

На правах рукописи

МЕРКУРЬЕВ

Владимир Александрович

**МЕХАНИЗМЫ МОДУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1БЕТА НА
МЕХАНОРЕЦЕПТОРНЫЙ КОНТУР РЕГУЛЯЦИИ ДЫХАНИЯ**

Специальность 03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2021

Работа выполнена в лаборатории физиологии дыхания Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН»

Научный руководитель: **Александрова Нина Павловна**, доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Глазачев Олег Станиславович**, профессор, доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной физиологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава РФ, Москва

Миняева Арина Владимировна, доцент, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии ФГБОУ ВПО «Тверской государственной университет»

Ведущая организация: ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии

Защита диссертации состоится “ 19 ” апреля 2021 года в 13.00 часов на заседании Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций (Д002.020.01) при Институте физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6) и на сайте <http://www.infran.ru>

Автореферат разослан « ____ » 2021 года

Ученый секретарь Диссертационного совета
доктор биологических наук

Ордян Наталья Эдуардовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования.

Механорецепторный контур регуляции дыхания является важнейшим нервным механизмом, который обеспечивает поддержание оптимального паттерна дыхания, участвуя в модуляции дыхательного ритма. Рефлекторные дуги, которые берут начало от механорецепторов легких и верхних дыхательных путей реализуют обратную связь между работой центрального дыхательного механизма и объемом легких (Бреслав, Глебовский, 1981; Santti'Ambrogio, 2001; Widdicombe, 2001). Выяснение закономерностей функционирования этого механизма при различных состояниях организма является одной из фундаментальных проблем физиологии дыхания и нейрофизиологии.

Наличие объемно-зависимой обратной связи в саморегуляции дыхания впервые было обнаружено Герингом и Брейером, которые показали, что инфляция (раздувание) легких эффективно прерывает вдох и пролонгирует выдох, тогда как устойчивая дефляция легких (уменьшение легочного объема) вызывает противоположные эффекты. Показано, что эти рефлексы опосредованы вагальными легочными афферентами, берущими начало от медленно адаптирующихся рецепторов растяжения легких и трахеи. При этом в классическом рефлексе Геринга-Брейера различают инспираторно-тормозящий, и экспираторно-облегчающий механизмы (Widdicombe, 1964; Paintal, 1973), каждый из которых может по-разному реагировать на одно и то же воздействие и вносить свой независимый вклад в изменения параметров дыхательного цикла.

Рефлекс Геринга-Брейера представлен у многочисленных видов млекопитающих (Widdicombe, 1961). У человека он играет особенно важную роль в центральной регуляции респираторного паттерна в период младенчества, у новорожденных и детей в возрасте до одного года. Тем не менее, оба рефлекторных механизма, инспираторный и экспираторный, присутствуют в эйпноическом (т.е. в спокойном) дыхании не только детей, но и взрослых. Причем с увеличением дыхательной активности, во время сна, а также при общей анестезии, чувствительность этих рефлексов усиливается. Значение легочных рефлексов в регуляции дыхания возрастает также при увеличении хеморецепторного драйва и при обструкции дыхательных путей (Marek, et al., 2008). Установлено, что рефлексы Геринга-Брейера являются одним из интегративных механизмов одновременного нейрогенного усиления активности основных

дыхательных мышц и мышц верхних дыхательных путей, что способствует предохранению верхних дыхательных путей от фарингеальной окклюзии при увеличении сопротивления дыханию (Aleksandrova, 2004). Исследование физиологических механизмов реализации и модуляции объемно-зависимой обратной связи в системе регуляции дыхания имеет фундаментальное значение и необходимо для формирования целостного представления о центральных механизмах респираторного контроля.

Одним из современных направлений в области физиологии висцеральных систем является изучение роли цитокинов, нового класса эндогенных полипептидных медиаторов, в механизмах регуляции вегетативных функций организма. В настоящее время цитокины выделяются в новую самостоятельную систему регуляции физиологических функций, тесно связанную с нервной и эндокринной системами регуляции (Симбирцев, 2004). Установлено участие цитокинов, и, в частности, основного провоспалительного цитокина ИЛ-1 β , в модуляции центральных механизмов хеморецепторной регуляции дыхания (Aleksandrova, 2015, 2017). Показано, что цитокины взаимодействуют с различными медиаторными системами. Доказано, что ИЛ-1 β способен модулировать активность возбуждающих глутаматергических механизмов в ЦНС (Maier, 1998). В то же время известно, что глутамат является медиатором в синапсах, которые образованы афферентами медленноадаптирующихся механорецепторов воздухоносных путей на румр-клетках, расположенных в ядре одиночного тракта (Kubin, 2006; Miyazaki, 2006). Румр-клетки являются нейронами второго порядка в рефлекторной дуге инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга-Брейера (Miyazaki, 1999; Vonham, 2006). Получены также экспериментальные данные, указывающие на то, что информация от системных цитокинов в мозг может передаваться вагальными афферентами (Hansen et al 1998; Филиппова, Ноздрачев, 2007). Обнаружено, что ИЛ-1 β увеличивает вагальную афферентную активность (Niijima, 1996). Эти данные позволяют предположить участие ИЛ-1 β не только в хемо-, но и в механорецепторных механизмах регуляции дыхания, в которых основная роль отводится изменению афферентной импульсации от механорецепторов легких, поступающей в головной мозг по ветвям блуждающего нерва (рефлексы Геринга-Брейера). В настоящее время показана принципиальная возможность модуляции инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга-Брейера эндогенными респираторно-активными пептидами, такими как тиролиберин, гастрин-рилизинг пептид (Инюшкин, 2002; Инюшкина и др., 2009). Однако экспериментальное исследование влияния

цитокинов на функционирование обратной объемно-зависимой связи в системе регуляции дыхания до настоящего времени не проводилось.

Целью настоящего исследования является изучение нейроиммунных механизмов участвующих в механорецепторном контроле дыхания.

Задачи исследования:

1. Исследование влияния повышенного системного и церебрального уровня провоспалительного цитокина ИЛ-1 β на паттерн дыхания у анестезированных спонтанно дышащих крыс.
2. Изучение влияния ИЛ-1 β на рефлексы Геринга-Брейера.
3. Изучение роли циклооксигеназных путей в реализации модулирующего влияния ИЛ-1 β на паттерн дыхания и рефлекс Геринга-Брейера.
4. Выявление возможного участия нитрергических механизмов в реализации респираторно модулирующего действия ИЛ-1 β .
5. Экспериментальное исследование вопроса о возможном влиянии ИЛ-1 β на глутаматергические механизмы, вовлеченные в реализацию рефлексов Геринга-Брейера.

Научная новизна.

