

УДК 612.217,612.285.1

## УЧАСТИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЦИТОКИНА ИЛ-1 $\beta$ В МОДУЛЯЦИИ ПАТТЕРНА ДЫХАНИЯ

В.А. Меркурьев<sup>1</sup>, Н.П. Александрова<sup>1</sup>, В.Г. Александров<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург,

<sup>2</sup>Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена, г. Санкт-Петербург

В экспериментах на наркотизированных крысах исследовалось влияние основного провоспалительного цитокина интерлейкина-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ) на параметры внешнего дыхания. Установлено, что повышение как церебрального, так и системного уровня ИЛ-1 $\beta$  оказывает влияние на центральные механизмы регуляции паттерна дыхания, вызывая усиление минутного объема дыхания, связанное с учащением дыхания, увеличением центральной инспираторной активности и соответствующим ростом дыхательного объема.

**Ключевые слова:** провоспалительные цитокины, интерлейкин-1 $\beta$ , паттерн дыхания.

**Введение.** Интерлейкин-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ) – основной провоспалительный цитокин – является важнейшим эндогенным полипептидным медиатором нейроиммунных взаимодействий. Установлено, что экспрессия цитокинов, в т.ч. ИЛ-1 $\beta$ , не ограничена клетками только иммунной системы. Они могут продуцироваться в разнообразных органах и тканях, не исключая и центральную нервную систему (ЦНС), в которой обнаружены специфические рецепторы к цитокинам. Поэтому цитокины, действуя на клетки ЦНС, могут оказывать влияние на разнообразные физиологические функции, в т.ч. и на функцию дыхания.

В настоящее время установлено, что церебральный и системный уровни ИЛ-1 $\beta$  резко возрастают у больных с хроническими obstructивными заболеваниями легких, синдромом сонного апноэ, после спонтанного субарахноидального кровоизлияния, инсульта, ишемии и травматических повреждений мозга [8, 9, 11]. У таких пациентов часто наблюдается нарушение ритма и паттерна дыхания. Эти данные позволяют предположить, что цитокины участвуют в механизмах регуляции дыхания при развитии патологических состояний мозга и увеличении нагрузки на дыхательную систему, хотя прямых экспериментальных фактов, подтверждающих это предположение, пока очень мало.

**Цель исследования.** Изучить возможности и особенности модуляции паттерна ды-

хания при экзогенном повышении системного и церебрального уровня ИЛ-1 $\beta$ .

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

По пневмотахограмме измерялась максимальная скорость воздушного инспираторного и экспираторного потоков, длительность вдоха и выдоха, рассчитывалась частота дыхания. Для определения дыхательного объема (ДО) производилось интегрирование пневмотахографической кривой. Минутный объем дыхания (МОД) рассчитывался как произведение величины дыхательного объема и количества дыхательных движений за одну минуту. Средняя скорость инспираторного потока – косвенный показатель центральной инспираторной активности (ЦИА) –

рассчитывалась как частное от деления величины дыхательного объема на продолжительность вдоха.

Производилось экзогенное повышение уровня основного провоспалительного цитокина ИЛ-1 $\beta$  в крови и цереброспинальной жидкости. В одном случае вещество вводилось в кровь внутривенно, в другом – в цереброспинальная жидкость (ЦСЖ) в обход гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) (чтобы выяснить, влияет ли наличие барьерных структур на респираторные эффекты интерлейкина). Известно, что полипептиды, которыми являются и цитокины, не проходят через ГЭБ, так как это крупные молекулы. Поэтому эффекты при системном и центральном введении ИЛ могут быть разными.

Микроинъекции ИЛ-1 $\beta$  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. С помощью бормашины рассверливалось трепанационное отверстие, в которое вводилась направляющая канюля, укрепленная на стереотаксической головке. В ходе эксперимента в канюлю погружался микроинжектор, через который в боковой желудочек мозга вводилось 10 мкл раствора, содержащего 500 нг ИЛ-1 $\beta$ , со скоростью 1 мкл/мин.

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

При выполнении контрольных экспериментов в таком же объеме вводился физиологический раствор, не содержащий ИЛ-1 $\beta$ .

