

ФИЗИОЛОГИЯ ВИСЦЕРАЛЬНЫХ СИСТЕМ

**УЧАСТИЕ NO-ЕРГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ В РЕАЛИЗАЦИИ
РЕСПИРАТОРНЫХ ЭФФЕКТОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО
ЦИТОКИНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1-БЕТА**

© В. Г. Александров, Н. П. Александрова, Т. С. Туманова,
А. Д. Евсева, В. А. Меркурьев

Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: n_aleks@yahoo.com

В острых экспериментах на наркотизированных крысах исследована роль NO-ергических механизмов в реализации респираторных эффектов провоспалительного цитокина IL-1 β . Для достижения этой цели было изучено влияние внутривенного введения IL-1 β на объемно-временные параметры дыхания и инспираторно-тормозящий рефлекс Геринга—Брейера на фоне действия N-нитро-L-аргинин метилэфира (L-NAME) — неспецифического блокатора NO-синтазы. Показано, что действие L-NAME устраняет усиливающее влияние IL-1 β на рефлекс Геринга—Брейера, при этом его действие на паттерн дыхания не изменяется: при повышении системного уровня IL-1 β по-прежнему наблюдается увеличение частоты дыхания, дыхательного объема и вентиляции легких. Предполагается, что одним из механизмов повышения силы инспираторно-тормозящего рефлекса при увеличении циркуляторного уровня IL-1 β является усиление глутаматергической передачи на рптр-нейронах, вызванное увеличением синтеза оксида азота клетками цереброваскулярного эндотелия. Сделан вывод, об участии NO-ергических механизмов в модуляции дыхательных рефлексов при развитии острой фазы системного воспаления.

Ключевые слова: дыхание, цитокины, рефлекс Геринга—Брейера, оксид азота, интерлейкин-1-бета.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 101. № 12. С. 000—, 2015

V. G. Aleksandrov, N. P. Aleksandrova, T. S. Tumanova, A. D. Evseeva, V. A. Merkuriev.
PARTICIPATION OF NO-ERGIC MECHANISMS IN REALIZATION OF RESPIRATORY
EFFECTS OF PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE INTERLEUKIN-1-BETA. Pavlov Institute
of Physiology, Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, Russia; e-mail:
n_aleks@yahoo.com.

The role of NO-ergic mechanisms in the realization of the respiratory effects of pro-inflammatory cytokine IL-1 β was investigated in acute experiments on anesthetized rats. To achieve this, we studied the effect of intravenous administration of IL-1 β during inhibition of NO-synthase by N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, a non-specific blocker of NO-synthase) on the parameters of breathing and the Hering-Breuer inspiratory-inhibitory reflex. It was shown that the effect of L-NAME eliminates the IL-1 β -dependent increase of the Hering—Breuer reflex, whereas effects on breathing pattern does not change: the increase in IL-1 β system-level evokes an increase in respiratory rate, tidal volume and lung ventilation. It is assumed that one of the mecha-

nisms of enhance in the strength inspiratory-inhibitory reflex by increasing circulatory IL-1 β level is the increased glutamate-ergic transmission on pump-neurons induced by increase in nitric oxide synthesis in cerebrovascular endothelial cells. In conclusion, NO-ergic mechanisms participate in the modulation of the vagal respiratory reflexes during the development of the acute phase of systemic inflammation.

Key words: breathing, cytokines, Hering-Breuer reflex, nitric oxide, interleukin-1-beta.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 101. N 12. P. 00—00. 2015

К настоящему времени нейрофизиологическими исследованиями обоснована возможность участия цитокинов, медиаторов иммунной системы, в центральной регуляции различных физиологических функций, в том числе и функции дыхания. Установлено, что цитокины играют важную роль в нейроиммунных взаимодействиях, участвуя в межклеточной коммуникации в качестве нейромодуляторов, оказывающих прямое или опосредованное действие на клетки центральной нервной системы [3]. Возможность участия цитокинов в центральном контроле дыхания подтверждается результатами иммуногистохимических исследований, которые показали наличие экспрессии цитокинов и их рецепторов в ядре солитарного тракта и в вентролатеральном отделе продолговатого мозга, т. е. в тех областях мозгового ствола, которые принимают непосредственное участие в управлении дыханием. Установлено, что экзогенное повышение системного уровня основного провоспалительного цитокина IL-1 β вызывает активацию нейронов в респираторно-зависимых районах ствола мозга [11]. В наших предыдущих исследованиях было показано, что повышение как церебрального, так и системного уровня IL-1 β увеличивает минутный объем дыхания, усиливает дыхательные рефлексы Геринга—Брейера, ослабляет вентиляторный ответ на гиперкапнию [1, 2, 5]. Все эти данные позволяют предполагать, что нарушения функции дыхания, которые наблюдаются при развитии системной воспалительной реакции, могут быть вызваны характерным для этого состояния резким повышением экспрессии провоспалительных цитокинов и их влиянием на центральные механизмы регуляции дыхания. Однако механизмы, которые активируются IL-1 β и опосредуют его биологические эффекты, являются комплексными и до конца не изученными.

