organ wall was recorded using laser Doppler flowmetry. Irritation of GM with acidified hyperosmotic saline

(1M NaCl, pH 2.0) induced a marked increase of HCO_3^- secretion. Destruction of capsaicin-sensitive primary afferents with large doses of capsaicin abolished this reaction. Inhibition of TRPV1 did not influence HCO_3^- production and increase of blood flow induced by intragastric acid. However, it was demonstrated that TRPV1 upregulated eNOS that caused an increase of gastric blood flow and reduced transport of HCO_3^- to the surface of GM. TRPV1 did not influence activity of nNOS which potentiated HCO_3^- production.

Key words: gastric, bicarbonate secretion, blood flow, endothelial and neuronal nitric oxide synthases, capsaicin, TRPV1.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 10. P. 1202—1214. 2018

Увеличение кислотности в просвете пищеварительного канала вследствие желудочной секреции хлороводородной кислоты является основным сигналом, запускающим в желудке и двенадцатиперстной кишке продукцию защитных паракринных факторов и как следствие секрецию бикарбонатов и муцина на поверхность эпителия, а также вазодилатацию в подслизистом слое [7, 18]. Известно, что желудочный эпителий малопроницаем для протонов, поэтому уменьшение pH в подслизистом слое при увеличении полостной кислотности, скорее всего, происходит в результате диффузии CO_2 , обильно насыщающего презепителиальный слой слизи при нейтрализации кислоты бикарбонатами [5]. В мембранах СОЖ присутствует несколько молекулярных сенсоров протонов. Основное значение среди них имеют ванилоидные рецепторы переменного потенциала 1-го типа (TRPV1), а также кислоточувствительные ионные каналы (ASIC). Они экспрессируются в плазматической мембране капсаицин-чувствительных первичных нервных окончаний, достигающих базальной пластинки [39]. В желудке крысы TRPV1-позитивные волокна присутствуют вблизи кровеносных сосудов, в адвентиции мышечного слоя и в пролиферативной зоне пришеечных слизистых клеток [26]. При этом наиболее густо они оплетают артериолы подслизистого слоя [19].

Ванилоидный рецептор 1-го типа, представляющий собой неселективный катионный канал, является основным маркером капсаицин-чувствительных нервных окончаний. Именно этот канал имеет сайт связывания капсаицина, а также ряда других природных соединений, содержащих ароматическую ванильную группу. При этом простые физические факторы, такие как нагревание (42—50 °C) и уменьшение внеклеточного pH, увеличивают вероятность пребывания канала в открытом состоянии [37]. Несмотря на модулирующую роль протонов в управлении TRPV1, закисление внеклеточной среды является достаточным стимулом для генерации ионных токов в нейронах дорзальных ганглиев спинного мозга и в узловатом ганглии блуждающего нерва [16, 25].

Экспериментально доказано, что при росте полостной кислотности в желудке капсаицин-чувствительные окончания необходимы для запуска защитной секреции HCO_3^- и сосудистых реакций. Деструкция этих афферентов под действием нейротоксических доз алкалоида капсаицина значительно ослабляет как секрецию HCO_3^- , так и гиперемическую реакцию [35, 36]. Тем не менее блокада основных сайтов связывания протонов, TRPV1 и ASIC, парадоксальным образом не оказывает влияния на желудочную секрецию бикарбонатов, вызванную действием кислоты [4, 32]. Интересно, что в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки секреция HCO_3^- в ответ на увеличение кислотности, по крайней мере частично, зависит от реакции TRPV1 [6].

Местное гастропротективное действие капсаицин-чувствительных нервных окончаний реализуется в основном за счет локального выделения кальцитонин ген-родственного пептида (КГРП), преобладающего нейромедиатора

спинальных афферентов в стенке желудка. Реакции адаптивной гастропротекции в ответ на действие слабых раздражителей значительно уменьшаются у КГРП ген-нокаутных животных [27, 33]. Выделяясь в непосредственной близости от артериол подслизистого слоя, КГРП активирует эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS) и, весьма вероятно, циклооксигеназу в прилежащих тканях [15, 17]. Дополнительно оксид азота (NO) в физиологической концентрации образуется в самих капсаицин-чувствительных нервных окончаниях, содержащих нейрональную синтазу оксида азота (nNOS) [31].

Наши предыдущие исследования показали, что в ацидифицированном желудке *in vivo* eNOS и nNOS оказывают противоположное действие на секрецию HCO_3^- на фоне раздражения СОЖ. Активация nNOS приводила к усилению секреции HCO_3^- , в то время как избирательное действие на eNOS, напротив, сопровождалось сокращением переноса HCO_3^- из подслизистого слоя на поверхность желудочного эпителия [2, 3]. Поскольку TRPV1 потенциально взаимодействует с обеими изоформами конститутивной NOS, можно предположить, что его вклад в разнонаправленные влияния на желудочную секрецию HCO_3^- мало проявляется в суммарной реакции. Целью данной работы было выяснить, в какой мере взаимодействие TRPV1 по отдельности с eNOS и nNOS влияет на секрецию HCO_3^- и кровотоков при повышении концентрации кислоты в полости желудка.

