

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 612.217+612.285.1

ИЗМЕНЕНИЕ ВЕНТИЛЯТОРНОГО ОТВЕТА НА ГИПОКСИЮ ПРИ ПОВЫШЕНИИ УРОВНЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1В В КРОВИ И ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ*

Г.А. Данилова, Н.П. Александрова

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

В экспериментах на наркотизированных, трахеостомированных крысах исследовано влияние основного провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) на вентиляторный ответ на гипоксию. Установлено, что повышение содержания ИЛ-1 β как в крови, так и в цереброспинальной жидкости вызывает снижение вентиляторной чувствительности к гипоксическим изменениям в газовом составе крови: в ответ на гипоксическую стимуляцию наблюдается снижение прироста минутного объема дыхания, дыхательного объема и средней скорости инспираторного потока, отражающей уровень центральной инспираторной активности. Установлено, что внутривенное введение ИЛ-1 β в меньшей степени ослабляет вентиляторную реакцию на гипоксию, чем его интравентрикулярное введение. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что экзогенное повышение уровня провоспалительных цитокинов как в крови, так и в цереброспинальной жидкости моделирует хеморецепторные рефлекссы.

Ключевые слова: центральная, периферическая хеморецепция, цитокины, внешнее дыхание, гипоксия.

Введение. В настоящее время активно исследуется вопрос об участии провоспалительных цитокинов, медиаторов иммунной системы, в развитии утомления дыхательных мышц и ухудшения их сократительной способности, которое наблюдается при резистивном дыхании [5, 8, 9]. Подъем уровня цитокинов в плазме крови при дыхании с сопротивлением вызван, как предполагается, развитием оксидативного стресса вследствие усиленных сокращений дыхательных мышц и гипоксических изменений в газовом составе крови [2]. При этом остается практически неисследованным возможное влияние провоспалительных цитокинов на хеморецепторные механизмы регуляции дыхания, участвующие в формировании паттерна дыхания и компенсаторных реакций дыхательной системы.

В нашем предыдущем исследовании было показано, что экзогенное повышение церебрального уровня интерлейкина-1 β , одного из основных провоспалительных цитокинов, снижает вентиляторную чувствительность к гиперкапнии [1]. Ослабление вентиляторного ответа на гиперкапнию было обнаружено и при усилении эндогенной продукции ФНО- α (фактора некроза опухолей), который также является провоспалительным цитокином, близким по своим свойствам к ИЛ-1 β [10]. Вместе с тем практически отсутствуют данные о возможном влиянии провоспалительных цитокинов на вентиляторную чувствительность к гипоксии. Как известно, в реакции на гипоксию основная роль принадлежит периферическим хеморецепторам, расположенным в кровеносном русле. К настоящему

* Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №09-04-01662).

времени установлено, что провоспалительные цитокины (такие как ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-6) и их рецепторы локально экспрессируются в каротидных телах крыс. Показано резкое усиление экспрессии данных цитокинов и их рецепторов в хемочувствительных гломусных клетках каротидных тел при хронической гипоксии. Установлено, что провоспалительные цитокины усиливают ответ гломусных клеток на острую гипоксию [3].

Эти данные позволяют предположить участие провоспалительных цитокинов в функционировании периферических хеморецепторов, обеспечивающих регуляцию кардиореспираторной функции в гипоксических условиях.

Однако в формировании рефлекторного ответа на гипоксию кроме периферического компонента, который определяется состоянием периферических (каротидных) хеморецепторов, реагирующих на повышение системного уровня цитокинов, участвует и центральный компонент. Поэтому для получения полной информации о механизмах изменения вентиляторных ответов на хеморецепторную стимуляцию необходимо знать, как изменяется центральная инспираторная активность и объемно-временные параметры дыхания при повышении не только системного, но и церебрального уровня цитокинов.

Цель исследования. Изучение влияния провоспалительных цитокинов на хеморецепторный аппарат регуляции внешнего дыхания. Для этого производился анализ вентиляторных ответов на гипоксию до и после повышения уровня интерлейкина-1 β в крови и цереброспинальной жидкости.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на 16 трахеостомированных спонтанно дышащих крысах линии Wistar (самцы весом 250–300 г), наркотизированных внутрибрюшинным введением уретана из расчета 1200 мг/кг. Все эксперименты на животных были проведены с соблюдением этических норм и правил работы на анестезированных животных.