В соответствии с нашими данными и данными других исследователей в реализации респираторных влияний IL-1 β в большой степени участвуют простаноид-зависимые механизмы [6, 13, 14, 19]. Активация циклооксигеназы и усиление синтеза простагландинов является, вероятно, одним из основных специфических механизмов, посредством которого IL-1 β может влиять на функцию респираторных нейронов и изменять функциональное состояние дыхательной системы. Однако известно, что влияние IL-1 β на физиологические функции может быть опосредовано множественными путями: через высвобождение как простаноидов, так и норэпинефрина, кортикотропин-рилизинг фактора, оксида азота [12, 13, 17, 22]. Это позволяет предполагать, что усиление синтеза оксида азота клетками cerebrovasкулярного эндотелия, которое происходит при повышении содержания IL-1 β в циркуляторном русле, может оказаться еще одним механизмом, в дополнение к циклооксигеназному механизму, опосредующим влияние воспаления на респираторную функцию. Небольшая липофильная молекула NO, свободно проникая через гематоэнцефалический барьер, может выполнять роль вторичного мессенджера и изменять состояние нервных клеток, в том числе и респираторных нейронов, участвующих в центральной регуляции дыхания.

Целью настоящей работы явилась проверка этого предположения и исследование возможного участия NO-ергических механизмов в реализации влия-

ния повышенного системного уровня $\text{IL-1}\beta$ на паттерн дыхания и объемно-зависимую обратную связь в системе дыхания. Для достижения этой цели было изучено влияние внутривенного введения $\text{IL-1}\beta$ на объемно-временные параметры дыхания и силу рефлекса Геринга—Брейера на фоне действия N-нитро-L-аргинин метилэфира (L-NAME) — неспецифического блокатора NO-синтазы, фермента, который катализирует трансформацию L-аргинина в L-цитруллин и NO. Как известно, L-NAME широко применяется в экспериментальной практике для снижения уровня эндогенного NO при исследовании NO-ергических механизмов, участвующих в регуляции функций различных физиологических систем. L-NAME предотвращает проникновение в клетки L-аргинина и ингибирует его взаимодействие с любыми изоформами NO-синтаз, что уменьшает синтез эндогенного оксида азота.

МЕТОДИКА

Эксперименты были проведены на 34 трахеостомированных, спонтанно дышащих крысах линии Вистар (самцы массой 250—300 г), наркотизированных внутрибрюшинным введением уретана из расчета 1250 мг/кг. Температура тела животного измерялась ректально и при помощи термоконтроллера ML295/R поддерживалась на уровне 36.9—37.1 °C.

Для регистрации объемно-временных параметров внешнего дыхания использовался метод пневмотахографии. Миниатюрная пневмометрическая трубка MLT-1L (ADInstruments, Австралия), обеспечивающая ламинарность проходящего сквозь нее воздушного потока и линейность измерений у мелких лабораторных животных, подсоединялась к трахеостомической канюле. Объемная скорость воздушного потока регистрировалась пневмотахометром ML141 (производство ADInstruments, Австралия). По пневмотахограмме определялась частота дыхательных движений (ЧДД), а для измерения дыхательного объема (ДО) производилось автоматическое интегрирование пневмотахографической кривой в спирографическую кривую. Минутный объем дыхания (МОД) рассчитывался как произведение ДО на ЧДД. Для регистрации электрической активности основной дыхательной мышцы — диафрагмы — производилась лапаротомия и стальные миографические электроды устанавливались на ее реберную часть справа. Электроды подключались к входу усилителя биопотенциалов. Артериальное давление измерялось прямым методом, посредством введения катетера в бедренную артерию. Катетер соединялся с полупроводниковым датчиком давления, который подключался к мостовому усилителю.

Сигналы от всех периферических устройств поступали на устройство сбора данных PowerLab 8 (ADInstruments, Австралия), работающего под управлением специализированного пакета программ LabChart 7, оцифровывались, записывались на твердом диске персонального компьютера, обрабатывались и выводились на экран.

Для оценки силы инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга—Брейера (ИТР) использовался метод конечно-экспираторной окклюзии [9, 21]. Дыхательные пути перекрывались в конце выдоха на уровне функциональной остаточной емкости легких, когда медленно адаптирующиеся рецепторы растяжения легких практически не активны. Чем сильнее выражен ИТР, тем в большей степени изменяются параметры так называемых постокклюзионных вдохов, т. е. дыхательных попыток на фоне окклюзии. Для количественной оценки силы ИТР длительность первого постокклюзионного вдоха, т. е. про-

должительность электромиограммы, зарегистрированной сразу после окклюзии, выражалась в процентах к длительности последнего предокклюзионного вдоха.

При проведении исследования было поставлено четыре серии экспериментов, в том числе контрольная, с введением физиологического раствора ($n = 6$), серии экспериментов с введением L-NAME ($n = 12$) и IL-1 β ($n = 11$), и наконец, серия экспериментов, в которых введению IL-1 β предшествовало введение L-NAME ($n = 5$). Объем вводимого раствора во всех случаях составлял 2 мл, L-NAME вводился в дозе 10 мг/кг, IL-1 β («Беталейкин»®), пр-во ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА, Санкт-Петербург) вводился в количестве 500 нг. Продолжительность введения вещества составляла 1 мин.

При проведении экспериментов введение физиологического раствора и L-NAME производилось на 30-й минуте после начала регистрации, IL-1 β вводился на 40-й минуте. Общее время регистрации составляло 100 мин. При обработке результатов производилось нормирование учитываемых параметров внешнего дыхания, а именно ЧДД, ДО, МОД, а также силы ИТР. Для этого величина каждого параметра, зарегистрированная в ходе эксперимента, выражалась в процентах к его величине на 30-й минуте (контрольные эксперименты и эксперименты с введением L-NAME) или на 40-й минуте (контрольные эксперименты, эксперименты с введением IL-1 β и эксперименты с введением IL-1 β после предшествующего введения L-NAME).

