

УДК 612.217+612.766

ВЛИЯНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 В НА ВЕНТИЛЯТОРНУЮ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ГИПЕРКАПНИИ*

Г.А. Данилова, Н.П. Александрова

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН

В экспериментах на наркотизированных, трахеостомированных, спонтанно дышащих крысах, изучались эффекты интрацеребровентрикулярного введения основного провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) на функцию дыхания. Установлено, что ИЛ-1 β вызывая увеличение минутной вентиляции легких и средней скорости инспираторного потока, в тоже время снижает вентиляторный ответ на прогрессирующую гипероксическую гиперкапнию. Сделан вывод об ослаблении вентиляторной чувствительности к изменению газового состава крови при повышении церебрального уровня провоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: *цитокины, интерлейкин-1 β , внешнее дыхание, центральная хеморецепция, гиперкапния.*

Введение. Как известно, в рефлекторной регуляции дыхания важнейшая роль отводится центральным хеморецепторам. Их активация при повышении содержания углекислого газа в артериальной крови вызывает увеличение вентиляции легких, необходимое для удаления избытка CO₂ из организма и поддержания газового гомеостаза.

Недавние исследования показали, что оксидативный стресс и антиоксиданты могут изменять вентиляторный ответ на гиперкапнию [9]. Было обнаружено увеличение уровня провоспалительных цитокинов при многих заболеваниях дыхательных путей, сопровождающихся увеличением сопротивления дыханию, таких как астма, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), сонное апноэ [7; 8]. Установлено, что и у здоровых людей и животных при дыхании с добавочным инспираторным сопротивлением также наблюдается рост уровня цитокинов в крови [6]. С другой стороны известно что, резистивное дыхание оказывает влияние на центральную хеморецепцию, уменьшая вентиляционный ответ на гиперкапническую стимуляцию [3]. Однако механизмы этого влияния не известны. Мы предполагаем, что повышение церебрального уровня провоспалительных цитокинов, стимулированное оксидативным стрессом во время резистивного дыхания, может быть одной из причин вызывающей ослабление вентиляторной чувствительности к

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

гиперкапнии.

Цель данной работы – исследование влияния провоспалительных цитокинов на хеморецепторный аппарат регуляции внешнего дыхания. Для этого производился анализ вентиляторных ответов на гиперкапнию до и после повышения церебрального уровня интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β), одного из главных провоспалительных цитокинов.

Материал и методика Эксперименты проводились на 10 трахеостомированных крысах линии Wistar (250-280г), наркотизированных внутрибрюшинным введением уретана (1200 мг/кг). Все эксперименты на животных были проведены с соблюдением этических норм и правил работы на анестезированных животных. Уровень анестезии был достаточен, чтобы устранить болевые рефлекссы.

В ходе экспериментов осуществлялась пневмотахографическая регистрация объемно-временных параметров внешнего дыхания. Объемная скорость воздушного потока (пневмотахограмма) регистрировалась при помощи миниатюрной пневмометрической трубки (AD Instruments MLT1L), соединенной с трахеостомической трубкой и пневмотахографом. По пневмотахограмме измерялась максимальная скорость воздушного инспираторного и экспираторного потока, 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.

Внутригрудное давление измерялось в нижней трети пищевода катетером с латексным баллоном, заполненным воздухом, связанным с преобразователем давления. Величина инспираторных колебаний внутригрудного давления (Poes) использовалась как косвенный показатель силы сокращений инспираторных мышц.

Повышение церебрального уровня ИЛ-1 β производилось путем микроинъекции раствора данного цитокина в боковой желудочек головного мозга. Для интравентрикулярного введения вещества использовался стереотаксический метод. Голова животного закреплялась в стереотаксе. С поверхности черепа удалялись кожа и соединительные ткани. С помощью бормашини рассверливалось трепанационное отверстие, в которое вводилась микроканюля, соединенная с микрошприцем, заполненным раствором интерлейкина. 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 3,7 мм от поверхности черепа [4]. Затем при помощи шприца Гамильтона в боковой желудочек мозга

производилось медленное введение раствора интерлейкина (0,5 мкг вещества в 10 мкл раствора) со скоростью 1–2 мкл/мин.