МЕТОДИКА

Исследование проведено под контролем Комиссии по биоэтике Института физиологии им. И. П. Павлова РАН на крысах линии Спрег-Доули массой 300—350 г (ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН», Программа по сохранению и развитию биоресурсных коллекций ФАНО России). Животные голодали в течение 18 ч до опыта, имея свободный доступ к воде. Под уретановым наркозом (1.2 г/кг, внутривенно) брюшную полость вскрывали по средней линии, после чего производили зондирование пищевода и безжелезистого преджелудка, а двенадцатиперстная кишка перевязывалась выше луковицы. В бедренную вену вводили гепаринизированный катетер, и в ряде опытов другой катетер вводили ретроградно в селезеночную артерию. У всех животных производилась двусторонняя субдиафрагмальная ваготомия. После препаровки брюшная полость закрывалась фольгированным полиэтиленом и согревалась лампой. Дополнительный обогрев животное получало через экспериментальный столик таким образом, чтобы поддерживать ректальную температуру на уровне 37—38 °С.

Во время эксперимента в желудок через пищеводный зонд со скоростью 1 мл/мин подавали нагретые до температуры тела растворы заданного химического состава, не содержащие буфер. Перфузат свободно оттекал через канюлю, введенную в преджелудок и расположенную таким образом, чтобы давление в полости органа оставалось близким к нулю. В начале опыта в течение 45—50 мин полость желудка промывали изотоническим раствором (154 mM NaCl, pH 4.0), после чего в течение 20 мин перфузировали раствором раздражителя, а именно гипертоническим раствором повышенной кислотности (1 M NaCl, pH 2.0). Затем в течение 40 мин продолжали перфузию изотоническим раствором NaCl, pH 4.0.

На выходе из желудка перфузат проходил через термостабилизированную камеру объемом 200 мкл, в которой находились pH-электрод и датчик P_{CO_2} . Концентрацию H^+ и HCO_3^- в потоке вычисляли по уравнению Гендерсо-

на—Хассельбаха, используя значения pH и P_{CO_2} , усредненные за 30-секундные интервалы [1]. Секретию H^+ и HCO_3^- рассчитывали, вычитая из величин, измеренных на «выходе» из желудка, «входные» значения, полученные при пропускании свежеприготовленных растворов через измерительную камеру.

В отдельной серии опытов проводили лазерную доплеровскую оценку скорости кровотока в стенке желудка. Для измерений использовали лазер-доплеровский флоуметр (PeriFlux 2200 Peri-FluxPF3; Perimed, Швеция) со стандартным датчиком PF 308. Датчик укреплялся на подвижном кронштейне вертикально над серозной оболочкой передней стенки тела желудка. На рабочую поверхность датчика надевали отрезок силиконовой трубки, удерживающий ткань на расстоянии 0.5—1 мм. Подвижность желудка ограничивалась плексигласовой пластинкой, подведенной под малую кривизну рядом с пищеводом. Передняя стенка желудка в месте регистрации дополнительно поддерживалась изнутри жестко зафиксированной перфузионной канюлей, введенной через преджелудок. Выходной сигнал флоуметра в мВ преобразовывался в перфузионные единицы.

В экспериментах использовались следующие препараты: блокаторы NOS, 7-нитроиндазол (7-NI, Sigma) либо N ω -нитро-L-аргинин (L-NNA, Sigma), которые вводили внутривенно (в.в.) в дозе 10 мг/кг за 15 мин до ирритации. Блокатор TRPV1 рецепторов капсазепин (Sigma) вводили в течение 20 мин ретроградно в селезеночную артерию (0.6 мг · кг⁻¹ · ч⁻¹, в. а.), начиная введение за 5 мин до ирритации. Блокатор ASIC амилорида гидрохлорид (Sigma) добавлялся в течение 15 мин до ирритации в перфузионный раствор (в. ж.) в концентрации 0.2 мМ. Контрольные группы животных получали внутривенно равный объем растворителя, 0.1 % диметилсульфоксида (DMSO, Вектон), эмульгированного в физиологическом растворе. Химическая деструкция капсаицин-чувствительных нейронов достигалась с помощью подкожных (п.к.) инъекций капсаицина (50 мг/кг, Sigma), повторявшихся ежедневно в течение 3 дней за неделю до эксперимента. Для инъекций капсаицин растворяли сначала в смеси Tween 80 и этиловом спирте (1 : 1) и затем в физиологическом растворе. Удовлетворительное развитие деафферентации контролировали перед началом эксперимента по утрате роговичного хемосенсорного рефлекса.

Результаты экспериментов представлены как скорость секреции и продукция HCO_3^- , нормированные на сырую массу 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 стандартную ошибку показывали только для каждого 10-го значения.