В настоящей работе представлены результаты экспериментального исследования одного из малоизученных вопросов, связанного с изучением участия иммунной системы в регуляции физиологических функций. В работе впервые получены прямые экспериментальные факты, указывающие на участие нейроиммунных механизмов в рефлекторном контроле респираторной функции. Впервые установлено, что повышение системного или церебрального уровня ИЛ-1 β приводит к изменению силы инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга-Брейера. Установлено, что ИЛ-1 β влияет на центральные механизмы регуляции дыхания, вызывая увеличение центральной инспираторной активности. Впервые изучены нейрхимические механизмы, реализующие влияние ИЛ-1 β на механорефлекторный контур регуляции дыхания. Показано, в частности, что усиление рефлексов Геринга-Брейера, вызываемое повышением системного уровня ИЛ-1 β , не проявляется на фоне ингибирования циклооксигеназной или NO-синтазной активности. Этот факт свидетельствует о том, что в основе модулирующих влияний провоспалительных цитокинов на центральные механизмы механорефлекторного контроля дыхания лежит усиление синтеза простагландинов и оксида азота. Получены новые данные, подтверждающие, что

провоспалительные цитокины могут модулировать активность возбуждающих глутаматергических механизмов в центральной нервной системе. Установлено, что одним из нейромедиаторных механизмов реализующих центральные влияния ИЛ-1 β на паттерн дыхания и рефлексы Геринга-Брейера является усиление глутаматергической передачи.

Теоретическая и практическая значимость.

Результаты настоящей работы способствуют решению фундаментальной проблемы физиологии – изучению роли нейроиммунных взаимодействий в регуляции физиологических функций. Они показывают, что повышение системного или церебрального уровня провоспалительных цитокинов, в частности ИЛ-1 β , оказывает влияние не только на основные параметры, характеризующие паттерн дыхания, но и на рефлексы Геринга-Брейера, осуществляющие объемно-зависимую связь в системе дыхания. Это доказывает, что влияние системного воспаления на висцеральные функции может реализовываться через модуляцию их рефлекторной активности. Доказано, что в реализации обнаруженных эффектов ИЛ-1 β участвуют простаноидзависимые и нитрергические механизмы. Таким образом, конкретизируются пути влияния системного воспаления на респираторную функцию. Полученные результаты существенно расширяют и дополняют имеющиеся представления об участии иммунной системы в контроле висцеральных функций.

Исследование влияния гиперцитокинемии на функцию дыхания имеет и практическое значение, т.к. известно, что системный и церебральный уровень провоспалительных цитокинов резко возрастает у больных с хроническими обструктивными заболеваниями легких, синдромом сонного апноэ, а также у здоровых людей при дыхании с добавочным инспираторным сопротивлением. Известно, что для системного воспаления сопровождающегося гиперцитокинемией среди прочих неспецифических симптомов общего тяжелого заболевания характерны серьезные нарушения функций дыхания и кровообращения. Именно кардиореспираторные нарушения являются одними из первых симптомов сепсиса, предшествующих развитию полиорганной недостаточности. У детей с незрелыми произвольными механизмами контроля дыхания, а также у младенцев инфекция усугубляет нерегулярность дыхания и способствует возникновению опасных эпизодов апноэ. Результаты настоящего исследования будут способствовать разработке методов терапии респираторной дисфункции в условиях гиперцитокинемии, а также объективной оценке рисков, связанных с использованием препаратов на основе

иммуномодуляторов и могут быть использованы в лекционных курсах по нейрофизиологии и физиологии висцеральных систем.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Повышение системного уровня ИЛ-1 β вызывает изменение объёмно-временных параметров дыхания и усиление рефлексов Геринга-Брейера, опосредующих объёмно-зависимую обратную связь в системе дыхания. Это позволяет предполагать, что изменения паттерна дыхания, которые имеют место при системной воспалительной реакции, могут быть следствием гиперцитокинемии, оказывающей воздействие на центральные механизмы регуляции дыхания.

2. Респираторные эффекты ИЛ-1 β не проявляются на фоне ингибирования циклооксигеназной активности диклофенаком. Этот факт позволяет утверждать, что в основе модулирующих влияний провоспалительных цитокинов на рефлекторный контроль дыхания лежит усиление синтеза простагландинов.

3. L-NAME, неспецифический блокатор NO-синтазы, ослабляет потенцирующее действие ИЛ-1 β на рефлекс Геринга-Брейера, но не изменяет эффекта ИЛ-1 β на паттерн дыхания. Таким образом, NO-ергические механизмы наряду с циклооксигеназными опосредуют действие ИЛ-1 β на рефлекторный механизм регуляции дыхания, но не вовлекаются в реализацию влияний ИЛ-1 β на внутрицентральные механизмы генерации паттерна дыхания.

4. В реализацию респираторных эффектов ИЛ-1 β вовлечена глутаматергическая нейромедиаторная система.

Апробация результатов.

Результаты исследования были апробированы на XII Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2009); Межвузовской конференции молодых ученых «Герценовские чтения» (Санкт-Петербург, 2009); VII Всероссийской конференции с международным участием «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2009); Межвузовской конференции молодых ученых «Герценовские чтения» (Санкт-Петербург, 2010); XII Всероссийской с международным участием школе-семинаре «Экспериментальная и клиническая физиология дыхания» (Санкт-Петербург - Репино, 2013); IX Международном междисциплинарном конгрессе «Наука для медицины и психологии» (Судак, 2013); XXII съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Волгоград, 2013);

Международной научной конференции «Актуальные проблемы физиологии, биофизики и медицины» (Алматы, 2013); XIII Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (Сыктывкар, 2014); XI Международном междисциплинарном конгрессе «Наука для медицины и психологии» (Судак, 2015); Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2015). XIV Всероссийской с международным участием школе-конференции «Экспериментальная и клиническая физиология дыхания» (Санкт-Петербург, 2019).

Публикации

Результаты исследования опубликованы в 25 научных работах, из них 7 в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также в изданиях входящих в базы Scopus и Web of Science.

Личный вклад автора

Автор лично осуществлял методическую подготовку экспериментов и их проведение, обработку полученных данных, подготовку докладов и публикаций по результатам диссертационного исследования.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, описания основных экспериментальных методик, пяти глав, содержащих результаты собственных экспериментальных исследований и их обсуждения, общего заключения и списка литературы. Объем диссертации составляет 135 страниц печатного текста, включая 3 таблицы и 22 рисунка. Список цитируемой литературы содержит описание 250 источников, в том числе 195 зарубежных работ.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования и подготовка животного к эксперименту.

Эксперименты проводились на 100 спонтанно дышащих крысах Wistar (самцы, весом 250-300г.), наркотизированных внутрибрюшинным введением уретана из расчета 1400 мг/кг. Глубина наркоза контролировалась по степени выраженности корнеального рефлекса. Температура тела животного поддерживалась на уровне (35,6-36,8°C).