Для того чтобы исследовать влияние провоспалительных цитокинов на хеморефлекторную регуляцию дыхания использовался метод возвратного дыхания [5]. Суть метода состоит в том, что он позволяет выявить зависимость между изменением газового состава крови и регистрируемыми параметрами. Для возвратного дыхания была смонтирована специальная замкнутая система, состоящая из мешка с тонкими эластичными стенками и миниатюрной клапанной коробки. Для регистрации ответа дыхательной системы на гиперкапническую стимуляцию мешок, из которого дышало животное, заполнялся гипероксически-гиперкапнической газовой смесью (60% O₂, 7% CO₂ в азоте). Процентное содержание CO₂ было близко по парциальному давлению к PCO₂ смешанной венозной крови. В результате PCO₂ в мешке, легких и крови быстро уравнивалось, а дальнейшее его нарастание в системе обуславливалось только продукцией CO₂ в тканях. Так как избыток кислорода, содержащийся в дыхательной смеси устраняет гипоксическую стимуляцию периферических хеморецепторов, то регистрировалась реакция на чистый гиперкапнический стимул, который активирует медуллярные (центральные) хеморецепторы.

Продолжительность проведения пробы с возвратным дыханием составляла 4 минуты. Такие тестирующие пробы проводились до интравентрикулярного введения ИЛ-1β, и через каждые 20 минут в течении полутора часов после его введения. Изменение газового состава крови оценивалось с помощью масс-спектрометрии альвеолярного газа. Вентиляторные ответы на гиперкапнию анализировались в интервале увеличения PCO₂ от 50 до 85 ммHg в контроле и после интравентрикулярного введения ИЛ-1β.

Вычислялась средняя величина регистрируемых параметров и ошибка средней. Статистический анализ данных до и после интравентрикулярного введения выполнен с применением дисперсионного анализа. Различия считали статистически значимыми при P<0,05.

Результаты и обсуждение. Интравентрикулярное введение ИЛ-1β вызывало достоверное увеличение минутного объема дыхания и средней скорости инспираторного потока. Была также обнаружена тенденция к увеличению дыхательного объема, частоты дыхания и внутригрудного давления под действием интерлейкина. Однако изменения этих параметров в данной серии экспериментов не были статистически значимыми (таблица). Интравентрикулярное введение физиологического раствора не оказывало влияние на паттерн дыхания.

Анализ вентиляторных ответов на гиперкапнию показал существенное изменение чувствительности дыхательной системы к

гиперкапнической стимуляции после интравентрикулярного введения ИЛ-1 β . При возвратном дыхании по мере роста парциального давления CO₂ в крови наблюдалось увеличение минутного объема дыхания (МОД) как до введения вещества, так и после его введения. Однако сравнительный анализ вентиляторных кривых зарегистрированных до и после введения ИЛ-1 β выявил характерные различия. Графическая обработка данных показала, что после введения препарата уменьшается угол наклона линии тренда, усредняющей вентиляторные кривые, зарегистрированные в нескольких экспериментах, что свидетельствует об уменьшении вентиляторной чувствительности к гиперкапнии (рис. 1). Респираторный эффект интерлейкина-1 β отчетливо проявлялся через 20 минут действия вещества, через 40 минут был выражен максимально, через 60 минут снижался и исчезал через 90 минут (линии тренда становились параллельными).