Величина выборки (n) соответствовала числу экспериментальных животных, поскольку каждое животное получало только одно воздействие. Статистические сравнения эффектов блокаторов cNOS и эффектов капсазепина проведены с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Результаты однофакторного ANOVA представлены в тексте, а результаты многофакторного анализа приведены в подписях к рисункам. Зависимой переменной в 3-факторном анализе была скорость секреции бикарбонатов на фоне ирритации (эффект ирритации), а в 2-факторном — продукция бикарбонатов на фоне

блокаторов cNOS. Последующие множественные сравнения производили, используя тест Фишера LSD. Различия признавались значимыми при $p < 0.05$. Для всех расчетов использован пакет программ Statistica 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Непродолжительная перфузия полости желудка подкисленным гипертоническим раствором хлорида натрия (1 М NaCl, pH 2.0, 20 мин) провоцировала быстрый рост секреции HCO_3^- , пик которой приходился на 15-ю мин после начала ирритации, после чего секреция возвращалась к базальному уровню в

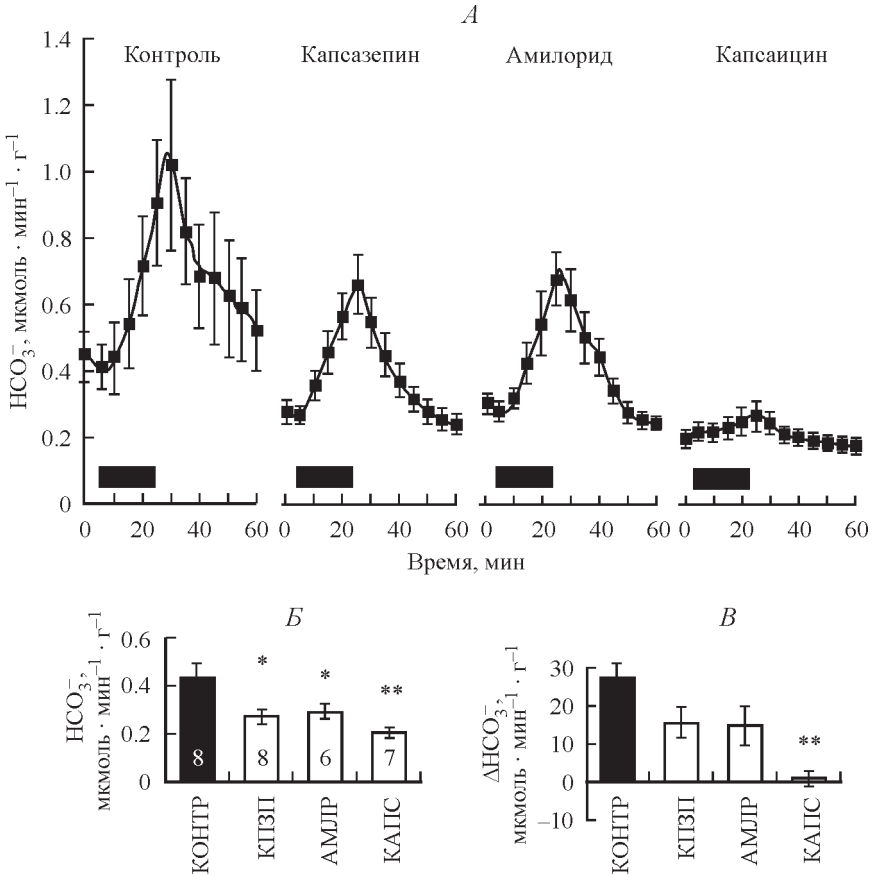


Рис. 1. Влияние капсазепина (КПЗП), амилорида (АМЛР) либо деструкции первичных афферентов капсаицином (КАПС) на секрецию бикарбонатов в желудке, вызванную ирритацией слизистой эпителия.

A — скорость секреции; *B* — базальная секреция; *B* — удельная продукция, стимулированная введением ирритантов. Ирритация СОЖ производилась гипертоническим подкисленным раствором (1 М NaCl, pH 2.0) в течение 20 мин (отмечено полосой на графике *A*). КПЗП ($0.6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) инфузирова-ли ретроградно в селезеночную артерию в течение 20 мин, начиная введение за 5 мин до ирритации; АМЛР (0.2 мМ, в. ж.) апплицировали в течение 15 мин до ирритации; КАПС (50 мг/кг, п.к.) вводили ежедневно в течение 3 дней начиная за 7 дней до эксперимента. Статистические сравнения (*B*, *B*) про-ведены с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Для последующих множественных срав-нений использован тест Фишера LSD: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Величины выборок указаны на столбцах диаграммы *B*.