После достижения необходимой глубины наркоза производилась трахеостомия, устанавливался катетер в бедренную вену, вводился баллон-катетер в пищевод, и

ректальный термодатчик. Голова животного фиксировалась в стереотаксическом аппарате, на черепе размечались и рассверливались отверстия для стереотаксического введения микроинъектора. В экспериментах с регистрацией электрической активности диафрагмы производилась лапаротомия для обеспечения подхода к диафрагме с целью постановки миографических электродов.

Методы регистрации физиологических параметров.

Метод пневмотахометрии использовался для регистрации изменений объемной скорости воздушного потока. Объемная скорость инспираторного потока фиксировалась при помощи пневмометрической трубки, предназначенной для проведения измерений на мелких лабораторных животных (MLT1L, AD Instruments, Австралия). Пневмометрическая трубка подсоединялась к трахеостомической канюле, пневмотахографу и миниатюрной клапанной коробке. Измерения, произведенные на пневмотахографической кривой, позволяли определить частоту дыхания (ЧД), среднюю скорость инспираторного потока ($V_{инс}$), рассчитать дыхательный объем (ДО) и минутную вентиляцию (МОД).

Для регистрации инспираторных колебаний внутригрудного давления катетер, с латексным баллоном, заполненным воздухом вводился через рот в пищевод и фиксировался в его нижней трети. Катетер соединялся с полупроводниковым преобразователем давления.

Регистрация электрической активности диафрагмы производилась крючкообразными стальными электродами, которые устанавливались на реберную часть диафрагмы справа.

Сигналы от всех периферических устройств поступали на устройство сбора данных BIOGRAF-8 (разработка СПбГУАП, Россия), работающего под управлением специализированного пакета программ CODAS, оцифровывались, записывались на твердом диске персонального компьютера, обрабатывались и выводились на экран.

Тестирование рефлексов Геринга-Брейера.

Для оценки силы инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга-Брейера, использовался метод кратковременной конечно-экспираторной окклюзии. Дыхательные пути перекрывались в конце выдоха на уровне функциональной остаточной емкости легких, когда медленно адаптирующиеся рецепторы растяжения легких практически не активны. Чем сильнее выражен инспираторно-тормозящий рефлекс, тем в большей степени изменяются параметры так называемых постокклюзионных вдохов, т.е. дыхательных попыток на фоне окклюзии. Для

количественной оценки выраженности инспираторно-тормозящего рефлекса длительность первого постокклюзионного вдоха, т.е. продолжительность инспираторного колебания внутригрудного давления сразу после окклюзии, выражалась в процентах к длительности последнего предокклюзионного вдоха.

Для количественной оценки выраженности экспираторно-облегчающего рефлекса, кратковременные перекрытия дыхательных путей производились на высоте вдоха, когда тормозящий афферентный поток, поступающий в дыхательный центр от медленно адаптирующихся рецепторов легких, был максимален. Сила экспираторно-облегчающего рефлекса оценивалась по отношению длительности экспираторной паузы, так называемого «вагусного апноэ», наступавшей после окклюзии дыхательных путей к длительности последней экспираторной фазы перед окклюзией.

Способы введения физиологически активных веществ и экспериментальный протокол.

Экзогенное повышение церебрального уровня ИЛ-1 β достигалось введением данного вещества в правый боковой желудочек головного мозга. Координаты для введения канюли составляли 0,8 мм каудальнее уровня bregma, 1,5 мм латерально от средней линии и 3,5-4,0 мм от поверхности черепа. Микроинъекции производились с помощью шприца Гамильтона, соединенного с микроинъектором, в объеме 10 мкл раствора, содержащего 500 нг ИЛ-1 β , со скоростью 1 мкл/мин

Для повышения системного уровня циркулирующего цитокина 500 нг ИЛ-1 β разведенного в 1 мл раствора вводилось в кровеносную систему через бедренную вену. При проведении контрольных экспериментов в боковой желудочек головного мозга или в бедренную вену вводился соответствующий объем физиологического раствора.

Общая длительность эксперимента составляла 120 минут. В течение первых 10 минут производилась регистрация фоновых параметров дыхательной системы и тестирующие пробы с возвратным дыханием. Затем производилось экзогенное повышение уровня ИЛ-1 β либо в крови, либо в цереброспинальной жидкости в зависимости от задачи исследования и проводились тестирующие кратковременные окклюзионные пробы через каждые 20 минут до окончания эксперимента.

В экспериментальных сериях с исследованием роли простагландинов в реализации респираторных эффектов ИЛ-1 β ингибитор циклооксигеназы диклофенак вводился внутрибрюшинно в количестве 0,5 мкг на крысу. При исследовании роли NO-ергических механизмов в бедренную вену вводилось 2 мл раствора L-NAME, неспецифического блокатора NO-синтазы в дозировке 10 мг/кг. Введение ингибиторов

производилось за 10 мин до введения ИЛ-1 β , далее эксперимент проходил по вышеописанному протоколу.

Статистическая обработка данных производилась средствами пакета MS Excel. Вычислялась средняя величина регистрируемых параметров и ошибка среднего. Рассчитывались относительные процентные величины. Для оценки достоверности различий использовались непараметрические критерии, а именно U-критерий Манна-Уитни и T-критерий Уилкоксона, а также однофакторный дисперсионный анализ. Достоверность результатов определялась посредством однофакторного дисперсионного анализа. Различия считались достоверными при $P < 0,01$ и $P < 0,05$. По полученным значениям строились графики и диаграммы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ИЛ-1 β на паттерн дыхания.

Повышение как церебрального, так и системного уровня ИЛ-1 β через 40 минут приводило к достоверному увеличению МОД, ДО, ЧД, Винс (Табл. 1).

Таблица 1.

Объемно-временные параметры дыхания до и после повышения церебрального и системного уровня ИЛ-1 β .

Параметр	Церебровентрикулярное введение ИЛ-1 β , n=8			Внутривенное введение ИЛ-1 β , n=8		
	фон	40 мин	60 мин	фон	40 мин	60 мин
ЧД, цикл/мин	109 \pm 6	117 \pm 6,8*	118 \pm 6,4*	113 \pm 7	124 \pm 9*	125 \pm 8*
ДО, мл	1 \pm 0,05	1,13 \pm 0,06*	1,17 \pm 0,04*	1,0 \pm 0,08	1,36 \pm 0,07*	1,4 \pm 0,07*
МОД, мл/мин	104 \pm 9	136 \pm 3,7**	141 \pm 5,4**	117,3 \pm 10,6	143,6 \pm 12,8*	146,9 \pm 12,0*
Винс, мл/с	3,7 \pm 0,27	4,4 \pm 0,12*	4,5 \pm 0,19*	3,8 \pm 0,34	5,6 \pm 0,26*	5,8 \pm 0,23**

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

Одновременно с изменениями объемно-временных параметров дыхания как при церебровентрикулярном, так и при внутривенном введении ИЛ-1 β происходило усиление сокращений инспираторных мышц, что выражалось в увеличении амплитуды инспираторных колебаний внутригрудного давления. Расчеты показали соответствие динамики изменений амплитуды интегрированной ЭМГ диафрагмы, инспираторных колебаний ВГД и величины ДО. Максимальное увеличение электрической активности

диафрагмы так же, как и других параметров, наблюдалось через 40-45 минут после введения ИЛ-1 β . Затем происходила стабилизация параметров и постепенное возвращение к фоновым значениям. Полученные результаты указывают на то, что наблюдаемое при действии ИЛ-1 β увеличение силы сокращений ДМ, вызывающее рост ДО, было вызвано усилением их эфферентной активации, что предполагает влияние ИЛ-1 β на центральные механизмы регуляции паттерна дыхания. При этом наличие гематоэнцефалического барьера не препятствовало проявлению центрального эффекта ИЛ-1 β .