Т а б л и ц а

Объемно-временные параметры дыхания
до и после введения интерлейкина-1 β

Параметры	Фон	Интерлейкин-1 β
Минутный объем дыхания, мл/мин	103 \pm 5,3	126 \pm 3,8**
Дыхательный объем, мл	1,00 \pm 0,06	1,20 \pm 0,06
Частота дыхания, дых/мин	112 \pm 7,0	113 \pm 7,0
Средний инспираторный поток, мл/с	3,7 \pm 0,27	4,40 \pm 0,12*
Внутригрудное давление, ммН ₂ O	1,60 \pm 0,36	2,50 \pm 0,49
Напряжение углекислого газа, ммНг	34 \pm 3,0	30 \pm 3,0

Примечание. * – P<0,05; ** – P<,01 по сравнению с исходными данными.

Проведение количественных расчетов показало достоверное снижение величины прироста МОД, ДО и среднего инспираторного потока в ответ на гиперкапническую стимуляцию на фоне действия ИЛ-1 β (рис. 2). Установлено, что прирост МОД при увеличении PCO₂ на 1 мм рт. ст. через 40 минут действия интерлейкина снижался на 47%, прирост ДО – на 40% и средней скорости инспираторного потока на 50% по сравнению с фоновыми величинами. В контрольных экспериментах с интравентрикулярным введением физиологического раствора не было обнаружено изменение угла наклона линии тренда и величины прироста регистрируемых параметров при гиперкапнической стимуляции на фоне действия ИЛ-1 β .

Полученные данные свидетельствуют о снижении вентиляторной чувствительности к гиперкапнии при повышении содержания ИЛ-1 β в цереброспинальной жидкости, что определяется влиянием этого цитокина на механизмы центральной хеморецепции, так как

периферические хеморецепторы при дыхании гипероксически-гиперкапнической газовой смесью не активируются.

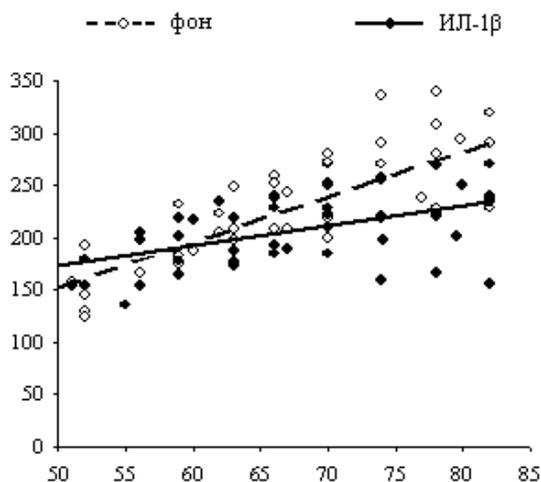
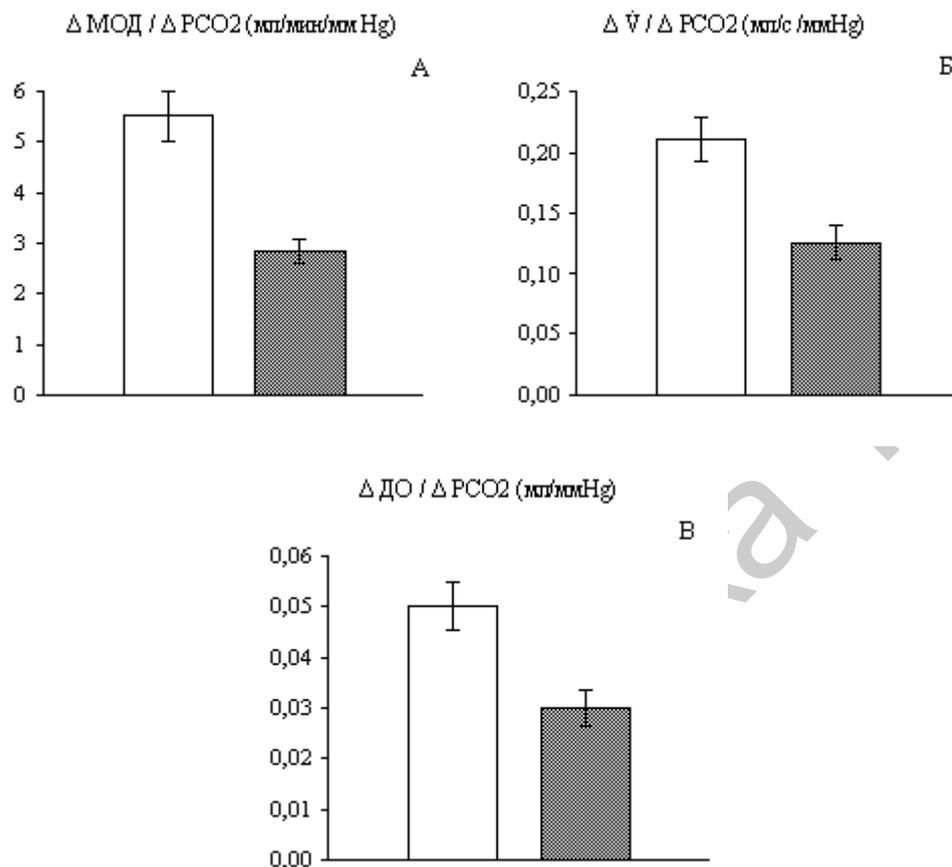