A

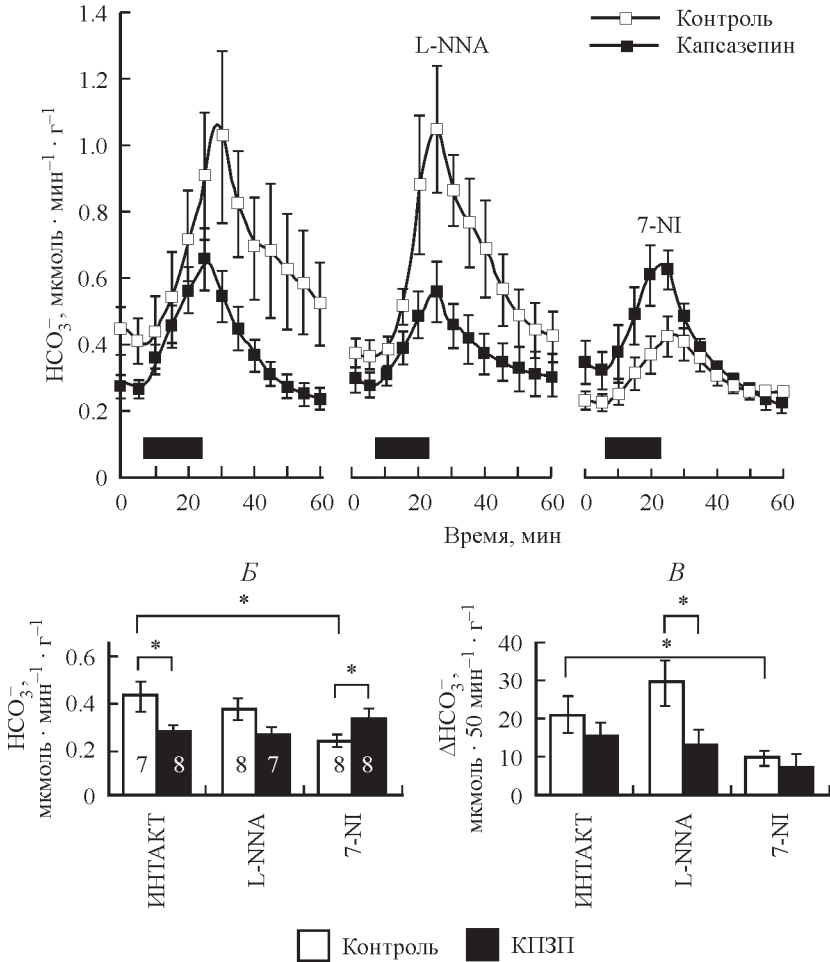


Рис. 2. Вызванная ирритацией СОЖ желудочная секреция бикарбонатов в присутствии блокаторов конститутивных NOS и блокатора TRPV1.

A — скорость секреции; B — базальная секреция; B — удельная продукция, стимулированная введением ирритантов. Ирритация СОЖ производилась гипертоническим подкисленным раствором (1 M NaCl, pH 2.0) в течение 20 мин (отмечена полосой на графике A). Блокаторы cNOS, L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг в.в.) инъецировали за 15 мин до ирритации. Ингибитор TRPV1 капсазепин (КПЗП) инфузирвали ретроградно в селезеночную артерию ($0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ch}^{-1}$, 20 мин), начиная введение за 5 мин до ирритации. Контрольным группам (КОНТР) вводился DMSO (0.1%, 0.3 мл, в.в). Статистические сравнения проведены с помощью 3- и 2-факторного дисперсионного анализа: (A) эффект КПЗП — $F_{(1,43)} = 4.39, p < 0.05$; эффект блокаторов NOS — $F_{(2,43)} = 6.34, p < 0.05$; эффект ирритации — $F_{(119,5117)} = 2.26, p < 0.01$; взаимодействие эффектов блокаторов NOS \times ирритации — $F_{(238,5117)} = 1.36, p < 0.01$; взаимодействие КПЗП \cdot ирритация — $F_{(119,5117)} = 2.26, p < 0.01$; взаимодействие КПЗП \cdot блокада NOS \cdot ирритация — $F_{(238,5117)} = 1.36, p < 0.01$; (B) взаимодействие эффекта КПЗП \cdot блокада NOS — $F_{(2,24)} = 4.26, p < 0.05$; эффект блокаторов NOS — $F_{(2,24)} = 5.34, p < 0.05$; взаимодействие КПЗП \cdot блокада NOS — $F_{(2,24)} = 3.45, p < 0.05$. Не упомянутые факторы и взаимодействия не имели статистической достоверности. Для множественных сравнений использован тест Фишера LSD: * $p < 0.05$. Величина выборки указана на гистограмме B.