При проведении экспериментов производилась пневмотахографическая регистрация объемно-временных параметров внешнего дыхания. При помощи миниатюрной пневмо-

метрической трубки MLT-1L (ADInstruments), обеспечивающей ламинарность воздушного потока, регистрировалась объемная скорость воздушного потока (пневмотахограмма).

По пневмотахограмме измерялась максимальная скорость воздушного инспираторного и экспираторного потока, длительность вдоха и выдоха, рассчитывалась частота дыхания. Для определения дыхательного объема производилось интегрирование пневмотахографической кривой. Минутный объем дыхания рассчитывался как произведение величины дыхательного объема на количество дыхательных движений за одну минуту. Средняя скорость инспираторного потока – косвенный показатель центральной инспираторной активности – рассчитывалась как частное от деления величины дыхательного объема на продолжительность вдоха.

Производилось экзогенное повышение уровня цитокинов в крови и цереброспинальной жидкости, которое позволяло смоделировать эндогенное увеличение цитокинов, индуцированное резистивным дыханием. В одном случае вещество вводилось в кровь внутривенно, в другом – в ЦСЖ в обход гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), для того чтобы выяснить, влияет ли наличие барьерных структур на респираторные эффекты интерлейкина. Известно, что полипептиды, которыми являются и цитокины, не проходят через ГЭБ, т.к. это крупные молекулы, поэтому эффекты при системном и центральном введении ИЛ в принципе могут быть разными.

Микроинъекции интерлейкина-1 β производились в правый боковой желудочек головного мозга при помощи шприца Гамильтона. Координаты для введения канюли определялись по стереотаксическому атласу мозга крысы и составляли 0,8 мм каудальнее уровня bregma, 1,5 мм латерально от средней линии и 3,5–4,0 мм от поверхности черепа [7]. С помощью бормашины рассверливалось трепанационное отверстие, в которое вводилась направляющая канюля, укрепленная на стереотаксической головке. В ходе эксперимента в канюлю погружался микроинъектор, через который в боковой желудочек мозга вводилось 10 мкл раствора, содержащего 500 нг ИЛ-1 β , со скоростью 1 мкл/мин.

В кровеносную систему через бедренную вену вводилось 500 нг вещества, разведенного в 0,1 мл раствора.

Для оценки вентиляторной чувствительности к хеморецепторной стимуляции использовался метод возвратного дыхания. Вентиляторная чувствительность определялась с помощью построения кривых роста вентиляции при снижении содержания кислорода в альвеолярном воздухе. Изменение состава альвеолярного газа достигалось дыханием гипоксической газовой смесью. Парциальное давление кислорода в альвеолярном воздухе ($P_{A}O_2$) измерялось при помощи квадрупольного масс-спектрометра МС 7-100 (ИАП РАН, Санкт-Петербург).

При регистрации вентиляторного ответа на гипоксическую стимуляцию использовалась азотно-гипоксическая смесь (15 % O_2 и 5 % CO_2 в азоте). Изокапния поддерживалась за счет добавленного в дыхательную смесь CO_2 и удаления с помощью адсорбента из выдыхаемого воздуха, поступающего в мешок для возвратного дыхания, углекислого газа, образующегося в организме. По мере потребления кислорода при дыхании из мешка происходило постепенное убывание содержания O_2 в дыхательной смеси, нарастала стимуляция периферических хеморецепторов, и происходило соответствующее увеличение легочной вентиляции. Продолжительность проведения пробы с возвратным дыханием составляла 4 мин.

Статистическая обработка данных проводилась программными средствами с использованием Microsoft Excel. Вычислялась средняя величина регистрируемых параметров и ошибка средней. Для оценки достоверности применялся однофакторный дисперсионный анализ, уровень вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. При возвратном дыхании по мере постепенного усиления гипоксической стимуляции наблюдалось увеличение дыхательного объема (ДО), минутного объема дыхания (МОД) и средней скорости инспираторного потока (показателя центральной инспираторной активности) как до введения вещества, так и после.