Статистическая обработка данных проводилась программными средствами с использованием Microsoft Excel. Вычислялась средняя величина регистрируемых параметров и ошибка средней. Достоверность различий оценивалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

**Результаты и обсуждение.** Интравентрикулярное введение ИЛ-1 $\beta$  в цереброспинальную жидкость вызывало достоверное увеличение минутного объема дыхания, дыхательного объема, средней скорости инспираторного потока. Была также обнаружена тенденция к увеличению частоты дыхания под действием интерлейкина. Статистически значимые изменения в параметрах дыхания отмечались через 15–20 мин после введения препарата, достигая максимальных значений на 40 мин после введения ИЛ-1 $\beta$ . Через 40 мин после интравентрикулярного введения интерлейкина частота дыхания превышала фоновые значения в среднем на 10 %, а величина дыхательного объема – на 13 %. Вследствие роста частоты и глубины дыхания происходило увеличение минутной вентиляции легких в среднем на 40 %. Средняя скорость инспираторного потока, отражающая величину центральной инспираторной активности, возрастала на 20 %. Интравентрикулярное введение физиологического раствора не оказывало влияния на параметры внешнего дыхания (табл. 1).

Таблица 1

**Объемно-временные параметры дыхания до и после интравентрикулярного введения ИЛ-1 $\beta$  и физиологического раствора**

| Параметр     | Интерлейкин-1 $\beta$ , n=8 |                   |                   | Плацебо (физ. р-р), n=8 |                  |                 |
|--------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|------------------|-----------------|
|              | фон                         | 40 мин            | 60 мин            | фон                     | 40 мин           | 60 мин          |
| МОД, мл/мин  | 104,0 $\pm$ 9,0             | 126,0 $\pm$ 3,7** | 131,0 $\pm$ 5,4** | 95,0 $\pm$ 8,2          | 104,0 $\pm$ 10,5 | 94,0 $\pm$ 10,5 |
| ДО, мл       | 1,00 $\pm$ 0,05             | 1,13 $\pm$ 0,06*  | 1,17 $\pm$ 0,04*  | 0,90 $\pm$ 0,14         | 1,00 $\pm$ 0,08  | 1,00 $\pm$ 0,12 |
| ЧД, цикл/мин | 109,0 $\pm$ 6,0             | 117,0 $\pm$ 6,8   | 118,0 $\pm$ 6,4*  | 104,0 $\pm$ 8,0         | 101,0 $\pm$ 10,4 | 94,0 $\pm$ 2,6  |
| Винс, мл/с   | 3,70 $\pm$ 0,27             | 4,40 $\pm$ 0,12*  | 4,50 $\pm$ 0,19*  | 3,70 $\pm$ 0,31         | 3,80 $\pm$ 0,10  | 3,90 $\pm$ 0,11 |

**Примечание.** Достоверные изменения по сравнению с фоном: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

Введение ИЛ-1 $\beta$  в яремную вену приводило к повышению его уровня в циркуляторном русле, что вызывало такие же изменения в величине респираторных параметров, как и повышение церебрального уровня (табл. 2). Изменения в частоте дыхания при внутривенном введении ИЛ-1 $\beta$  наблюдались через 15 мин после начала введения и становились статистически достоверными через 20 мин, превышая фоновые значения на  $10\pm 3\%$ . Увеличение ДО начиналось через 20 мин после введения ИЛ-1 $\beta$ , становясь статистически

значимым через 35–40 мин и превышая фоновый уровень на  $36\pm 6\%$ . Рост дыхательного объема и частоты дыхания при внутривенном введении ИЛ-1 $\beta$  приводил к росту минутного объема дыхания. Достоверное увеличение МОД начиналось через 25 мин после начала введения ИЛ-1 $\beta$  и через 40 мин превышало фоновый уровень на  $27\pm 7\%$ . Введение в яремную вену физиологического раствора не вызывало увеличения минутного объема дыхания, так как не оказывало влияния ни на частоту, ни на глубину дыхания.

Таблица 2

**Величина объемно-временных параметров дыхания до и после внутривенного введения ИЛ-1 $\beta$  и физиологического раствора**

| Параметр     | Интерлейкин-1 $\beta$ , n=8 |                   |                   | Плацебо (физ. р-р), n=8 |                  |                 |
|--------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|------------------|-----------------|
|              | фон                         | 40 мин            | 60 мин            | фон                     | 40 мин           | 60 мин          |
| МОД, мл/мин  | 117,3 $\pm$ 10,6            | 143,6 $\pm$ 12,8* | 146,9 $\pm$ 12,0* | 100,5 $\pm$ 5,2         | 97,50 $\pm$ 4,02 | 94,0 $\pm$ 10,5 |
| ДО, мл       | 1,00 $\pm$ 0,08             | 1,36 $\pm$ 0,07*  | 1,40 $\pm$ 0,07*  | 1,00 $\pm$ 0,02         | 1,00 $\pm$ 0,08  | 1,00 $\pm$ 0,12 |
| ЧД, цикл/мин | 113 $\pm$ 7                 | 124 $\pm$ 9*      | 125 $\pm$ 8*      | 107,0 $\pm$ 2,0         | 105 $\pm$ 4      | 105,0 $\pm$ 2,6 |