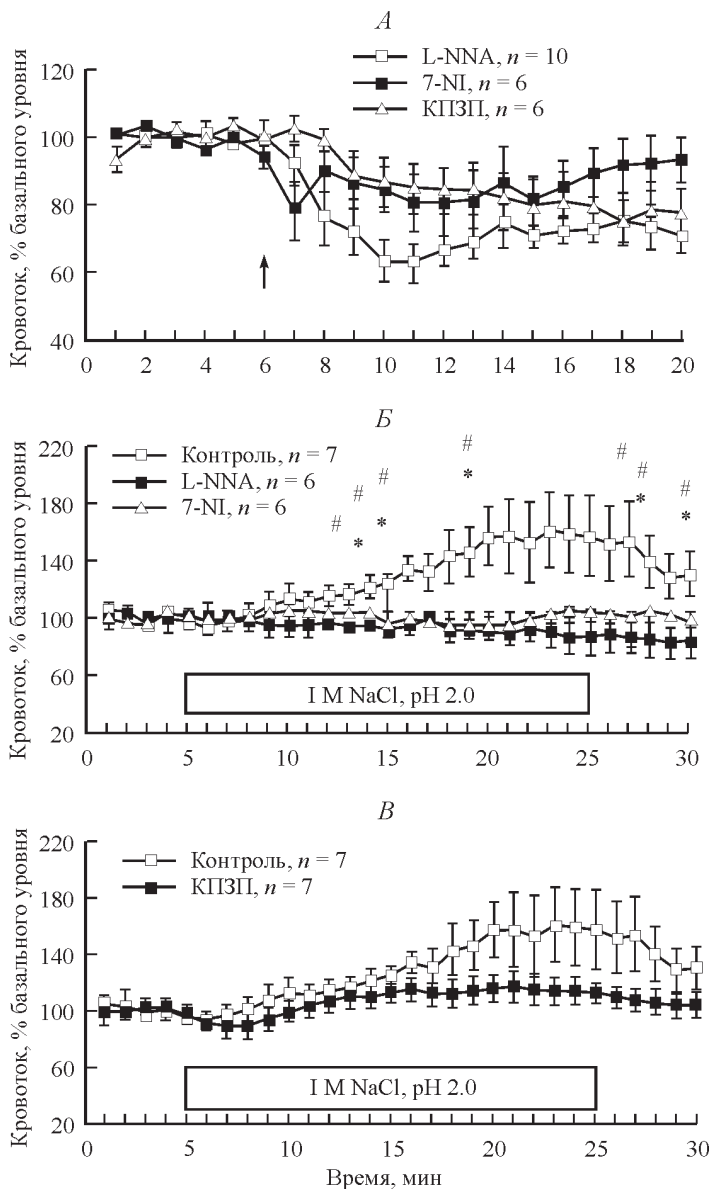


Рис. 3. Влияние блокады конститутивных NOS и TRPV1 на (А) базальный объемный кровоток в стенке тела желудка и (Б, В) усиление кровотока, вызванное ирритацией СОЖ.

Ирритация СОЖ гипертоническим подкисленным раствором (1 M NaCl, pH 2.0) в течение 20 мин (отмечено полосой на графиках Б и В). Блокаторы cNOS, L-NNA и 7-NI (оба 10 мг/кг в. в.) инъецировали за 15 мин до ирритации. Ингибитор TRPV1 капсазепин (КПЗП) инфузирвали ретроградно в селезеночную артерию ($0.6 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$, 20 мин), начиная за 5 мин до ирритации. Контрольным группам вводился DMSO (0.1 %, 0.3 мл, в. в.). Статистическое подтверждение достоверности реакции на примененные блокаторы (график А) получено с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Двухфакторный дисперсионный анализ (графики Б, В) применен для сравнений между реакциями: Б — эффект блокаторов NOS — $F_{(2,16)} = 4.58, p < 0.05$, взаимодействие эффектов ирритации и блокаторов NOS — $F_{(58,464)} = 2.52, p < 0.01$; В — эффект ирритации — $F_{(29,348)} = 5.07, p < 0.01$, взаимодействие эффектов ирритации и КПЗП — $F_{(29,348)} = 1.79, p < 0.01$. Другие эффекты не имели статистической достоверности. Для множественных сравнений использован тест Фишера LSD: сравнение контроля с эффектом L-NNA — * $p < 0.05$; сравнение с эффектом 7-NI — # $p < 0.05$.

течение 30—40 мин (рис. 1, А). Инфузия капсазепина, аппликация амилорида на СОЖ, а равно и деструкция капсаицин-чувствительных нейронов нейротоксическими дозами капсаицина сопровождались заметным ослаблением базальной секреции HCO_3^- ($F_{(3,15)} = 4.44, p < 0.05$; рис. 1, Б). С другой стороны, ни капсазепин, ни амилорид не влияли на вызванную ирритацией удельную продукцию HCO_3^- . Однако деструкция капсаицин-чувствительных нервных окончаний приводила к практически полному угнетению этой реакции ($F_{(3,15)} = 7.74, p < 0.05$; рис. 1, В).

Далее была исследована реакция на ингибиторы изоформ конститутивной NOS в зависимости от чувствительности TRPV1 рецепторов, которая угнеталась с помощью капсазепина. Базальная секреция HCO_3^- уменьшалась под действием 7-NI ($p < 0.05, n = 8$), но не менялась на фоне L-NNA. При инфузии капсазепина в спланхничный кровоток отмечено существенное снижение базальной секреции бикарбонатов у животных с интактной NOS ($p < 0.05, n = 7-8$), а также увеличение базальной секреции в присутствии 7-NI ($p < 0.05, n = 8$; рис. 2, А, Б). Удельная продукция HCO_3^- , вызванная ирритацией СОЖ, не менялась в присутствии L-NNA, но сокращалась примерно на 70 % после инъекции 7-NI ($p < 0.05, n = 8$; рис. 2, А, Б). Аппликация капсазепина не влияла на удельную продукцию HCO_3^- у животных с интактной NOS, а также оказалась неэффективной на фоне 7-NI. В то же время, когда реакция TRPV1 подавлялась капсазепином, L-NNA вызывал ослабление удельной продукция HCO_3^- более чем на 50 % ($p < 0.05, n = 7-8$; рис. 2, А, Б).

Объемный кровоток в передней стенке тела желудка (рис. 3, А) уменьшался при системном введении L-NNA ($F_{(19,171)} = 11.04, p < 0.01$) и оставался на низком уровне более 20 мин. Инъекцию L-NNA сопровождали кратковременное, в течение 10 мин, повышение артериального давления и ослабление сердечного ритма (на рисунке не показано). Введение 7-NI вызывало непродолжительное и относительно небольшое снижение базального кровотока ($F_{(19,95)} = 1.84, p < 0.05$), который уже через 10 мин возвращался к исходному уровню. Ретроградное введение капсазепина в селезеночную артерию также приводило к уменьшению базального кровотока ($F_{(19,95)} = 4.60, p < 0.01$), который оставался на низком уровне более 20 мин после начала инфузии блокатора (рис. 3, А). Влияние 7-NI и капсазепина на показатели системной гемодинамики было незначительным.