Однако под действием ИЛ-1 β угол наклона к оси абсцисс линий тренда, характеризующего зависимость между величиной регистрируемых параметров и степенью хеморецепторной стимуляции дыхания, изменялся.

На графиках показаны линии тренда, отражающие зависимость между снижением парциального давления кислорода в альвеолярном газе и увеличением минутного объема дыхания до и после интравентрикулярного и системного введения ИЛ-1 β (рис. 1а, б). По мере того как развивается действие интерлейкина (от 20 до 90 мин после инъекции), угол наклона вентиляторной кривой к оси абсцисс уменьшается, что свидетельствует о снижении вентиляторной чувствительности к гипоксии.

Такие же изменения наблюдались и при регистрации ДО и средней скорости инспираторного потока. Наклон линий тренда, характеризующих зависимость ДО и скорости инспираторного потока от напряжения кислорода в артериальной крови, снижался после действия ИЛ-1 β .

Проведение количественных расчетов подтвердило достоверность снижения величины прироста респираторных параметров в ответ на гипоксическую стимуляцию на фоне действия ИЛ-1 β . Расчет величины прироста регистрируемых параметров при снижении $P_{A}O_2$ на 1 мм рт. ст. (так называемый slope) показал, что через 40 мин после введения интерлейкина прирост МОД уменьшался на 57 %, ДО – на 25 % и скорости инспираторного потока – на 36 % по сравнению с фоновыми величинами (рис. 2).

Следует отметить, что в данном исследовании реакция на гипоксию у наркотизированной крысы выражалась прежде всего в увеличении ДО. Наблюдалось также небольшое учащение дыхания, однако четкой прямой зависимости между снижением $P_{A}O_2$ в альвеолярном газе и увеличением частоты дыхания не обнаруживалось. Поэтому изменения в динамике МОД в большей степени совпадали с изменениями динамики дыхательного объема, чем с изменением частоты дыхания.

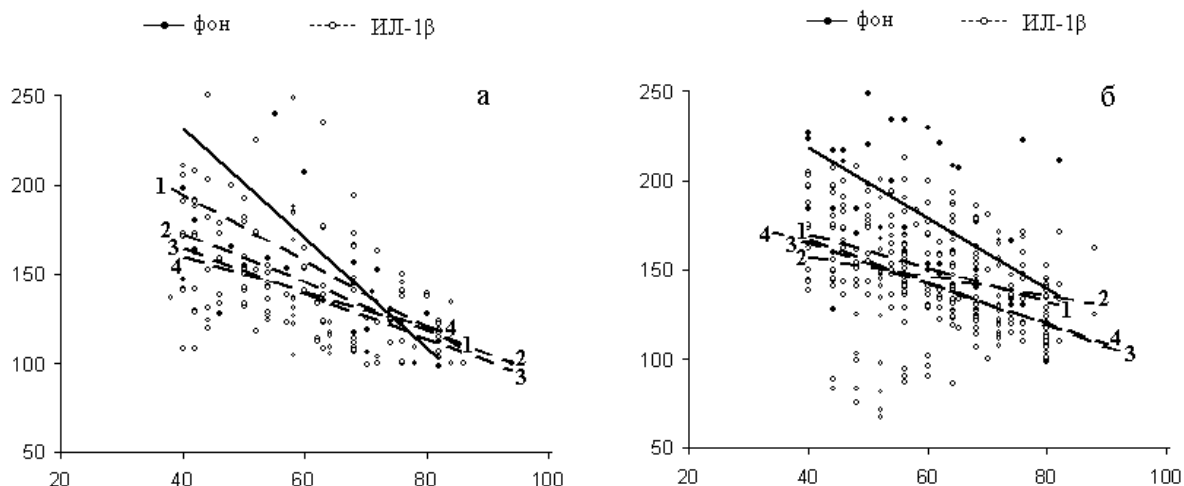


Рис. 1. Изменение МОД при возвратном дыхании гипоксической газовой смесью: а – при интравентрикулярном введении, б – при системном введении. По оси ординат – минутный объем дыхания, % от фоновых значений. По оси абсцисс – парциальное давление O_2 в альвеолярном газе. Сплошная линия – до введения ИЛ-1 β , линии 1–1, 2–2, 3–3, 4–4 – 20, 40, 60, 90 мин после введения ИЛ-1 β соответственно