Для статистической обработки данных использовался пакет программ Excel. Рассчитывались относительные процентные величины, средние значения величин и ошибки среднего. Для оценки достоверности различий использовались непараметрические критерии: U-критерий Манна—Уитни и t -критерий Уилкоксона, а также однофакторный дисперсионный анализ. Различия считались статистически достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Контрольные эксперименты. На 30-й минуте контрольных экспериментов ЧДД составляла в среднем 88 ± 3 циклов/мин. После введения физиологического раствора этот показатель колебался в пределах от 88 до 94 циклов/мин, а в конце эксперимента (на 100-й минуте) равнялся 91 ± 6 циклов/мин. Статистический анализ абсолютных и нормированных величин ЧДД показал отсутствие достоверно значимых изменений этого показателя по ходу эксперимента (рис. 1, А). Перед введением физиологического раствора ДО равнялся в среднем 1.4 ± 0.4 мл и в дальнейшем постепенно увеличивался, достигая к концу эксперимента 1.6 ± 0.3 мл. Однако, несмотря на выраженную тенденцию к увеличению ДО, статистический анализ не подтвердил ее достоверность (рис. 1, Б). Эта же тенденция проявилась и при анализе изменений МОД. В контрольных экспериментах МОД на 30-й минуте равнялся в среднем 123 ± 30 мл/мин, затем постепенно увеличивался и на 100-й минуте равнялся 145 ± 31 мл/мин. Вместе с тем рост МОД также не был достоверным (рис. 1, В). Сила ИТР на 30-й минуте эксперимента составляла 160 ± 14 %, а в конце эксперимента 164 ± 5 %, различия между этими величинами статистически недостоверны. На 20-й минуте контрольных экспериментов показатель силы ИТР, нормированный относительно 30-й минуты, составлял 111 ± 9 %. В дальнейшем этот показатель колебался в пределах от 92 до 107 % (рис. 2) и статистически значимых изменений этого показателя обнаружено не было. Таким образом, было установлено, что в наших условиях

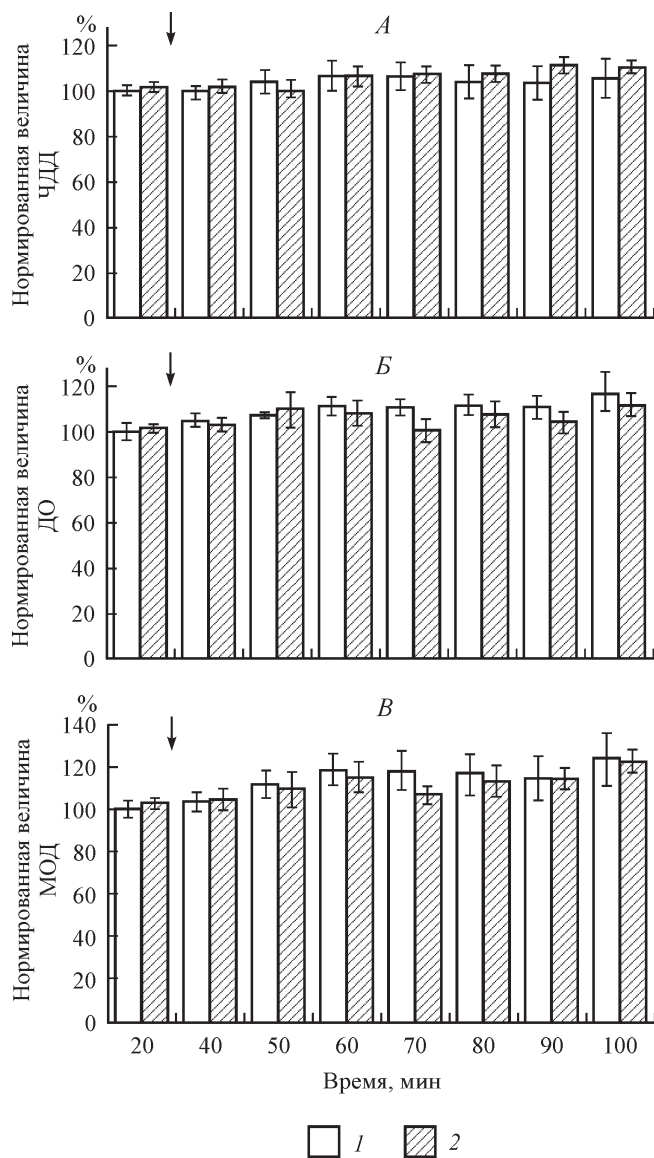


Рис. 1. Динамика объемно-временных параметров дыхания после введения физиологического раствора и L-NAME.

A — изменение частоты дыхательных движений, *Б* — изменение дыхательного объема, *В* — изменение вентиляции. По оси абсцисс — время от начала эксперимента, показатели нормированы относительно их величины на 30-й минуте регистрации непосредственно перед введением физиологического раствора. Стрелкой указан момент введения. 1 — физиологический раствор, 2 — L-NAME.

объемно-временные параметры дыхания и сила ИТР оставались стабильными в течение всего времени контрольного эксперимента, а введение физиологического раствора не оказывало на них какого-либо влияния.