Модуляция силы рефлексов Геринга-Брейера.

Повышение церебрального уровня ИЛ-1 β . Тестирование инспираторно-тормозящего рефлекса до и после церебровентрикулярного введения ИЛ-1 β позволило установить, что введение интерлейкина усиливает эффект конечно-экспираторной окклюзии трахеи. Увеличение длительности и амплитуды инспираторных колебаний ВГД после окклюзии на фоне действия ИЛ-1 β была больше, чем до его введения (рис. 1).

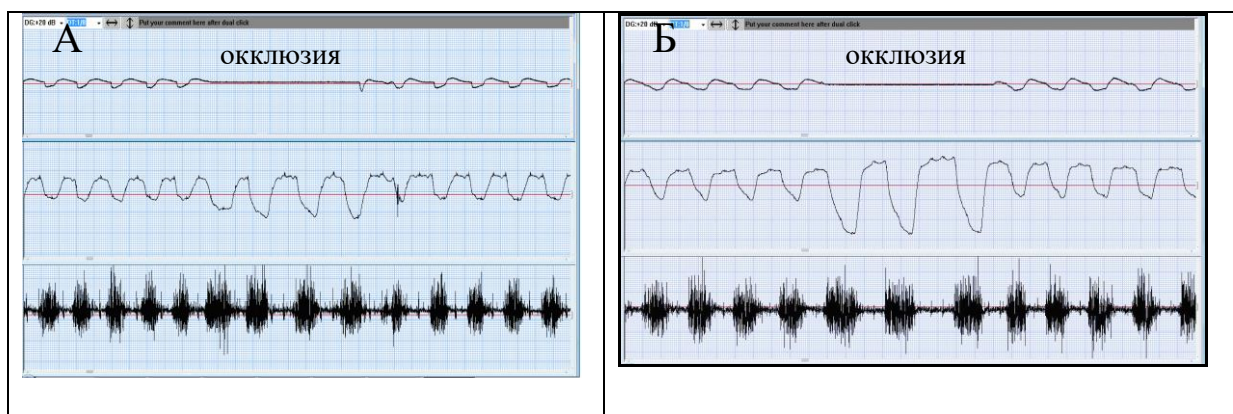


Рис. 1. Изменение паттерна дыхания наркотизированной крысы при окклюзии трахеи на выдохе до (А) и через 20 минут после (Б) введения ИЛ-1 β .

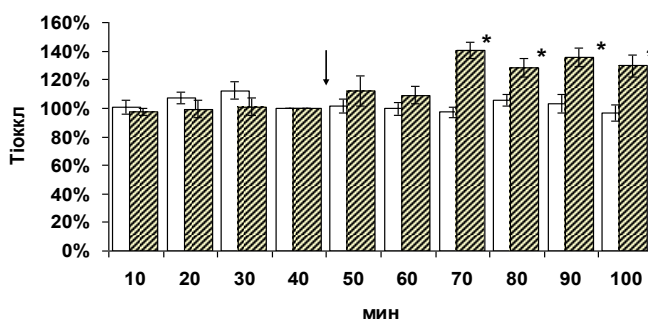
Сверху вниз: пневмотахограмма, внутригрудное давление, электрическая активность диафрагмы.

Так если до введения препарата нормированная продолжительность первого постокклюзионного вдоха составляла 225 ± 22 %, то через 20 минут после введения ИЛ-1 β она увеличивалась до 275 ± 22 %, а через 40 минут – уже до 360 ± 26 %. Более длительное наблюдение показало, что через 70 минут от начала введения ИЛ-1 β регистрируемый параметр возвращался к своим фоновым величинам. Введение физиологического раствора в контрольной серии экспериментов не вызывало достоверного изменения в нормированной длительности первого постокклюзионного

вдоха. Полученные данные свидетельствуют об усилении инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга-Брейера после повышения церебрального уровня ИЛ-1 β .

Повышение системного уровня ИЛ-1 β . Тестирование инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга-Брейера до и после внутривенного введения ИЛ-1 β показало, что после введения препарата происходит достоверное увеличение продолжительности постокклюзионного вдоха. Максимальное увеличение этого параметра наблюдалось через 40 - 50 минут действия ИЛ-1 β . Так, если до введения данного цитокина окклюзия дыхательных путей в конце выдоха вызывала увеличение продолжительности первого постокклюзионного вдоха до 170 ± 22 %, то через 20 минут после введения ИЛ-1 β продолжительность постокклюзионного вдоха увеличивалась до 223 ± 22 %, а через 40 минут уже до 235 ± 26 %. Полученные данные свидетельствуют об усилении инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга-Брейера после увеличения содержания ИЛ-1 β в плазме крови (рис.2 А).

А



Б

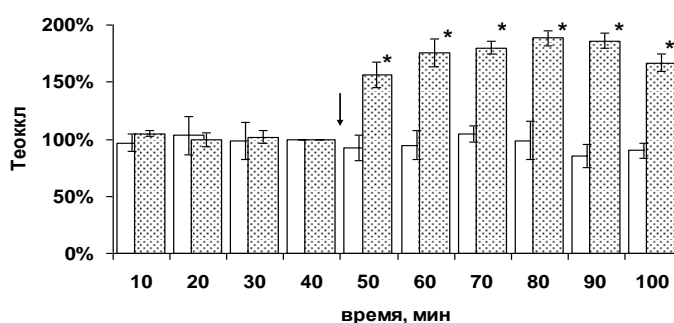


Рис. 2. Динамика силы рефлексов Геринга-Брейера при системном введении ИЛ-1 β и физиологического раствора.

А – инспираторно-тормозящий, Б – экспираторно-облегчающий рефлекс.

По оси ординат – показатели силы рефлекса, выраженные в процентах к величине этого показателя на сороковой минуте эксперимента; по оси абсцисс – время от начала регистрации. Заштрихованные столбики - экспериментальная серия с введением ИЛ-1 β ; светлые столбики – контрольная серия с введением физраствора. Стрелка – введение вещества.