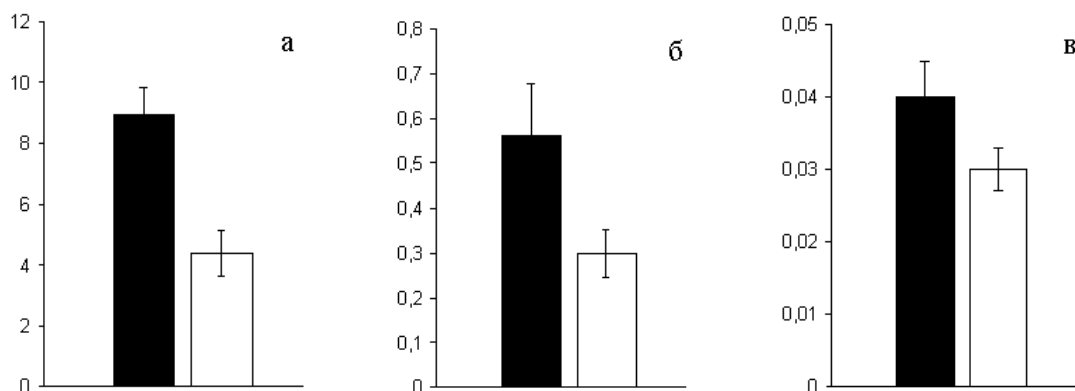


Рис. 2. Изменение прироста респираторных параметров при снижении $P_{A}O_2$ в альвеолярном газе на 1 мм рт. ст. (slope): а – минутной вентиляции, б – средней скорости инспираторного потока, в – дыхательного объема. Темные столбцы – до введения ИЛ-1 β (фон), светлые столбцы – после введения ИЛ-1 β . По оси ординат: а – slope МОД, мл/мин/мм рт. ст., б – slope ДО, мл/мм рт. ст., в – slope среднего инспираторного потока, мл/с/мм рт. ст.

Обнаруженное снижение прироста средней скорости инспираторного потока при возвратном дыхании на фоне повышенного церебрального уровня интерлейкина-1 β указывает на ослабление реакции центральной инспираторной активности на хеморецепторную стимуляцию, что в свою очередь и вызывает снижение приростов ДО и МОД в ответ на гипоксическую стимуляцию. Это дает основания считать, что ослабление вентиляторной чув-

ствительности к гипоксии было связано с влиянием интерлейкина-1 β на центральные нейрональные механизмы, участвующие в хеморецепторной регуляции дыхания. Известно, что афферентная импульсация от периферических хеморецепторов поступает в дорсальную респираторную группу нейронов дыхательного центра, расположенную в области ядра одиночного тракта. Импульсы от хеморецепторов активируют расположенный здесь пул α -ин-

спираторных нейронов, который формирует центральную инспираторную активность (ЦИА) и посылает эфферентную импульсацию в спинной мозг к ядрам дыхательных мышц. Логично предположить, что обнаруженный нами респираторный эффект интерлейкина мог проявляться через торможение α -инспираторных нейронов дыхательного центра, тем более что экспрессия ИЛ-1 β и его рецепторов обнаружена в респираторно зависимых районах продолговатого мозга, в том числе и в области ядра одиночного тракта [4, 6].

Возможно, что и при системном введении снижение ответа на гипоксию было связано с действием ИЛ-1 β на нейроны дыхательного центра, т.к. провоспалительные цитокины оказывают возбуждающее, а не ингибирующее действие на клетки каротидного синуса, усиливая их ответ на острую гипоксию [3]. Исходя из этого логично было бы ожидать увеличения вентиляторной чувствительности к гипоксии при системном действии ИЛ-1 β . Однако в противоположность этому в наших экспериментах регистрировалось снижение вентиляторной чувствительности, что позволяет предположить тормозное влияние ИЛ-1 β на центральное звено дыхательного хеморефлекса. Хотя цитокины – это гидрофильные полипептиды, т.е. достаточно крупные молекулы, которые не могут легко проходить через гематоэнцефалический барьер, тем не менее они могут оказывать центральный эффект даже при периферическом введении. Центральный респираторный эффект при системном действии интерлейкина мог реализовываться посредством вторичных мессенджеров, простагландина (PE2) и оксида азота (NO), которые в большом количестве экспрессируются клетками эндотелия мозговых сосудов при активации имеющихся здесь рецепторов ИЛ-1 β . В отличие от молекул цитокинов NO и PE2 являются более мелкими молекулами, которые могут легко проходить через плазмолемму и гематоэнцефалический барьер и оказывать действие на клетки ЦНС.