Эксперименты с введением L-NAME. Средняя величина ЧДД на 30-й минуте эксперимента с введением L-NAME равнялась 106М)5 циклов/мин, что несколько выше, чем в контрольных экспериментах. Так же как и в контрольных

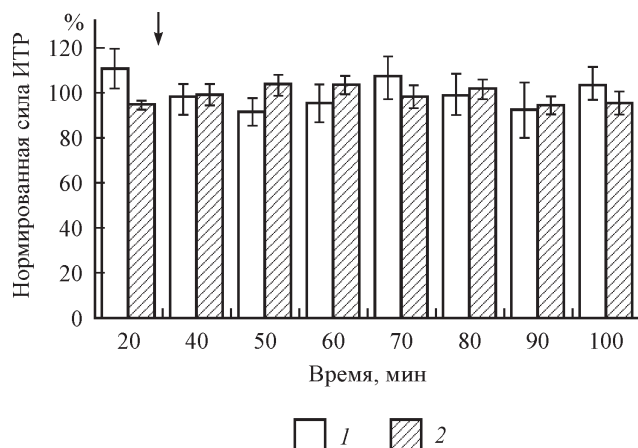


Рис. 2. Динамика силы инспираторно-тормозящего рефлекса после введения физиологического раствора и L-NAME.

Показатель силы ИТР нормирован относительно его величины на 30-й минуте регистрации. Стрелкой указан момент введения. 1 — физиологический раствор, 2 — L-NAME.

ных экспериментах, в экспериментах с введением L-NAME динамика этого показателя характеризовалась постепенным ростом (рис. 1, А). В результате к концу эксперимента на 100-й минуте ЧДД составляла уже 117 ± 6 циклов/мин, и эта величина достоверно отличалась от значений ЧДД до введения вещества. Нормированная величина ЧДД на 100-й минуте также достоверно отличалась от фонового значения этого показателя. Однако сопоставление нормированных величин этого показателя показало отсутствие достоверных отличий между результатами, полученными в контрольных экспериментах и в экспериментах с введением L-NAME. В экспериментах с введением L-NAME на 30-й минуте регистрации ДО составлял 1.3 ± 0.7 мл, что несколько меньше, чем в контрольной серии, но разница между этими величинами оказалась статистически недостоверной. Наблюдался постепенный рост ДО, и на 100-й минуте средняя величина нормированного ДО равнялась $112 \pm 5 \%$ (рис. 1, Б). Эта величина достоверно отличалась от величины рассматриваемого параметра до введения вещества ($101 \pm 2 \%$ на 20-й минуте). Сопоставление результатов контрольных экспериментов и экспериментов с введением L-NAME показало отсутствие между ними статистически значимых различий по нормированной величине ДО. Величина МОД перед введением L-NAME равнялась 132 ± 9 мл/мин и не имела достоверного отличия от величины, полученной в контрольных экспериментах. По ходу эксперимента МОД постепенно увеличивался, его нормированная величина к концу эксперимента достигала $122 \pm 5 \%$, что достоверно больше, чем величина МОД перед введением L-NAME. Вместе с тем расчеты показали, что нормированная величина МОД в контрольных экспериментах и в экспериментах с введением L-NAME практически совпадает (рис. 1, В). Таким образом, было установлено, что системное введение L-NAME не оказывает влияния на объемно-временные параметры дыхания, поскольку их значения после введения этого вещества не отличаются от контрольных величин; неизменной остается и тенденция к росту МОД. В экспериментах с введением L-NAME средняя величина нормированной длительности первого окклюзионного вдоха на 20-й минуте составляла $94 \pm 2 \%$, а после введения L-NAME колебалась в

пределах от 95 до 105 %. Достоверных отличий нормированных значений силы ИТР от соответствующих контрольных величин обнаружено не было (рис. 2). Эти данные свидетельствуют, что L-NAME при его внутривенном введении не влияет на силу ИТР.

Вместе с тем регистрация системного артериального давления, которая производилась в экспериментах с введением L-NAME, показала, что до введения L-NAME, на 30-й минуте эксперимента, АДср равнялось 71 ± 4 мм рт. ст., средняя величина ЧСС составляла 310 ± 16 уд/мин. Введение L-NAME вызывало резкое повышение АДср, которое достигало максимума в течение 2—3 мин и стабилизировалось на достигнутом уровне. Расчеты показали, что в течение первых 10 мин после введения L-NAME величина АДср практически удваивается, достигая в среднем 202 ± 9 % от исходной. В дальнейшем АДср постепенно снижалось, составляя к концу эксперимента (на 100-й минуте) 172 ± 12 %. Эта величина достоверно выше величины, полученной в контрольных экспериментах, а также величины АДср до введения L-NAME. Перед введением вещества ЧСС составляла в среднем 310 ± 16 уд/мин, достоверных изменений ЧСС после введения не наблюдалось вплоть до 100-й минуты регистрации. Полученные результаты свидетельствуют, что в ответ на введение L-NAME происходит резкое увеличение АДср, которое не сопровождается достоверными изменениями ЧСС.

Эксперименты с введением IL-1 β . Фоновые значения объемно-временных параметров дыхания и силы ИТР в экспериментах с введением IL-1 β не имели достоверных отличий от их фоновых значений в контрольных экспериментах и экспериментах с введением L-NAME. Изменения ЧДД начинались через 20 мин после введения IL-1 β . Достоверное увеличение нормированной величины ЧДД наблюдалось через 30 мин после введения (т. е. на 70-й минуте эксперимента) и составляло 110 ± 2 % (рис. 3, А). Эта величина достоверно отличалась от величины ЧДД до введения, однако не имела достоверных отличий от ЧДД, зарегистрированной в контрольных экспериментах. В дальнейшем ЧДД удерживалась на достигнутом уровне, причем отличия от контрольных величин оказались статистически достоверны. Через 20 мин после введения IL-1 β начиналось увеличение ДО и через 40 мин после введения (т. е. на 80-й минуте эксперимента) нормированная величина ДО достигала уже 123 ± 7 %, что достоверно больше фоновых и контрольных величин (рис. 3, Б). В дальнейшем ДО удерживался на достигнутом уровне, а затем (на 100-й минуте эксперимента) снижался до контрольных значений. В результате динамика МОД после введения IL-1 β напоминала динамику изменений ДО. Некоторый рост этого показателя происходил уже на 60-й минуте эксперимента, т. е. через 20 мин после введения IL-1 β (рис. 3, В). На 80-й минуте эксперимента нормированная величина МОД составляла 138 ± 11 %, на 90-й — 135 ± 6 %, и эти величины достоверно отличались от контрольных и фоновых величин. Затем вентиляция снижалась, достигая исходных значений. Таким образом, эксперименты показали, что IL-1 β при его внутривенном введении вызывает закономерное изменение объемно-временных параметров дыхания, которое приводит к увеличению легочной вентиляции.