Ирритация СОЖ подкисленным гипертоническим раствором приводила к усилению кровотока в стенке желудка, достигавшему максимума к 15-й минуте инфузии ирританта ($F_{(29,174)} = 3.39, p < 0.01$). Предварительная инъекция как L-NNA, так и 7-NI полностью блокировала эту реакцию (рис. 3, Б). На фоне капсазепина внутрижелудочная аппликация ирританта вызывала сходное усиление кровотока ($F_{(19,95)} = 4.60, p < 0.01$). Капсазепин влиял на динамику ответа, что подтверждается ANOVA, показавшим достоверное взаимодействие этих факторов (см. подпись к рис. 3), но эффекта самого блокатора TRPV1 дисперсионный анализ не выявил (рис. 3, В).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты подтвердили, что капсаицин-чувствительные нервные окончания являются основным звеном в регуляции защитной продукции бикарбонатов в желудке, вызванной действием кислоты на слизистую оболочку [35]. Химическая деструкция капсаицин-чувствительных нейронов приводила к значительному сокращению базальной секреции бикарбонатов и

практически полному подавлению удельной продукции в ответ на увеличение полостной кислотности (рис. 1, А, Б). Впервые показано, что базальная секреция HCO_3^- была отчасти обусловлена реакцией основных молекулярных сенсоров H^+ , а именно TRPV1 и ASIC (рис. 1, Б). С другой стороны, ни TRPV1, ни ASIC не участвовали в регуляции желудочной секреции, вызванной аппликацией кислоты на СОЖ (рис. 1, В). Вероятно, секреция HCO_3^- в желудке при увеличении полостной кислотности опосредуется другими сенсорами H^+ , прямо или косвенно связанными с капсаицин-чувствительными нервами. При этом реакция TRPV1 и ASIC также 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 [20, 21], достаточным для стимуляции TRPV1 и ASIC, а также для того, чтобы вызвать ответ в нейронах спинальных ганглиев [23]. В естественных условиях сенситизация капсаицин-чувствительных афферентов зависит от многих медиаторов воспаления или повреждения ткани, таких как фактор роста нервов, простагландины, субстанция Р, брадикинин, серотонин, а также эндоканнабиноиды. 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 [8, 13, 28, 41]. Нагревание и снижение рН увеличивает вероятность пребывания канала в открытом состоянии [11, 38]. Сообщается, что чувствительность рецептора к протонам в отдельности невелика, и низкий внеклеточный рН (5—6) главным образом уменьшает температурный порог реакции [37]. Поэтому вполне возможно, что TRPV1 участвуют в регуляции стимулированной ирритантами секреции HCO_3^- , но их эффект маскируется более сильными воздействиями. Ряд других физиологических реакций на увеличение полостной кислотности опосредуется именно TRPV1, например увеличение продукции соматостатина в желудке и продукции бикарбонатов в двенадцатиперстной кишке [6, 18].

Гастропротективные реакции СОЖ, вызванные местной аппликацией капсаицина или кислоты, включая гиперемия подслизистого слоя и секрецию HCO_3^- , в значительной мере зависят от синтеза NO. Выделяющийся при деполаризации капсаицин-чувствительных нервных окончаний КГРП активирует eNOS в стенках артериол подслизистого слоя [17]. Дополнительно NO синтезируется в физиологической концентрации в самих капсаицин-чувствительных нервных окончаниях, в которой присутствует nNOS [31]. Сплетение капсаицин-чувствительных волокон окружает артериолы подслизистого слоя, а также наблюдается в пролиферативной зоне пришеечных слизистых клеток [19, 26]. Эти морфологические особенности позволяют предположить, что капсаицин-чувствительные нервные окончания действуют на транспорт бикарбонатов на поверхность СОЖ, регулируя как скорость подслизистого кровотока, так и активность белков-переносчиков HCO_3^- в эпителиальных клетках.

Анализ взаимодействия капсазепина с L-NNA и 7-NI показывает, что TRPV1 может влиять на секрецию HCO_3^- при закислении желудочного содержимого через eNOS. На фоне блокады TRPV1 отмечено изменение реакции на L-NNA, а именно, не оказывавший влияния в контроле L-NNA в этом случае вызывал почти 50%-ное уменьшение продукции HCO_3^- . В то же время у животных с интактной NOS эффект капсазепина не проявлялся. Кроме того, на фоне капсазепина не менялась реакция на 7-NI (рис. 2, А, Б). Сравнение эффектов L-NNA и 7-NI дает возможность оценить по отдельности влияние блокады eNOS либо nNOS. Известно, что L-NNA имеет примерно одинаковое сродство к nNOS и eNOS [9, 34], и, кроме того, 7-NI и L-NNA характеризуются

близкой фармакодинамикой и фармакокинетикой [10, 40]. Если принять, что эффекты eNOS и nNOS аддитивны, можно представить результат блокады eNOS как разность между реакциями на L-NNA и 7-NI. Расчеты такого рода показали, что избирательная блокада eNOS сопровождается значительным усилением секреции HCO_3^- , в то время как угнетение nNOS приводит к ослаблению секреции. Аппликация капсазепина устраняла влияние eNOS, но не изменяла эффекта nNOS (рис. 2, B). Учитывая, что eNOS экспрессируется в основном в эндотелии артериол [30], можно предположить, что при раздражении СОЖ кислотой связанное с TRPV1 угнетение продукции бикарбонатов является следствием увеличения кровотока в подслизистом слое.