Заключение. Таким образом, полученные данные дают основание считать, что экзогенное повышение содержания ИЛ-1 β как в цереброспинальной жидкости, так и в плазме

крови влияет на хеморецепторные механизмы регуляции дыхания, снижая вентиляторный ответ на гипоксию, что связано с влиянием ИЛ-1 β на центральные нейрональные механизмы, участвующие в хеморецепторной регуляции дыхания. Гематоэнцефалический барьер не препятствует проявлению респираторных эффектов ИЛ-1 β . Ослабление вентиляторной чувствительности к изменению газового состава крови указывает на снижение резервных возможностей дыхательной системы при развитии системного ответа на воспаление, когда уровень провоспалительных цитокинов в организме резко возрастает.

1. *Aleksandrova, N.P.* Effect of intracerebroventricular injection of interleukin-1-beta on the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia / N.P. Aleksandrova, G.A. Danilova // *Eur. J. Med. Res.* – 2010. – Vol. 15, Sup. II. – P. 3–6.

2. Antioxidants increase the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia / S. Zakyntinos et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2007; 175: 62–8.

3. Chronic hypoxia upregulates the expression and function of proinflammatory cytokines in the rat carotid body / S.Y. Lam et al. // *Histochem. Cell. Biol.* – 2008, 130 (3): 549–59.

4. *Gordon, F.J.* Effect of nucleus tractus solitarius lesions on fever produced by interleukin-1beta / F.J. Gordon // *Auton. Neurosci.* – 2000. – Vol. 85. – P. 102.

5. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum / J.H. Vernooy et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2002; 166: 1218.

6. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? / R. Dantzer et al. // *Auton. Neurosci.* – 2000. – Vol. 85. – P. 60.

7. *Paxinos, G.* The rat brain in stereotaxic coordinates / G. Paxinos, C. Watson. – London : Academic Press, 1982.

8. Sleep apnoea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance and hypercytokinemia / A.N. Vgontzas et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2000; 85: 1151–8.

9. *Vassilakopoulos, T.* The immune response to resistive breathing / T. Vassilakopoulos, C. Roussos, S. Zakyntinos // *Eur. Respir. J.* – 2004; 1033–43. Review.

10. Ventilatory dysfunction in mdx mice: impact of tumour necrosis factor-alpha deletion / L.E. Gosselin et al. // *Muscle Nerve.* – 2003. – Vol. 28. – P. 336.

CHANGE OF THE VENTILATORY RESPONSE ON THE HYPOXIA INCREASE OF THE LEVEL INTERLEUKIN-1B IN BLOOD AND CEREBROSPINAL FLUID

G.A. Danilova, N.P. Aleksandrova

Pavlov Institute of Physiology RAS, St.-Petersburg

In experiments on anesthetized, tracheostomized rats the effects of the main pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) on the hypoxic ventilatory responses was studied in intracerebroventricular and systemic injection.

It was established that the elevation of IL-1 β level in the body causes a decrease in ventilatory sensitivity to hypoxic changes in blood gas composition: it was shown a decrease in slopes of tidal volume, minute ventilation and average rate of inspiratory flow reflecting the level of the central inspiratory activity. Also it was established that intravenous administration of IL-1 β a lesser weakens the hypoxic response than the intraventricular injections. The data obtained suggest that an exogenous increase in proinflammatory cytokines in blood and cerebrospinal fluid modulates chemoreceptor reflexes.

Keywords: central and peripheral chemoreception, cytokines, external respiration, hypoxia.