

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ
РАБОТЫ

**РОЛЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЦИТОКИНА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУЛИ –
АЛЬФА В ХЕМОРЕЦЕПТОРНЫХ МЕХАНИЗМАХ РЕГУЛЯЦИИ ДЫХАНИЯ**

Программа подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре
по направлению подготовки кадров высшей квалификации

06.06.0 1 Биологические науки

Специальность 03.03.0 1 – физиология

Аспирант: Клиникова Анна Андреевна

Научный руководитель: Александрова Нина Павловна, доктор биологических наук

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

Заведующий лабораторией: Александрова Нина Павловна, доктор биологических наук

Допустить к представлению научного доклада - _____ 2020г.

Санкт-Петербург 2020

Оглавление

1. Актуальность темы исследования.....	3
2. Цель и задачи исследования	4
3. Научная новизна	5
4. Теоретическая и практическая значимость.....	6
5. Объект и методы исследования.....	6
5.1 Объект исследования	6
5.2 Дизайн эксперимента. Способы введения физиологически активных веществ	7
5.3 Пневмотахографический метод регистрации объемно-временных параметров дыхания.....	7
5.4 Метод возвратного дыхания.....	7
5.5 Статистика.....	8
6. Основные результаты	8
6.1 Влияние ФНО- α на респираторные параметры при спокойном дыхании воздухом.....	8
6.2 Влияние ФНО- α на гипоксическую хеморецепцию.....	9
6.3 Влияние ФНО- α на паттерн дыхания на фоне ингибирования циклооксигеназной активности диклофенаком.....	11
6.4 Вентиляторный ответ на гипоксию при повышении системного уровня ФНО- α на фоне ингибирования циклооксигеназной активности	12
7. Заключение.....	14
8. Выводы.....	17
9. Апробация работы	17
10. Список публикаций по теме научно-квалификационной работы.....	18
Список литературы	21

1. Актуальность темы исследования.

Цитокины — это физиологически активные вещества, которые являются эндогенными медиаторами, синтезируемыми иммунокомпетентными клетками. В условиях нормальной жизнедеятельности организма цитокины образуются в различных органах и тканях в физиологических концентрациях. Ключевые провоспалительные цитокины, такие как ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10, играют пусковую роль в развитии локального воспаления на тканевом уровне (Ройт и др., 2000). Однако при резко выраженном локальном воспалении или несостоятельности механизмов, ограничивающих его течение, провоспалительные цитокины могут выходить за пределы местного очага воспаления, поступая в системную циркуляцию и определяя развитие системной воспалительной реакции. При этом содержание в крови провоспалительных цитокинов может в десятки и даже сотни раз превышать нормальные значения. Известно, что при различных видах воспаления, стрессе, в условиях гипоксии, при дыхании с добавочным сопротивлением, хронической обструктивной болезни легких, травмах головного мозга, инсультах и ишемии наблюдается значительный подъем церебрального и системного уровня провоспалительных цитокинов. При этих состояниях часто изменяется паттерн дыхания, уровень легочной вентиляции, развиваются патологические типы дыхания. Поступая в циркуляторное русло, цитокины приобретают качество медиаторов уже не только местного, но и системного воспаления, проявляя гормоноподобную активность и действуя на клетки-мишени, находящиеся в отдалении от того места, где в данный момент экспрессируются цитокины. В настоящее время установлено, что цитокины играют важную роль в нейроиммунных взаимодействиях, участвуя в межклеточной коммуникации в качестве нейромодуляторов, оказывающих прямое или опосредованное действие на клетки центральной нервной системы (Мюльберг, Гришина, 2006). Это дает основание предполагать участие цитокинов в центральной регуляции различных физиологических функций, в том числе и функции дыхания.

В работах нашей лаборатории было показано, что увеличение церебрального уровня ИЛ-1 β влияет на паттерн дыхания, усиливает инспираторно-тормозящий рефлекс Геринга-Брейера, изменяет вентиляторный ответ на гиперкапнию и гипоксию (Aleksandrova, Danilova, 2010; Aleksandrova et al, 2014). Эти данные прямо указывают на участие ИЛ-1 β в рефлекторных механизмах регуляции дыхания, которое реализуется посредством влияния на нейроны, входящие в состав соответствующих нервных центров и рефлекторных дуг. Установлено, что ингибирование циклооксигеназных путей блокирующее синтез простагландинов устраняет влияние повышенного церебрального

уровня ИЛ-1 β на центральные механизмы, участвующие в реализации дыхательных хеморефлексов (Aleksandrova et al., 2015, 2017).

Кроме того, исследования последних лет показали, что провоспалительные цитокины могут модулировать механизмы регуляции системы внешнего дыхания не только на центральном, но и на периферическом уровне. Установлено, что ИЛ-1 β , ФНО- α и их рецепторы экспрессируются в гломусных клетках каротидных телец, выполняющих хеморецепторную функцию в регуляции дыхания (Wang et al., 2006; Zhang et al., 2007; Fernandez et al., 2011). Было обнаружено, что экзогенное введение ФНО- α стимулирует гломусные клетки и увеличивает частоту разрядов нерва, иннервирующего каротидное тело. В то же время наблюдается снижение хемочувствительности каротидного тела (Shu et al., 2007; Fernandez et al., 2008; Gauda et al., 2013). Эти данные позволяют предполагать, что повышение не только центрального, но и системного уровня провоспалительных цитокинов может оказывать модулирующее влияние на гипоксический хеморефлекс и изменять вентиляторный ответ на гипоксию.