При повышении системного уровня ИЛ-1 β было также проведено тестирование экспираторно-облегчающего рефлекса (рис. 2.Б.). Было установлено, что длительность вагусного апноэ достоверно возрастает на фоне действия ИЛ-1 β . Через 50 минут после введения препарата нормированная величина этого параметра превышала свои исходные значения на 95%, т.е. возростала почти в два раза, что свидетельствует об усилении экспираторно-облегчающего рефлекса Геринга-Брейера.

Итак, результаты данной части экспериментального исследования свидетельствуют об участии ИЛ-1 β в механорецепторном контроле, обеспечивающим реализацию объемно-зависимой обратной связи в системе дыхания. При этом модуляция силы рефлексов Геринга-Брейера под действием ИЛ-1 β происходит при повышении как его церебрального, так и системного уровня.

Результаты экспериментов с введением ИЛ-1 β на фоне ингибирования циклооксигеназной активности.

Влияние ИЛ-1 β на паттерн дыхания на фоне действия диклофенака.

Внутрибрюшинное введение диклофенака, ингибитора фермента циклооксигеназы и эндогенного синтеза простагландинов не оказывало значимого влияния на паттерн дыхания и силу рефлексов Геринга-Брейера при спокойном дыхании. Это свидетельствует об отсутствии собственного респираторного эффекта диклофенака.

Повышение системного уровня ИЛ-1 β после предварительного введения диклофенака не вызывало достоверного увеличения частоты дыхания и роста дыхательного объема. Вследствие отсутствия частотных и объемных изменений в паттерне дыхания не наблюдалось и увеличения вентиляции легких. Достоверных изменений в величине объемно-временных параметров дыхания не отмечалось даже через 40 минут действия ИЛ-1 β , когда его эффект был максимальным при его введении без диклофенака. Полученные данные указывают на то, что торможение циклооксигеназных путей синтеза простагландинов устраняет влияние ИЛ-1 β как на частотный, так и на объемный компонент паттерна дыхания.

Влияние ИЛ-1 β на силу рефлексов Геринга-Брейера на фоне действия диклофенака.

Тестирование инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга-Брейера показало, что повышение системного уровня ИЛ-1 β на фоне действия диклофенака не вызывало каких-либо изменений в продолжительности постокклюзионных вдохов. На рис. 3А показана динамика нормированных значений этого показателя при повышении системного уровня ИЛ-1 β в обычных условиях, а также на фоне действия диклофенака.

За 100% принята продолжительность постокклюзионного вдоха непосредственно перед внутривенным введением ИЛ-1 β , т.е. на 40-й минуте эксперимента. Как видно, действие диклофенака полностью устраняет влияние ИЛ-1 β на инспираторно-тормозящий рефлекс.

Для оценки выраженности экспираторно-облегчающего рефлекса Геринга-Брейера производился анализ длительности вагусного апноэ. В предыдущем разделе уже отмечалось, что длительность вагусного апноэ достоверно возрастает на фоне действия ИЛ-1 β . Через 50 минут после введения данного цитокина нормированная величина этого параметра превышала свои исходные значения на 95%, т.е. возростала почти в два раза, что свидетельствует об усилении экспираторно-облегчающего рефлекса Геринга-Брейера (рис. 3Б). Сочетанное действие ИЛ-1 β и диклофенака не оказывало влияния на параметры экспираторно-облегчающего рефлекса. Тестирование продолжительности вагусного апноэ по мере действия этих препаратов показало полное отсутствие изменений данного параметра в течение всего эксперимента.

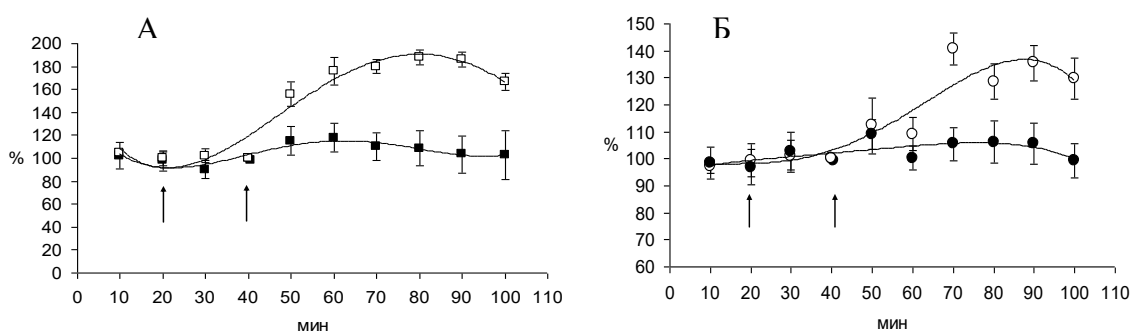


Рис. 3. Изменение силы инспираторно-тормозящего (А) и экспираторно-облегчающего (Б) рефлексов Геринга-Брейера под влиянием ИЛ-1 β на фоне действия диклофенака и в экспериментах с введением физраствора.

По оси ординат: нормированные показатели силы рефлексов. Первая стрелка – введение диклофенака (или физраствора), вторая стрелка – введение ИЛ-1 β . Светлые значки – эксперименты с введением физраствора, тёмные – введение диклофенака.

Полученные данные свидетельствуют о том, что действие диклофенака устраняло влияние ИЛ-1 β на экспираторно-облегчающий рефлекс.

Таким образом, респираторные эффекты, вызываемые повышением как системного, так и церебрального уровня ИЛ-1 β , не проявляются на фоне ингибирования циклооксигеназной активности, свидетельствуя о том, что в основе модулирующих влияний провоспалительных цитокинов на механорецепторный контроль дыхания лежит усиление синтеза простагландинов. Согласно полученным данным, при спокойном дыхании в нормальных условиях простагландины практически не участвуют в рефлекторных механизмах регуляции дыхания. Об этом

свидетельствует отсутствие значимых изменений в объемно-временных параметрах дыхания и силе дыхательных рефлексов при внутрибрюшинном введении только диклофенака. Однако роль простагландинов в регуляции функции дыхания значительно возрастает при увеличении экспрессии провоспалительных цитокинов, которое наблюдается при развитии системного воспалительного ответа. Полученные данные позволяют предполагать, что не только экспериментально вызванное, экзогенное увеличение уровня провоспалительных цитокинов, но и их эндогенная экспрессия, наблюдаемая в патологических условиях, также может оказывать модулирующее влияние на паттерн и рефлекторные механизмы регуляции дыхания посредством усиления синтеза простагландинов.

Результаты экспериментов с введением ИЛ-1 β при ингибировании NO-синтазной активности.