Рис. 1. Снижение вентиляторной чувствительности к CO_2 после интравентрикулярного введения ИЛ-1β: по оси абсцисс – парциальное давление углекислого газа (мм рт.ст.), по оси ординат – минутный объем дыхания (мл/мин)

Известно, что афферентная импульсация от центральных рецепторов поступает в дорсальную респираторную группу нейронов дыхательного центра, расположенную в области ядра одиночного тракта. Импульсы от хеморецепторов активируют расположенный здесь пул α -инспираторных 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 может проявляться через торможение α -инспираторных нейронов дыхательного центра.

При анализе реакций на гиперкапнию нельзя исключить и возможного влияния интерлейкина на центральные хеморецепторные нейроны, которые расположены на вентральной поверхности продолговатого мозга. Кроме того, респираторный эффект при центральном введении интерлейкина мог реализовываться через посредство вторичных мессенджеров, простагландина (PE2) и оксида азота (NO), которые экспрессируются эндимными клетками, выстилающими желудочки мозга при активации имеющихся здесь рецепторов ИЛ-1β [1]. Введенный в боковые желудочки ИЛ-1β мог оказывать влияние даже на те нейроны, которые не имеют рецепторов цитокинов.



Р и с . 2 . Влияние ИЛ-1 β на величину прироста минутной вентиляции (А), средней скорости инспираторного потока (Б), дыхательного объема (В) при гиперкапнической стимуляции: белые столбцы – до введения ИЛ-1 β (фон); черные – после 40 мин действия вещества

Полученные нами данные об ослаблении вентиляторной чувствительности к изменению газового состава крови при действии ИЛ-1 β находятся в соответствии с результатами другого исследования, в котором было показано, что прием антиоксидантов способствует повышению вентиляторной чувствительности к гиперкапнии при дыхании с инспираторной резистивной нагрузкой [9]. Авторы объясняют этот эффект тем, что антиоксиданты уменьшают оксидативный стресс, развивающийся при резистивном дыхании. Эти данные косвенно подтверждают достоверность результатов нашего исследования, показывающих, что увеличение уровня провоспалительных цитокинов, которое характерно для оксидативного стресса, вызывает противоположный эффект – снижение вентиляторной

чувствительности к CO₂. Кроме того, полученные нами данные подтверждаются исследованием, проведенным на мышах с мышечной дистрофией, имеющих сниженный вентиляторный ответ на гиперкапнию по сравнению с нормальными мышами. У таких животных конкурентное устранение провоспалительного цитокина TNF- α (посредством удаления гена для TNF- α) значительно улучшает вентиляторный ответ на гиперкапнию, что указывает на то, что эндогенно продуцируемый TNF- α угнетает этот ответ [2].