Тестирование силы ИТР показало, что внутривенное введение IL-1 β приводит к увеличению нормированной длительности первого постокклюзионного вдоха (рис. 4). Через 30 мин после введения нормированная величина этого показателя достигает максимального значения — 140 ± 5.9 %, причем эта величина достоверно выше фоновых и контрольных значений. В дальнейшем сила ИТР несколько снижалась, но статистически недостоверно. В то же время отличия от контрольных и фоновых величин оставались статистически

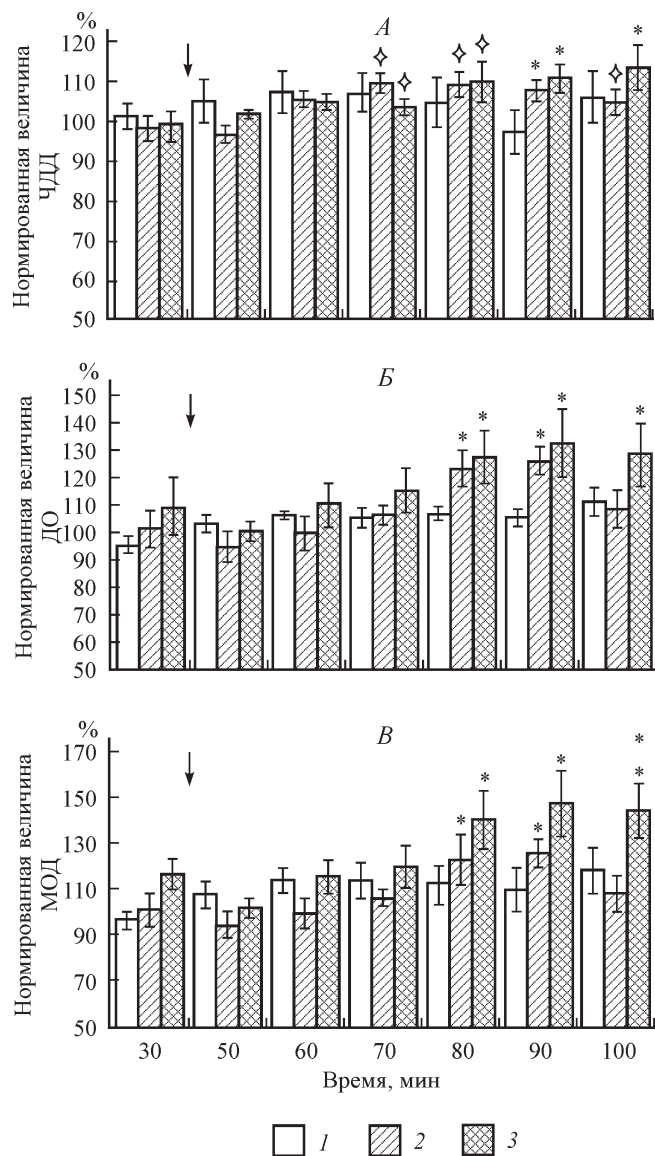


Рис. 3. Влияние L-NAME на изменения объемно-временных параметров дыхания, вызванные IL-1 β .

A — изменение частоты дыхательных движений, *Б* — изменение дыхательного объема, *В* — изменение вентиляции. По оси абсцисс — время от начала эксперимента, показатели нормированы относительно их величины на 40-й минуте регистрации, непосредственно перед введением IL-1 β . Стрелкой указан момент введения. 1 — физиологический раствор, 2 — IL-1 β , 3 — IL-1 β на фоне действия L-NAME. \diamond Величины, достоверно отличающиеся от фоновых значений; * Величины, достоверно отличающиеся и от фоновых, и от контрольных значений

достоверны. Эти данные свидетельствуют об усилении ИТР под действием IL-1 β .

Эксперименты с введением IL-1 β после предшествующего введения L-NAME. В последней серии экспериментов были исследованы эффекты повышения системного уровня IL-1 β после введения L-NAME. Поскольку во

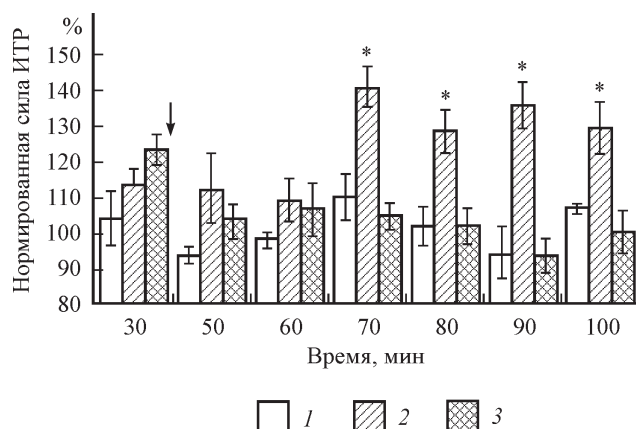


Рис. 4. Влияние L-NAME на изменения силы ИТР, вызванные IL-1β.