Влияние ИЛ-1 β на паттерн дыхания. В данной серии экспериментов введение ИЛ-1 β производилось через 10 минут после введения L-NAME. При этом было установлено, что динамика изменения объемно-временных параметров дыхания после введения ИЛ-1 β на фоне действия L-NAME соответствовала динамике, зарегистрированной в экспериментах с введением только ИЛ-1 β . Так, изменения ЧД начинались на 20-й минуте после введения ИЛ-1 β и на 40-й минуте достигали значений, которые были достоверно выше, чем фоновые. На 40-й минуте после введения ИЛ-1 β на фоне действия L-NAME наблюдалось также достоверное увеличение нормированной величины ДО и МОД. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что L-NAME не устраняет влияния ИЛ-1 β на объёмно-временные параметры дыхания.

Влияние ИЛ-1 β на силу рефлекса Геринга-Брейера. В результате исследования силы инспираторно-тормозящего рефлекса в экспериментах с внутривенным введением ИЛ-1 β на фоне действия L-NAME было установлено, что ИЛ-1 β не оказывал своего обычного влияния на силу инспираторно-тормозящего рефлекса, которое проявлялось в увеличении продолжительности первого постокклюзионного вдоха. В течение всего эксперимента, сила инспираторно-тормозящего рефлекса не отличалась от фоновых значений и была достоверно меньше чем в экспериментах с введением только ИЛ-1 β (рис. 5). Результаты контрольных экспериментов показали, что системное введение только L-NAME без последующего введения ИЛ-1 β не оказывает влияния на объёмно-

временные параметры дыхания и силу инспираторно-тормозящего рефлекса, поскольку их значения после введения этого вещества не отличаются от контрольных величин.

Таким образом, было установлено, что L-NAME устраняет потенцирующее влияние ИЛ-1 β на инспираторно-тормозящий рефлекс Геринга-Брейера. Полученные данные указывают на участие NO-ергических механизмов в путях проведения влияния ИЛ-1 β на рефлекторный контроль дыхания.

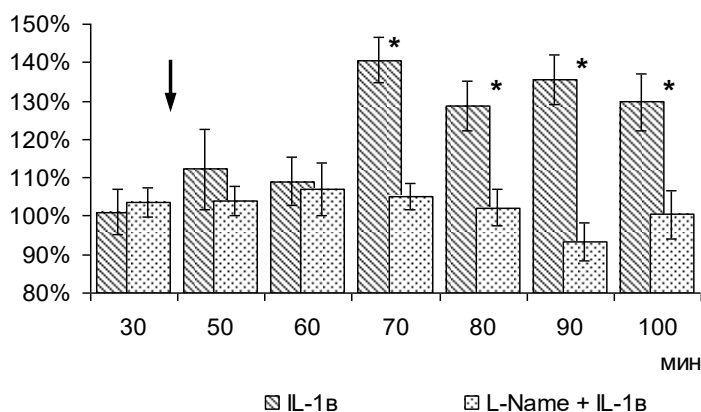


Рис.4. Влияние L-NAME на изменения силы ИТР вызванные ИЛ-1 β .

Показатель силы ИТР нормирован относительно его величины на 40-й минуте регистрации.

Стрелкой указан момент введения ИЛ-1 β , * - величины, достоверно отличающиеся от фоновых значений, а также величин, полученных в экспериментах с введением ИЛ-1 β на фоне действия L-NAME.

Влияние дизоцилпина (МК-801) на параметры внешнего дыхания.

Внутривенное введение 0,1 мкг МК-801, растворенного в 1 мл физиологического раствора, вызывает изменение объемно-временных параметров внешнего дыхания (Табл. 2). Через 1 минуту после введения препарата наблюдалось достоверное уменьшение ДО и ЧД соответственно на 17% и 16% по сравнению с фоновой величиной, что приводило к снижению МОД на 31%.

Таблица 2.

Влияние МК-801 на функциональные параметры дыхательной системы.

Параметр	Физиологический раствор		МК-801	
	Фон	Через 1 мин после введения	Фон	Через 1 мин после введения
ДО, мл	1,9 \pm 0,2	1,9 \pm 0,3	1,7 \pm 0,4	1,4 \pm 0,4*
ЧД, ц/мин	128 \pm 20	130 \pm 22	136 \pm 22	114 \pm 10*
МОД, мл/ мин	242 \pm 42	234 \pm 37	223 \pm 58	153 \pm 29*

* - достоверные изменения параметра по сравнению с фоном (p<0,05).

Таким образом, данная серия экспериментов показала, что МК-801 в использованной нами дозировке вызывает характерные изменения в состоянии респираторной системы анестезированной крысы, которые проявляются в снижении вентиляции легких вследствие уменьшения дыхательного объема и частоты дыхания.

В следующей серии экспериментов введение 0,1 мл МК-801 производилось до и через каждые 30 минут после введения ИЛ-1 β (рис. 5).

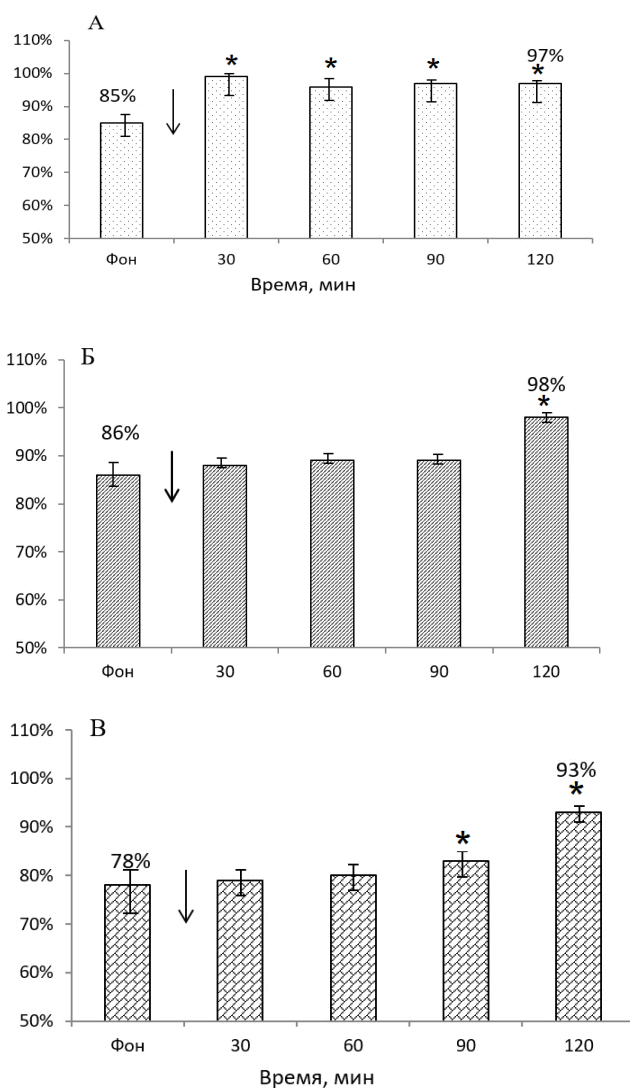


Рисунок. 5. Респираторные эффекты МК-801 до (фон) и после введения ИЛ-1 β
 А – изменение частоты дыхательных движений, Б – изменение дыхательного объема,
 В – изменение вентиляции.
 По оси абсцисс – время действия ИЛ-1 β . Стрелкой указан момент введения ИЛ-1 β . По
 оси ординат – величина параметра после введения МК-801. За 100% принята величина
 параметра непосредственно перед введением МК-801. * - $p < 0,05$