**Примечание.** \* – достоверные изменения параметра по сравнению с фоном ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, полученные экспериментальные данные указывают на то, что увеличение уровня ИЛ-1 $\beta$  как в плазме крови, так и в цереброспинальной жидкости вызывает изменение паттерна дыхания. Наблюдается достоверное увеличение средней скорости инспираторного потока, дыхательного объема и минутной вентиляции легких. Наличие изменений параметров дыхания при внутривенном, системном введении указывает на то, что гематоэнцефалический барьер не препятствует влиянию ИЛ-1 $\beta$  на базовые параметры дыхания.

Итак, ИЛ-1 $\beta$  – основной провоспалительный цитокин – способен увеличивать вентиляцию легких, действуя как на центральную инспираторную активность и дыхательный объем, так и на частоту дыхания. Однако изменения в частоте дыхания были менее выраженными, чем изменения в дыхательном объеме и центральной инспираторной активности. В некоторых случаях наблюдалась лишь тенденция к учащению дыхания, но выявить достоверные изменения этого парамет-

ра не удавалось. Соотнесение этого факта с функциональными особенностями нейронов разных отделов дыхательного центра дает возможность утверждать, что действие ИЛ-1 $\beta$  при его церебральном введении реализовывалось в основном через нейроны дорсальной респираторной группы (ДРГ).

Как известно, все нейронные пулы дыхательного центра взаимосвязаны. Они участвуют в автоматической регуляции дыхания и в формировании компенсаторных реакций дыхательной системы в ответ на гомеостатические изменения и действие факторов окружающей среды. Вместе с тем установлено, что нейроны ДРГ участвуют прежде всего в формировании центральной инспираторной активности и в регуляции глубины дыхания, т.е. дыхательного объема, но практически не принимают участия в регуляции частоты дыхания [4]. В экспериментах *in vitro* на переживающих срезах ствола мозга крыс было показано почти полное отсутствие ритмогенерирующих нейронов в данной области дыхательного центра [1]. В противоположность

этому факту вентральная респираторная группа нейронов дыхательного центра в большей мере связана с регуляцией частоты дыхания. Эти данные позволяют предполагать, что в центральные механизмы обнаруженного нами респираторного эффекта ИЛ-1 $\beta$  включены нейроны ДРГ, активация которых усиливает центральную инспираторную активность и увеличивает ДО.

Такой же механизм может отвечать и за изменение паттерна дыхания не только при центральном, но и при периферическом, системном введении интерлейкина. Дело в том, что несмотря на то, что цитокины являются крупными молекулами, которые в принципе не проходят через гематоэнцефалический барьер, цитокины, циркулирующие в кровяном русле все же могут оказывать свое действие на нервные клетки. Во-первых, предполагается, что для основных провоспалительных цитокинов ИЛ-1 и TNF- $\alpha$  существуют специфические механизмы транспорта из плазмы в цереброспинальную жидкость [3, 12]. Во-вторых, проникновение периферических цитокинов из крови в ЦНС возможно через циркумвентрикулярные области головного мозга, лишенные ГЭБ. Установлено наличие аксональных проекций от области *area postrema* и большинства каудальных циркумвентрикулярных органов к ядру одиночного тракта, что является анатомическим путем, позволяющим циркулирующим медиаторам, выделяющимся в этих лишенных ГЭБ областях, передавать свои сигналы на нейроны ядра солитарного тракта (NTS) [2, 5, 10]. Плотность капилляров в этих областях является чрезвычайно высокой, а их эндотелий отличается большой проницаемостью. Сравнительно недавно были получены данные, показывающие, что ГЭБ практически отсутствует и в каудально-медиальной области NTS, т.е. там, где оканчиваются терминалы афферентных волокон от механорецепторов легких и дыхательных путей. Капилляры этой локальной области хорошо фенестрированы, что предоставляет цитокинам крови возможность прямого выхода в периваскулярное пространство и взаимодействия с нейронами NTS [7]. К тому же при повышении уровня циркулирующих провоспалительных цито-

кинов (ИЛ-6, TNF- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$ ) происходит увеличение проницаемости ГЭБ, что делает возможным проникновение в ЦНС не только цитокинов, но и клеток, которые их продуцируют (макрофагов, моноцитов, лимфоцитов, нейтрофилов). Таким образом, обнаруженное влияние ИЛ-1 $\beta$  на ЦИА и ДО при системном введении могло определяться, как и при его церебральном введении, действием на нейроны ДРГ дыхательного центра.