Показатель силы ИТР нормирован относительно его величины на 40-й минуте регистрации. Стрелкой указан момент введения. 1 — физиологический раствор, 2 — IL-1β, 3 — IL-1β на фоне действия L-NAME. * Величины, достоверно отличающиеся от фоновых и контрольных значений, а также величин, полученных в экспериментах с введением IL-1β на фоне действия L-NAME.

второй серии экспериментов, описанной выше, было установлено, что эффекты на АД проявляются через 10 мин после введения L-NAME, в заключительной серии экспериментов введение IL-1β производилось также через 10 мин после введения L-NAME. Было установлено, что ЧДД на 30-й минуте эксперимента (перед введением L-NAME) составляла 136 ± 2 циклов/мин, а на 40-й минуте (перед введением IL-1β) — 138 ± 8 циклов/мин; ДО соответственно 1.5 ± 0.1 и 1.3 ± 0.1 мл, МОД — 198 ± 13 и 170 ± 12 мл/мин. Расчеты показали, что и в этой серии экспериментов значения ЧДД, ДО и МОД до и после введения L-NAME не имели статистически достоверных отличий, что было предсказуемым результатом. В заключительной серии экспериментов, так же как и в предыдущей, изменения ЧДД начинались на 20-й минуте после введения IL-1β. На 40-й минуте ЧДД достигала значений, которые были достоверно выше, чем фоновые, но не отличались от величин, полученных в контрольных экспериментах и экспериментах с введением только IL-1β (рис. 3, А). На 50-й минуте ЧДД была достоверно выше фоновых и контрольных значений, но не отличалась от значений, полученных в предыдущей серии экспериментов (рис. 3, Б). Достоверное увеличение нормированной величины ДО по сравнению с контрольным значением происходило на 40-й минуте. На 50-й минуте ДО был больше как по сравнению с его фоновой величиной, так и по сравнению с его контрольным значением. Изменения вентиляции под влиянием IL-1β на фоне действия L-NAME практически совпадали с теми, которые наблюдались при введении только IL-1β (рис. 3, В). Так, на 80-й минуте эксперимента нормированная величина МОД равнялась 141 ± 13 %, а на 90-й — 145 ± 15 %. На 100-й минуте МОД был несколько выше, чем в предыдущей экспериментальной серии. В целом полученные результаты позволяют сделать вывод, что L-NAME не устраняет влияния IL-1β на объемно-временные параметры дыхания.

В результате исследования силы ИТР было установлено, что на 30-й минуте эксперимента, т. е. непосредственно перед введением L-NAME, нормированная величина показателя силы ИТР не отличалась от соответствующих величин, полученных в контрольных экспериментах и экспериментах с введе-

нием IL-1 β без введения L-NAME (рис. 4). Введение IL-1 β не приводило к усилению ИТР, и хотя через 10 мин после введения его сила была больше контрольных значений, но достоверные отличия от фоновой величины отсутствовали. В течение первых 20 мин после введения не наблюдалось достоверных отличий между силой ИТР, зарегистрированной на фоне действия L-NAME, и тем же показателем, зарегистрированным в предыдущей серии экспериментов. В дальнейшем начиная с 70-й минуты эксперимента картина резко менялась, поскольку не наблюдалось резкого усиления ИТР, которое является обычным эффектом IL-1 β . Начиная с 70-й минуты и до конца эксперимента сила ИТР не отличалась от контрольных значений и была достоверно меньше, чем в экспериментах с введением только IL-1 β . Таким образом, было установлено, что L-NAME устраняет потенцирующий эффект IL-1 β на ИТР.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования подтверждают данные полученные нами в предыдущих работах [1, 2, 5], и доказывают участие основного провоспалительного цитокина IL-1 β в центральных механизмах регуляции дыхания, участвующих в формировании паттерна дыхания и реализации дыхательных рефлексов. IL-1 β вызывает увеличение частоты дыхания, дыхательного объема и как следствие минутной вентиляции легких, а также усиливает инспираторно-тормозящий рефлекс Геринга—Брейера, реализация которого при увеличении объема легких и активации медленно адаптирующихся рецепторов дыхательных путей вызывает торможение вдоха и досрочную смену дыхательных фаз, регулируя тем самым частоту и глубину дыхания. Основной целью данной работы явилось изучение механизма, посредством которого повышение системного уровня IL-1 β может оказывать влияние на центральные механизмы регуляции дыхания, учитывая, что IL-1 β является крупной полипептидной молекулой, не проникающей через гематоэнцефалический барьер. Как известно, гематоэнцефалический барьер состоит из нефенестрированных эндотелиальных клеток, связанных соединительными комплексами, формирующими непрерывный клеточный слой, обладающий свойствами плазматической мембраны. Цитокины представляют собой достаточно крупные гидрофильные полипептиды, которые не могут преодолевать гематоэнцефалический барьер с помощью механизма диффузии. Предполагается, что возможным механизмом, посредством которого периферические цитокины могут влиять на функцию мозга, является индукция посредников, которые экспрессируются при взаимодействии цитокинов с соответствующими рецепторами сосудистого эндотелия [12, 13]. В данной статье исследовано возможное участие оксида азота в этих процессах.