Такая схема эксперимента была обусловлена тем, что дискретное введение МК-801 оказывает быстрое кратковременное действие на параметры внешнего дыхания,

тогда как эффект ИЛ-1 β развивается медленно, приблизительно в течение часа. В процессе обработки полученных результатов определялась величина регистрируемого параметра непосредственно перед введением МК-801 и через 1 минуту после его введения. Также как и в предыдущей серии экспериментов величина параметра после введения МК-801 выражалась в процентах к величине того же параметра непосредственно перед введением МК-801.

Эксперименты показали, что по мере действия ИЛ-1 β влияние МК-801 на параметры внешнего дыхания значительно ослабевало и полностью исчезало через 120 минут (рис. 5). Полученный результат указывает на взаимодействие ИЛ-1 β с глутамат-ергической нейромедиаторной системой, посредством модуляции активности глутаматных рецепторов NMDA-типа.

Результаты исследования, проведенного с помощью неконкурентного антагониста глутаматных рецепторов NMDA-типа МК-801, указывают на то, что блокирование глутаматных рецепторов изменяет функциональное состояние системы внешнего дыхания. Это проявляется в быстром кратковременном уменьшении ДО, снижении ЧД и минутной вентиляции легких. Обнаруженные эффекты постепенно ослабевают и исчезают в том случае, если введение МК-801 производится на фоне действия ИЛ-1 β . Эти факты свидетельствуют о том, что ИЛ-1 β может оказывать влияние на состояние глутаматных рецепторов NMDA-типа. Вероятно, те изменения в активности респираторной системы, которые мы наблюдали при повышении системного уровня ИЛ-1 β , по крайней мере, отчасти объясняются влиянием этого цитокина на глутаматные рецепторы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования указывают на то, что повышение содержания основного провоспалительного цитокина ИЛ-1 β как в цереброспинальной жидкости, так и в плазме крови влияет на центральные механизмы регуляции паттерна дыхания и дыхательные рефлексы, обеспечивающие зависимость между глубиной и частотой дыхания и участвующие в механизме смены дыхательных фаз. Влияние провоспалительных цитокинов на центральные механизмы регуляции дыхания опосредовано активацией циклооксигеназных и NO-синтазных путей, регулирующих синтез простагландинов и оксида азота. Экспрессируясь в большом количестве клетками церебрального эндотелия при активации имеющихся здесь цитокиновых рецепторов, небольшие молекулы простагландинов и оксида азота легко проникают

через плазмолемму и гематоэнцефалический барьер, в результате чего повышение системного уровня ИЛ-1 β может модулировать активность респираторных нейронов мозгового ствола. Влияние провоспалительных цитокинов на состояние глутаматергических нейронов включенных в рефлекторные дуги, контролирующие кардиореспираторную функцию, может быть одной из причин кардиореспираторных дисфункций, наблюдающихся при системной воспалительной реакции.

ВЫВОДЫ

1. Повышение уровня провоспалительного цитокина ИЛ-1 β в плазме крови или в цереброспинальной жидкости, оказывает влияние на объемно-временные параметры дыхания, вызывая увеличение частоты дыхания, дыхательного объема и минутного объема дыхания.

2. Одновременно с изменением объемно-временных параметров дыхания наблюдается увеличение центральной инспираторной активности, а также электрической активности диафрагмы, что свидетельствует о влиянии ИЛ-1 β на центральные механизмы регуляции дыхания.

3. ИЛ-1 β участвует в механорецепторном контроле дыхания посредством усиления инспираторно-тормозящего и экспираторно-облегчающего рефлексов Геринга-Брейера.

4. Влияние ИЛ-1 β на рефлексы Геринга-Брейера не проявляются на фоне ингибирования циклооксигеназной или NO-синтазной активности, свидетельствуя о том, что в основе модулирующих влияний провоспалительных цитокинов на рефлекторный контроль дыхания лежит усиление синтеза простагландинов и оксида азота.

5. В отличие от циклооксигеназных путей NO-синтазные пути не участвуют во внутрицентральных механизмах регуляции паттерна дыхания, вовлекаясь в модуляцию влияний ИЛ-1 β только на рефлексы Геринга-Брейера.

6. Одним из медиаторных механизмов опосредующих влияния ИЛ-1 β на механорефлекторный контур регуляции дыхания является усиление глутаматергической передачи в дуге рефлекса Геринга-Брейера.

Список работ, опубликованных по теме диссертации
Публикации в изданиях рекомендованных ВАК РФ, входящих в базы
Scopus и Web of Science

1. Александрова Н.П., Меркурьев В.А., Данилова Г.А., Тюлина Е.В., Александров В.Г. Изменение объемно-временных параметров внешнего дыхания при экзогенном повышении церебрального уровня интерлейкина-1 β //Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. – 2009. - № 16. - С. 7-11.

2. Aleksandrov V., Mercuriev V., Ivanova T., Tarasievich A., Aleksandrova N. Cortical Control of Hering-Breuer Reflexes in Anesthetized Rats//European journal of medical research. - 2009. - Т. 14. - № S4. - С. 1-5.

3. Меркурьев В.А., Александрова Н.П., Александров В.Г. Участие провоспалительного цитокина ИЛ-1 β в модуляции паттерна дыхания//Ульяновский медико-биологический журнал. – 2013. - № 3. - С. 132-136.

4. Александрова Н.П., Меркурьев В.А., Александров В.Г. Влияние интерлейкина-1 β на паттерн дыхания и инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга-Брейра//Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология. - 2013. - № 29. - С. 9-17.

5. Aleksandrova N., Mercuriev V., Aleksandrov V. Role of IL-1 β in vagal mediated control of respiration //European Respiratory Journal. - 2014. - Т. 44. - № S58. - С. 4534.

6. Александров В.Г., Александрова Н.П., Туманова Т.С., Евсеева А.Д., Меркурьев В.А. Участие NOергических механизмов в реализации респираторных эффектов провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β //Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2015. - Т. 101. - № 12. - С. 1372-1384.

7. Александрова Н.П., Меркурьев В.А., Туманова Т.С., Александров В.Г. Механизм модуляции рефлекторного контроля дыхания при повышении системного уровня провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β //Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2015. - Т. 101. - № 10. - С. 1158-1168.

Работы, опубликованные в сборниках и материалах конференций.