Однако, анализируя механизмы активирующего влияния циркулирующих цитокинов на функцию внешнего дыхания, нельзя исключить и их возможное действие на периферические каротидные хеморецепторы. Особенно это касается ИЛ-1 $\beta$ , который как было показано, способен стимулировать гломусные клетки каротидного тела. На анестезированных крысах было установлено, что каротидное тело отвечает на цитокиновую стимуляцию [6]. В гломусных клетках каротидного тела экспрессируются рецепторы ИЛ-1 первого типа. При их взаимодействии с циркулирующим ИЛ-1 $\beta$  увеличивается скорость разрядов каротидного синусного нерва, иннервирующего этот орган. Афферентная импульсация от периферических хеморецепторов, как известно, поступает в ДРГ, активируя  $\alpha$ -инспираторные нейроны и увеличивая, таким образом, ЦИА.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что повышение как церебрального, так и системного уровня ИЛ-1 $\beta$ , одного из основных провоспалительных цитокинов, оказывает влияние на центральные механизмы регуляции паттерна дыхания, вызывая увеличение центральной инспираторной активности и активируя вентиляционную функцию легких.

1. *Инюшкин А. Н.* Влияние тиролиберина на мембранный потенциал и спонтанную активность и калиевый А-ток нейронов ядра солитарного тракта / А. Н. Инюшкин // Современные проблемы физиологии вегетативных функций. – Самара, 2001. – С. 17–31.

2. *Aylwin M. L.* Non-NMDA and NMDA receptors in the synaptic pathway between *area postrema* and *nucleus tractus solitarius* / M. L. Aylwin, J. M. Horowitz, A. C. Bonham // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1998. – Vol. 275. – P.

1236.

3. *Banks W. A.* Passage of cytokines across the blood-brain barrier / W. A. Banks, A. J. Kastin, R. D. Broadwell // *Neuroimmunomodulation*. – 1995. – Vol. 2, № 4. – P. 241.

4. *Bianchi A. L.* Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters / A. L. Bianchi, M. Denavit-Saubie, J. Champagnat // *Physiol. Rev.* – 1995. – Vol. 75, № 1. – P. 1–45.

5. *Chen C. Y.* Non-NMDA and NMDA receptors transmit area postrema input to aortic baroreceptor neurons in NTS / C. Y. Chen, A. C. Bonham // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 1998. – Vol. 275. – P. 1695.

6. IL-1 $\beta$  inhibits IK and increases [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in the carotid body glomus cells and increases carotid sinus nerve firings in the rat / H. F. Shu [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2007. – Vol. 25 (12). – P. 3638–3647.

7. Microvascular specializations promoting rapid interstitial solute dispersion in nucleus tractus solitarius / P. M. Gross [et al.] // *Am. J. Physiol. Regul.*

*Integr. Comp. Physiol.* – 1990. – Vol. 259. – P. 1131.

8. *Minami M.* Brain cytokines and chemokines: roles in ischemic injury and pain / M. Minami, T. Katayama, M. Satoh // *J. Pharmacol. Sci.* – 2006. – Vol. 100. – P. 461.

9. 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. – Vol. 85. – P. 1151–1158.

10. *Van der Kooy D. D.* Organization of the projections of a circumventricular organ: the area postrema in the rat / D. D. Van der Kooy, L. Y. Koda // *J. Comp. Neurol.* – 1983. – Vol. 219. – P. 328.

11. *Vassilakopoulos T.* The immune response to resistive breathing / T. Vassilakopoulos, C. Roussos, S. Zakyntinos // *Eur. Respir. J.* – 2004. – Vol. 24. – P. 1033–1043.

12. *Wong M. L.* Localization of interleukin 1 type I receptor mRNA in rat brain / M. L. Wong, J. Licinio // *Neuroimmunomodulation*. – 1994. – Vol. 1, № 2. – P. 110.

## PARTICIPATION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IL-1 $\beta$ IN THE MODULATION OF BREATHING PATTERN

V.A. Merkuriev<sup>1</sup>, N.P. Alexandrova<sup>1</sup>, V.G. Alexandrov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg,*

<sup>2</sup>*Herzen State Pedagogical University of Russia, Saint-Petersburg*

In experiments on anesthetized rats, the influence of the main pro-inflammatory cytokine interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) on the parameters of the breathing was studied. It was found that increases in both cerebral and systemic levels of IL-1 $\beta$  affects the central mechanisms of regulation of breathing pattern, causing increased respiratory minute volume associated with rapid breathing, increased central inspiratory activity and a corresponding increase in tidal volume.

**Keywords:** pro-inflammatory cytokines, interleukin-1 $\beta$ , breathing pattern.