Известно, что эндотелиальные клетки кровеносных сосудов имеют большое количество рецепторов IL-1, при этом взаимодействие IL-1 β с данным рецептором активирует экспрессию эндотелиоцитами индуцибельной NO-синтазы и как следствие усиливает синтез оксида азота [23]. Эндотелий кровеносных сосудов является одним из основных источников NO в центральной нервной системе. Действуя как межклеточный посредник, NO быстро проходит через гематоэнцефалический барьер и достигает клеток-мишеней. При этом благодаря высокой проникающей способности NO влияет на внутриклеточные процессы, не взаимодействуя с мембранными рецепторами, поскольку он способен легко диффундировать через клеточную мембрану [4, 8]. Исходя из этих данных мы предположили, что и в нашем исследовании

респираторные эффекты IL-1 β зарегистрированные при экзогенном увеличении уровня IL-1 β в циркуляторном русле, были вызваны усилением синтеза оксида азота клетками эндотелия. В этом случае внутривенное введение L-NAME, блокатора NO-синтазной активности, должно было бы снизить или полностью исключить респираторные эффекты IL-1 β .

Как известно, формирование паттерна дыхания является сложным процессом, который определяется прежде всего внутрицентральными взаимодействиями между нейронами бульбарного дыхательного центра. Кроме того, в регуляции паттерна дыхания участвует также вагальная объемно-зависимая обратная связь, определяющая зависимость продолжительности дыхательных фаз от объема легких и реализующаяся посредством рефлексов Геринга—Брейера. У взрослых рефлекс Геринга—Брейера не проявляется при спокойном дыхании, однако он играет важную роль в предохранении легких от перерастяжения при высоких легочных объемах. Кроме того, объемно-зависимая обратная связь играет жизненно важную роль у младенцев в возрасте до 1 года с пока еще слабой грудной стенкой, так как определяет оптимальный паттерн дыхания, предотвращающий альвеолярный коллапс [18].

В наших экспериментах введение L-NAME ингибировало влияние IL-1 β только на рефлекс Геринга—Брейера, тогда как его действие на паттерн дыхания не изменялось: при повышении системного уровня IL-1 β по-прежнему наблюдалось увеличение частоты дыхания, дыхательного объема и вентиляции легких. Это свидетельствует, что влияния провоспалительных цитокинов на внутрицентральные механизмы регуляции паттерна дыхания, которые определяются работой ритм-генерирующих нейронов и афферентными влияниями от центральных и периферических хеморецепторов, не идентичны влияниям на вагальные механизмы регуляции, реализующиеся посредством объемно-зависимой обратной связи. По всей вероятности модуляция паттерна дыхания при увеличении содержания IL-1 β в кровеносном русле осуществляется за счет активации циклооксигеназных путей, тогда как в модуляции силы рефлекса Геринга—Брейера кроме циклооксигеназных участвуют и NOергические механизмы.

При изучении взаимодействия цитокинов с медиаторными системами было установлено, что провоспалительные цитокины IL-1 β и TNF- α (фактор некроза опухоли) способны модулировать активность возбуждающих глутаматергических механизмов в центральной нервной системе [10, 20]. Роль NO как нейромедиатора, вторичного мессенджера и регулятора нервной деятельности также во многом связана с функциональным состоянием N-метил-D-аспарататных (NMDA) рецепторов, опосредующих действие возбуждающей аминокислоты L-глутамата. Предполагается, что образование NO является одним из внутриклеточных звеньев передачи глутаматергического сигнала. С другой стороны, установлено, что афферентные волокна медленно адаптирующихся рецепторов дыхательных путей образуют глутаматергические синапсы на нейронах, входящих в состав дуги рефлексов Геринга—Брейера [15, 16]. Соотнесение этих данных с результатами нашего исследования позволяет предполагать, что одним из механизмов усиления инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга—Брейера при увеличении циркуляторного уровня IL-1 β является усиление глутаматергической передачи, вызванное увеличением синтеза оксида азота клетками цереброваскулярного эндотелия. Как известно, первичными афферентными нейронами в рефлекторной дуге рефлекса Геринга—Брейера являются сенсорные нейроны, образующие медленно адаптирующиеся рецепторы дыхательных путей. Афферентные волокна проходят в составе блуждающего нерва и достигают ядра одиночного тракта.

Здесь они образуют возбуждающие глутаматергические синапсы на нейронах второго порядка, к которым относятся бета-инспираторные нейроны ($I\beta$ -нейроны) и *rimpr*-нейроны [7, 15]. Полученные нами данные позволяют предполагать, что в процесс модуляции силы инспираторно-тормозящего рефлекса, вызванный усилением синтеза оксида азота провоспалительными цитокинами, включены, скорее всего, *rimpr*-клетки, которые в отличие от $I\beta$ -нейронов не активируются центральным инспираторным драйвом. Участие в этом процессе $I\beta$ -нейронов менее вероятно, так как они участвуют не только в реализации рефлекса Геринга—Брейера, но и в процессах внутрицентральных механизмов регуляции паттерна дыхания, модуляция которых не наблюдалась при действии L-NAME.