1. Меркурьев В.А., Медведева О.В., Тарасевич А.А. Изменение паттерна дыхания анестезированной крысы под действием беталейкина//Материалы 12 Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей “Человек и его здоровье”. Санкт-Петербург, 18 апреля 2009г. “Фундаментальная наука и клиническая медицина”. РАН. - Санкт-Петербург, 18 апреля 2009г - С. 241-242.

2. Буй Тхи Хьонг, Меркурьев В.А., Тарасевич А.А. Влияние беталейкина на состояние объемно-зависимой обратной связи в системе дыхания//Материалы 12 Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей “Человек и его здоровье” Санкт-Петербург, 18 апреля 2009г. “Фундаментальная наука и клиническая медицина”. РАН- Санкт-Петербург, 18 апреля 2009 г. - С. 59.
3. Медведева О.В., Буй Тхи Хьонг, Меркурьев В.А. Изменение параметров внешнего дыхания под влиянием церебровентрикулярных микроинъекций беталейкина// Герценовские чтения: Материалы межвузовской конференции молодых ученых. - Санкт-Петербург, 30 марта – 2 апреля 2009 г. - Выпуск 9. - С. 92.
4. Меркурьев В.А., Медведева О.В., Тарасевич А.А. Влияние церебровентрикулярных микроинъекций беталейкина на активность респираторных мышц//Герценовские чтения: Материалы межвузовской конференции молодых ученых - Санкт-Петербург, 30 марта – 2 апреля 2009 г. - Выпуск 9. - С. 93.
5. Александров В.Г, Александрова Н.П., Меркурьев В.А., Тарасевич А.А. Влияние церебровентрикулярных микроинъекций беталейкина на параметры внешнего дыхания//Материалы VII Всероссийской конференции с международным участием, посвященная 160-летию со дня рождения И.П. Павлова “Механизмы Функционирования висцеральных систем” РАН. - Санкт-Петербург, 29 сентября–2 октября 2009 г. - С. 289.
6. Меркурьев В.А. Влияние интерлейкина-1 β на рефлекторные механизмы регуляции дыхания у крысы//Герценовские чтения: Материалы межвузовской конференции молодых ученых. - Санкт-Петербург, 30 марта – 4 апреля 2011 г. - Выпуск 11. - С. 94.
7. Меркурьев В.А. Влияние интерлейкина-1 β на работу диафрагмы//Материалы IV Всероссийской с международным участием конференции по управлению движением, приуроченной к 90-летнему юбилею кафедры физиологии ФГБОУ ВПО «РГУФКСМиТ» - ГЦОЛИФК. - Москва, 01-03 февраля 2012 г. – С.91.
8. Меркурьев В.А., Александрова Н.П. Участие провоспалительного цитокина ИЛ-1 β в механизмах регуляции активности дыхательных мышц. Новые подходы к изучению классических проблем//Материалы VII Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности. - Москва, 29 января-1 февраля 2013 г. - С. 113.
9. Александрова Н.П., Меркурьев В.А. Влияние провоспалительных цитокинов на паттерн дыхания и инспираторно-тормозящий рефлекс Геринга-Брейера//Труды IX

- Международного Междисциплинарного Конгресса “Наука для медицины и психологии”. - Судак, Крым, Украина, 3-13 июня 2013г. - С. 233.
10. Меркурьев В.А., Александрова Н.П. Влияние повышенного системного уровня цитокина ИЛ-1В на рефлекторные механизмы регуляции дыхания у крысы//XXII съезд Физиологического общества имени И.П. Павлова: Тезисы докладов.- Волгоград: ВолгГМУ, 2013 г. - С. 347.
 11. Александрова Н.П., Александров В.Г., Меркурьев В.А. Участие провоспалительного цитокина ИЛ-1β в механорецепторном контроле дыхания //Сб. статей «Актуальные проблемы физиологии, биофизики и медицины». Материалы Международной научной конференции, 4-5 октября 2013 г. – Алматы, 2013г. - С.51-55.
 12. Александрова Н.П., Александров В.Г., Меркурьев В.А. Роль простагландинов в реализации влияний провоспалительных цитокинов на сократительную активность дыхательных мышц //Управление движением (Motor Control 2014): Материалы V Российской, с международным участием, конференции по управлению движением. - Петрозаводск, 3-5 февраля 2014 г. - С.67.
 13. Меркурьев В.А. Влияние повышения системного уровня ИЛ-1Б на параметры внешнего дыхания и инспираторно-тормозящий рефлекс Геринга-Брейера// Материалы XIII Всероссийской молодежной научной конференции Института физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. - Сыктывкар, 2014 г. - С. 93-95.
 14. Меркурьев В.А. Влияние повышенного уровня ИЛ-1 на параметры внешнего дыхания и работу инспираторных мышц//Новые подходы к изучению классических проблем. Материалы VIII Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии мышц и мышечной деятельности. - Москва, 2-4 февраля 2015 г. - С. 102.
 15. Меркурьев В.А. Влияние провоспалительного цитокина ИЛ1β на рефлекторные механизмы дыхания //Труды XI Международного Междисциплинарного Конгресса “Наука для медицины и психологии”. - Судак, Крым, Россия, 6-12 июня 2015 г. - С. 276.
 16. Евсеева А.Д., Меркурьев В.А., Туманова Т. С., Александров В.Г. Участие нитрегических механизмов в реализации респираторных эффектов интерлейкина-1β//Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем: Материалы всероссийской конференции с международным

участием, посвященная 90-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. - Санкт-Петербург–Колтуши, 8–10 декабря 2015 г.- С.77-79.

17. Евсеева А.Д., Меркурьев В.А., Туманова Т. С., Александров В.Г. Простаноидзависимый механизм реализации респираторных эффектов интерлейкина-1 β //Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем: Материалы всероссийской конференции с международным участием, посвященная 90-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. - Санкт-Петербург–Колтуши, 8–10 декабря 2015 г. - С.197-198.
18. Меркурьев В.А. Изменение инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга-Брейера после повышения системного уровня ИЛ-1 β //Новые подходы к изучению классических проблем: материалы IX Всероссийской с международным участием конференции с элементами научной школы по физиологии мышц и мышечной деятельности, посвященной памяти Е.Е. Никольского. - Москва, 18-21 марта 2019 г. - С.130.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДО - дыхательный объем

МОД - минутный объем дыхания

ФОЕ – функциональная остаточная емкость

ХОБЛ - хроническая обструктивная болезнь легких

ЦИА - центральная инспираторная активность

ЦСЖ - церебро-спинальная жидкость

ЧД - частота дыхания

ЭМГ - электромиограмма

ИЛ - интерлейкин

L-NAME - N-нитро-L-аргинин метилэфир

NMDA - N-метил-D-аспартат

NO - оксид азота

PG - простагландин

V_{инс} - средняя скорость инспираторного потока