Оценивая объемный кровоток в подслизистом слое, мы помещали датчик лазер-доплеровского флоуметра на серозной поверхности, сохраняя целостность органа. В большинстве исследований других авторов, применявших лазерную доплеровскую регистрацию кровотока в подслизистом слое, датчик располагали над эпителием вскрытого желудка. Адекватность нашего подхода можно обосновать тем, что суммарная толщина мышечного и подслизистого слоев в стенке желудка крысы меньше толщины СОЖ [29], при этом именно артериолы подслизистого слоя являются основными резистентными сосудами, контролирующими кровоток в стенке органа [14]. Наконец, амплитуда зарегистрированных нами изменений желудочного кровотока при полостной аппликации кислоты (рис. 3, B) соответствует значениям, зарегистрированным с мукозной поверхности [36].

Оценка объемного кровотока в стенке желудка показала, что eNOS влияет прежде всего на его базальную величину. При этом кровоток регулируется локальными эффектами eNOS, поскольку системные сдвиги гемодинамики, наблюдавшиеся при внутривенном введении L-NNA, были непродолжительными по сравнению с длительными изменениями кровотока в стенке органа. Влияние nNOS на базальный кровоток оказалось кратковременным и менее выраженным (рис. 3, A). Сосудистая реакция на полостное закисление обеспечивалась главным образом активностью nNOS, так как в равной мере угнеталась в присутствии L-NNA и 7-NI, что говорит о незначительной вовлеченности eNOS (рис. 3, B). Этот результат не стал неожиданным, так как ранее nNOS была обнаружена в периваскулярных нервных окончаниях, а также было описано само сосудорасширяющее действие этой изоформы фермента, индуцированное в том числе местной аппликацией капсаицина [12, 22, 31]. Исследуя динамику вовлечения nNOS и eNOS в локальную гиперемическую реакцию на капсаицин, M. Raimura и соавт. [13] предположили, что nNOS обеспечивает раннюю фазу реакции, в то время как eNOS длительное время поддерживает вазодилатацию после окончания действия стимула. Стоит отметить, что об описанном нами участии nNOS в гиперемической реакции, вызванной обратной диффузией H^+ в СОЖ, до настоящего времени не было известно.

Секреция бикарбонатов прямо связана со скоростью кровотока в желудке [24]. Ранее мы предположили, что в желудке в нормальном состоянии концентрация HCO_3^- в области базальной пластинки превышает концентрацию в плазме крови (явление «щелочного прилива»), а увеличение подслизистого кровотока способствует «вымыванию» избытка HCO_3^- и уменьшению транспорта этих ионов на поверхность эпителия. Подтверждение этому было получено в опытах, в которых потенциация желудочной секреции HCO_3^- , вызванная искусственным повышением уровня бикарбонатов в системном кровотоке, угнеталась при стимуляции eNOS [3]. Аналогичным образом возбуждение TRPV1 через активацию eNOS может привести к «вымыванию» HCO_3^- из

подслизистого слоя. В то же время вазодилатация и равно активность nNOS при раздражении СОЖ подкисленным гипертоническим раствором не зависели от TRPV1 (рис. 3, В).

В целом желудочная секреция бикарбонатов в ответ на уменьшение рН в полости органа в значительной мере зависит от локальной реакции капсаицин-чувствительных афферентных волокон и опосредуется nNOS. С активацией nNOS также связано увеличение кровотока в стенке желудка, сопровождающее действие кислоты на СОЖ. Влияние nNOS на продукцию HCO_3^- не зависит от активности ванилоидных рецепторов переменного потенциала 1-го типа. С другой стороны, взаимодействие TRPV1 с eNOS приводит к усилению базального кровотока в стенке желудка и ограничивает секрецию HCO_3^- .