Важно также отметить, что NOергические механизмы включаются в модуляцию дыхательных рефлексов только при повышенном системном уровне IL-1 β , т. е. в условиях, характерных для развития острой фазы системного воспаления. В обычных условиях внутривенное введение L-NAME не вызывает достоверных изменений в объемно-временных параметрах дыхания и силе инспираторно-тормозящего рефлекса. В то же время гипертензивный эффект L-NAME, связанный с нарушением работы NOергических нервных окончаний, участвующих в иннервации гладкомышечной ткани стенок кровеносных сосудов и обеспечивающий их релаксацию, хорошо выражен. Это доказывает эффективность действия препарата, несмотря на отсутствие респираторных реакций. Таким образом, результаты проведенного исследования указывают на участие NOергических механизмов в реализации влияний провоспалительных цитокинов на рефлекторный контроль дыхания.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00119).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

- [1] *Александрова Н. П.* Цитокины и резистивное дыхание. Физиология человека. 38 (2) : 119—129. 2012.
- [2] *Александрова Н. П., Меркурьев В. А., Александров В. Г.* Влияние интерлейкина-1 на паттерн дыхания и инспираторно-тормозящий рефлекс Геринга—Брейера. Вестн. Тверского гос. ун-та. Серия: Биология и экология. 2 : 9—17. 2013.
- [3] *Мюльберг А. А., Гришина Е. В.* Цитокины как медиаторы нейроиммунных взаимодействий. Успехи физиол. наук. 37 (1) : 18—22. 2006.
- [4] *Ситдикова Г. Ф., Яковлев А. В., Зефирова А. Л.* Газомедиаторы: от токсических эффектов к регуляции клеточных функций и использованию в клинике. Бюл. сибирской мед. 13 (6) : 185—200. 2014.
- [5] *Aleksandrova N. P., Danilova G. A.* Effect of intracerebroventricular injection of interleukin-1-beta on the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia. Eur. J. Med. Res. 15 (II) : 3—6. 2010.
- [6] *Aleksandrova N. P., Danilova G. A., Aleksandrov V. G.* Cyclooxygenase pathway in modulation of the ventilatory response to hypercapnia by interleukin-1 β in rats. Respir. Physiol. Neurobiol. 209 : 85—90. 2015.
- [7] *Bonham A. C., Coles S. K., McCrimmon D. R.* Pulmonary stretch receptor afferents activate excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarius in rats. J. Physiol. 464 (5) : 725—745. 1993.
- [8] *Brennan J. E., Bredt D. S.* Nitric oxide signaling in the nervous system. Methods Enzymology. 269 : 119—129. 1996.
- [9] *Brown K., Stocks J., Aun C., Rabbette P. S.* The Hering—Breuer reflex in anesthetized infants: end-inspiratory vs. end-expiratory occlusion technique. J. Appl. Physiol. 84 (4) : 1437—1446. 1998.

- [10] *Chao C. C., Hu S., Ehrlich L., Peterson P. K.* Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Behav. Immunol.* 9 : 355—365. 1995.
- [11] *Churchill L., Taishi P., Wang M., Brandt J., Cearley C., Rehman A., Krueger J. H.* Brain distribution of cytokine mRNA induced by systemic administration of interleukin-1 beta or tumor necrosis factor alpha. *Brain Res.* 1120 (1) : 64—69. 2006.
- [12] *Graff G. R., Gozal D.* Cardiorespiratory responses to interleukin-1 beta in adult rats: role of nitric oxide, eicosanoids and glucocorticoids. *Arch. Physiol. Biochem.* 107 : 97—112. 1999.
- [13] *Herlenius E.* An inflammatory pathway to apnea and autonomic dysregulation. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 178 : 449—457. 2011.
- [14] *Hofstetter A. O., Saha S., Siljehav V., Jakobsson P. J., Herlemus S.* The induced prostaglandin E2 pathway is a key regulator of the respiratory response to infection and hypoxia in neonates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104 (23) : 9894—9899. 2007.
- [15] *Kubin L., Alheid G. F., Zuperku E. J., McCrimmon D. R.* Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. *J. Appl. Physiol.* 101 (2) : 618—627. 2006.
- [16] *Miyazaki M., Tanaka I., Ezure K.* Excitatory and inhibitory synaptic inputs shape the discharge pattern of pump neurons of the nucleus tractus solitarii in the rat. *Exp. Brain Res.* 129 (2) : 191—200. 1999.
- [17] *Nakamori T., Morimoto A., Murakami N.* Effect of a central CRF antagonist on cardiovascular and thermoregulatory responses induced by stress or IL-1 β . *Am. J. Physiol.* 265 (4) : R834—R839. 1993.
- [18] *Rabbette P. S., Stocks J.* Influence of volume dependency and timing of airway occlusions on the Hering-Breuer reflex in infants. *J. Appl. Physiol.* 85 (6) : 2033—2039. 1998.
- [19] *Olsson A., Kayhan G., Lagercrantz H., Herlenius E.* IL-1 beta depresses respiration and anoxic survival via a prostaglandin-dependent pathway in neonatal rats. *Pediatr. Res.* 54 : 326—331. 2003.
- [20] *Rothwell N. J., Hopkins S. J.* Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* (18) : 130—136. 1995.
- [21] *Seifert E., Trippenbach T.* Effects of baclofen on the Hering-Breuer inspiratory-inhibitory and deflation reflexes in rats. *Am. J. Physiol.* 274 (43) : R462—R468. 1998.
- [22] *Watanabe T., Tan N., Saiki Y., Makisumi T., Nakamura S.* Possible involvement of glucocorticoids in the modulation of interleukin-1-induced cardiovascular responses in rats. *J. Physiol.* 491 (1) : 231—239. 1996.
- [23] *Wong M. L., Bongiorno P. B., Gold P. W., Licinio J.* Localization of interleukin-1 beta converting enzyme mRNA in rat vasculature: evidence that the genes encoding the interleukin-1 system are constitutively expressed in brain blood vessels. Pathophysiological implications. *Neuroimmunomodulation.* 2 (3) : 141—148. 1995.

Поступила 6 VIII 2015
После доработки 12 X 2015