Заключение. Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод о возможном участии провоспалительных цитокинов – медиаторов иммунной системы, в модуляции хеморецепторных рефлексов. Повышенное содержание провоспалительных цитокинов в цереброспинальной жидкости ослабляет вентиляторную чувствительность к хеморецепторной стимуляции, что может быть причиной снижения вентиляторного ответа на гиперкапнию при дыхании с добавочным инспираторным сопротивлением, которое сопровождается эндогенным повышением системного уровня провоспалительных цитокинов. Ослабление вентиляторной чувствительности к изменению газового состава крови при действии провоспалительных цитокинов указывает на снижение резервных возможностей дыхательной системы при развитии системного остро фазового ответа на воспаление.

Список литературы

1. *Graff G.R., Gosal D.* Cardiorespiratory responses to interleukin-1beta in adult rats: role of nitric oxide, eicosanoids and glucocorticoids // *Arch. Physiol. Biochem.* 1999. Vol. 107, № 2. P. 97–112.
2. *Gosselin L.E., Barkley J.E., Spencer M.J., McCormick K.M., Farkas G.A.* Ventilatory dysfunction in mdx mice: impact of tumor necrosis factor-alpha deletion // *Muscle Nerve.* 2003. Vol. 28. P. 336–343.
3. *Mador J.M., Tobin M.J.* The effect of inspiratory muscle fatigue on breathing pattern and ventilatory response to CO₂ // *J. Physiol.* 1992. Vol. 455. P. 17–32.
4. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. London. Academic Press. 1982. 256 p.
5. *Read D.J.* A clinical method for assessing the ventilatory response to carbon dioxide // *Australas Ann. Med.* 1967. Vol. 16. P. 20–22.
6. *Vassilakopoulos T., Roussos C., Zakynthinos S.* The immune response to resistive breathing // *Eur. Respir. J.* 2004. Vol. 24. P. 1033–1043.
7. *Vernooy J.H., Kucukaycan M., Jacobs J.A., Chavannes N.H., Buurman W.A., Dentener M.A., Wouters E.F.* Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor

- necrosis factor receptors are increased in sputum // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002. Vol. 166. P. 1218–1224.
8. *Vgontzas A.N., Paranicolaou D.A., Bixler E.O., Hopper K., Lotsikas A., Lin H.M., Kales A., Chrousos G.P.* Sleep apnoea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance and hypercytokinemia // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000. Vol. 85. P. 1151–1158.
9. *Zakynthinos S., Katsaounou P., Karatza M-H., Roussos C., Vassilakopoulos T.* Antioxidants increase the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007. Vol. 175. P. 62–68.

INFLUENCE INTERLEUKIN-1 β ON VENTILATORY SENSITIVITY TO HYPERCAPNIA

G.A. Danilova, N.P. Aleksandrova

Pavlov Institute of Physiology RAS

In experiments on anesthetized, tracheostomized, spontaneously breathing rats, the effects of intracerebroventricular injection of the basic proinflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) on breath function were studied. It is established that IL-1 β causing increase in minute ventilation of lungs and mean inspiratory flow, during too time reduces ventilatory the answer on progressing hyperoxic hypercapnia. The conclusion is drawn on easing ventilatory sensitivity to change of gas structure of blood at increase of cerebral level proinflammatory cytokines.

Keywords: *cytokines, interleukin-1 β , external respiration, central chemoreception, hypercapnia.*

Об авторах:

ДАНИЛОВА Галина Анатольевна—аспирант лаборатории физиологии дыхания, УРАН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6, e-mail: galdanilova@rambler.ru

АЛЕКСАНДРОВА Нина Павловна—доктор биологических наук, заведующая лабораторией физиологии дыхания, УРАН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6, e-mail: breath@kolt.infran.ru