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2014—2020 гг. (ГП-14, раздел 64).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] 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. И. М. Сеченова. 82(7): 111—116. 1996.
- [2] 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. 101(4): 415—432. 2015.
- [3] Золотарев В. А., Андреева Ю. В., Силин Л. В., Хропычева Р. П. Нитрегигическая регуляция транспорта бикарбонатов из подслизистого слоя желудка наркотизированных крыс. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 103(4): 432—445. 2017.
- [4] 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. 315(1): 423—432. 2005.
- [5] Akiba Y., Kaunitz J. D. Luminal chemosensing and upper gastrointestinal mucosal defenses. Am. J. Clin. Nutr. 90: 826S—831S. 2009.
- [6] 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. 131: 142—152. 2006.
- [7] Allen A., Flemstrom G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 288(1): C1—C19. 2005.
- [8] Almasi R., Szoke E., Bolcskei K., Varga A., Riedl Z., Sa'ndor Z., Szolcsa'nyi 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. 82: 644—651. 2008.
- [9] Babbedge R. C., Bland-Ward P. A., Hart S. L., Moore P. K. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitroindazole and related substituted indazoles. Br. J. Pharmacol. 110 (1): 225—228. 1993.
- [10] Bush M. A., Pollack G. M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 7-nitroindazole, a selective nitric oxide synthase inhibitor, in the rat hippocampus. Pharm. Res. 18(11): 1607—1612. 2001.
- [11] 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. 389: 816—824. 1997.
- [12] Chen R. Y., Guth P. H. Interaction of endogenous nitric oxide and CGRP in sensory neuron-induced gastric vasodilation. Am. J. Physiol. 268 (5, pt 1): G791—G796. 1995.
- [13] Cheng J. K., Ji R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. Neurochem. Res. 33(10): 1970—1978. 2008.

- [14] Guth P. H., Smith E. Neural control of gastric mucosal blood flow in the rat. *Gastroenterology*. 69(4): 935—940. 1975.
- [15] 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.* 139(4): 218—226. 2002.
- [16] Holzer P. Acid-sensitive ion channels and receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* 194: 283—332. 2009.
- [17] Holzer P. Efferent-like roles of afferent neurons in the gut: blood flow regulation and tissue protection. *Auton. Neurosci.* 125: 70—75. 2006.
- [18] Holzer P. Neural emergency system in the stomach. *Gastroenterology*. 114: 823—839. 1998.
- [19] 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.* 39: 303—312. 2004.
- [20] 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.* 264(1, pt 1): G57—G63. 1993.
- [21] Kiviluoto T., Voipio J., Kivilaakso E. Subepithelial tissue pH of rat gastric mucosa exposed to luminal acid, barrier breaking agents, and hemorrhagic shock. *Gastroenterology*. 94(3): 695—702. 1988.
- [22] Knowles R. G., Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298 (pt 2): 249—258. 1994.
- [23] Kress M., Waldmann R. Acid sensing ionic channels. *Curr. Top. Membranes.* 57: 241—276. 2006.
- [24] 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.* 42(4): 743—750. 1997.
- [25] 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*. 139: 699—709. 2006.
- [26] Nozawa Y., Nishihara K., Yamamoto A., Nakano M., Ajioka H., Matsuura N. Distribution and characterization of vanilloid receptors in the rat stomach. *Neurosci. Lett.* 309(1): 33—36. 2001.
- [27] Ohno T., Hattori Y., Komine R., Ae T., Mizuguchi S., Arai K., Saeki T., Suzuki T., Hosono K., Hayashi I., Oh-Hashi Y., Kurihara Y., Kurihara H., Amagase K., Okabe S., Saigenji K., Majima M. Roles of calcitonin gene related peptide in maintenance of gastric mucosal integrity and in enhancement of ulcer healing and angiogenesis. *Gastroenterology*. 134: 215—225. 2008.
- [28] 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.* 576: 809—822. 2006.
- [29] Olaibi O. K., Ijomone O. M., Ajibade A. J. Histomorphometric study of stomach and duodenum of aspirin treated Wistar rats. *J. Exp. Clin. Anat.* 13: 12—16. 2014.
- [30] 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.* 285: 157—163. 1996.
- [31] 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*. 92(1—2): 60—70. 2013.
- [32] Sasaki Y., Aihara E., Ohashi Y., Okuda S., Takasuka H., Takahashi K., Takeuchi K. Stimulation by sparkling water of gastroduodenal HCO₃⁻ secretion in rats. *Med. Sci. Monit.* 15(12): BR349—BR356. 2009.
- [33] 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*. 131: 1826—1834. 2006.
- [34] Southan G. J., Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem. Pharmacol.* 51(4): 383—394. 1996.
- [35] Takeuchi K., Aihara E. Mechanism of capsaicin-stimulated gastric HCO₃⁻ secretion — comparison with mucosal acidification. In: *Capsaicin — sensitive neural afferentation and the*

gastrointestinal tract: from bench to bedside. Eds by G. Mozsik, O. M. E. Abdel-Salam, K. Takeuchi. Published: July 16, 2014 under CC BY 3.0 license. DOI: 10.5772/5833.

[36] *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.* 8(5): BR157—BR163. 2002.

[37] *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.* 21: 531—543. 1998.

[38] *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.* 30(2): 207—217. 2005.

[39] *Ugawa S., Ueda T., Yamamura H., Shimada S.* In situ hybridization evidence for the coexistence of ASIC and TRPV1 within rat single sensory neurons. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 136(1—2): 125—133. 2005.

[40] *Víteček J., Lojek A., Valacchi G., Kubala L.* Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges. *Mediators Inflamm.* Article ID 318087. 1—22. 2012.

[41] *Xia R., Dekermendjian K., Lullau E., Dekker N.* TRPV1: a therapy target that attracts the pharmaceutical interests. *Adv. Exp. Med. Biol.* 704: 637—665. 2011.

Поступила 25 VI 2018
После доработки 8 VIII 2018