На сегодняшний день вопрос о механизмах, посредством которых чрезмерная продукция провоспалительных цитокинов, происходящая при системном воспалении, становится патологическим фактором и может вызвать дисфункцию респираторной системы остается малоизученным. В связи с этим перспективным является исследование возможных последствий повышения уровня провоспалительных цитокинов в кровеносном русле и механизмов их влияния на функцию дыхания. При этом наиболее приоритетным направлением является изучение роли цитокинов в хеморефлекторных механизмах регуляции дыхания, так как они лежат в основе формирования адаптивных реакций дыхательной системы на изменение газового состава крови, необходимых для поддержания постоянства внутренней среды организма.

2. Цель и задачи исследования.

Целью работы явилось изучение влияния повышенного системного уровня провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли – альфа (ФНО- α) на параметры внешнего дыхания и гипоксическую хеморецепцию анестезированных крыс.

Задачи исследования:

1. Изучение влияния экзогенного повышения содержания ФНО- α в кровеносной системе на параметры внешнего дыхания: частоту дыхания, дыхательный объем, минутную вентиляцию легких, среднюю скорость инспираторного потока.

2. Выяснение возможности модуляции вентиляторной чувствительности к гипоксии при повышенном системном уровне ФНО- α .

3. Проведение ингибиторного анализа с целью выяснения роли циклооксигеназных

путей в реализации респираторных влияний ФНО- α .

3. Научная новизна.

Данная работа относится к новому направлению исследований в области физиологии дыхания – изучению нейроиммунных механизмов регуляции респираторной системы. Проведенное исследование доказывает возможность развития дисфункции рефлекторных механизмов регуляции дыхания в условиях гиперцитокинемии. В настоящее время в литературе можно обнаружить только косвенные данные, позволяющие сделать такое предположение.

В работе впервые получены прямые экспериментальные данные доказывающие, что повышение системного уровня ФНО- α оказывает влияние не только на параметры внешнего дыхания и вентиляцию легких, но и на хеморефлекторные механизмы регуляции дыхания. Впервые установлено, что внутривенное введение ФНО- α вызывает уменьшение вентиляционного ответа на гипоксические изменения в газовом составе крови. Этот факт позволяет утверждать, что повышение системного уровня провоспалительных цитокинов ослабляет компенсаторные возможности системы внешнего дыхания. Получены новые данные, указывающие на роль циклооксигеназных путей в реализации респираторных эффектов основного провоспалительного цитокина ФНО- α , что позволяет сделать вывод об участии простагландинов в нейроиммунных механизмах регуляции дыхания.

4. Теоретическое и практическое значение работы.

Исследование механизмов, посредством которых осуществляется действие провоспалительных цитокинов, медиаторов иммунной системы, на физиологические функции является одной из фундаментальных задач современной физиологии. Представленное направление исследований позволяет оценить место и значение цитокиновой системы (наряду с нервной и гормональной) в регуляции одной из важнейших вегетативных функций – функции дыхания. Изучение нейроиммунных механизмов регуляции кардиореспираторной функции открывает новые перспективы в исследованиях патогенеза системной воспалительной реакции, хронической обструктивной болезни легких, в выявлении механизмов внезапной остановки дыхания у недоношенных младенцев с инфекционными заболеваниями, сопровождающимися увеличенной продукцией провоспалительных цитокинов.

Полученные экспериментальные данные могут быть полезны в разработке антицитокиновой терапии системного воспаления. Кроме того, учитывая то, что цитокины на сегодняшний день все больше внедряются в состав новых лекарственных препаратов –

иммуномодуляторов, результаты настоящего исследования помогают выявить возможные побочные респираторные эффекты, возникающие при применении этих препаратов.

5. Объект и методы исследования.

5.1 Объект исследования

Эксперименты выполнены на 48 крысах-самцах с трахеостомией массой 280 ± 10 г. Крыс содержали в клетках (4 животных в клетке) в помещении с регулируемой температурой (22 ± 2 °С) с циклом 12 ч света / 12 ч темноты, доступом к пище и воде ad libitum. Животных анестезировали внутрибрюшинным введением уретана в дозе 1400 мг / кг, до уровня, достаточного для устранения болевых рефлексов. Глубину анестезии контролировали по сохранению роговичного рефлекса и реакции на тактильные раздражители. Ректальную температуру измеряли на протяжении всего эксперимента и поддерживали на уровне около 37 °С.

Все процедуры с животными проводились в соответствии с этическими принципами Директивы Совета Европейского сообщества 86/609 / ЕЕС, а также были рассмотрены и одобрены комитетом по уходу за животными Института физиологии им. Павлова РАН.

5.2 Дизайн эксперимента. Способы введения физиологически активных веществ.

Экспериментальные животные были разделены на 4 группы. Животным первой группы ($n = 8$) вводили ФНО- α (40 мг / кг, Sigma) в хвостовую вену. Животным второй группы ($n = 8$) за 20 минут до введения ФНО- α внутрибрюшинно вводился диклофенак, неспецифический ингибитор циклооксигеназы (0,5 г, РУП «Белмедпрепараты», Россия). Третья и четвертая группы животных являлись контрольными. Третья группа ($n = 8$) использовалась для выявления возможного самостоятельного действия ингибитора на паттерн дыхания и гипоксический респираторный ответ; этой группе вводился только диклофенак внутрибрюшинно. Четвертой группе животных ($n = 8$) вводилось 0,25 мл физиологического раствора внутривенно.

Эксперимент длился 120 минут. На тридцатой минуте внутривенно вводился ФНО- α или физиологический раствор. В группе с введением ингибитора за 20 минут до введения ФНО- α , то есть на десятой минуте эксперимента. производилось внутрибрюшинное введение диклофенака. Гипоксический респираторный ответ измеряли до введения препаратов и через 20, 40, 60 и 90 мин после их введения (рис. 1).

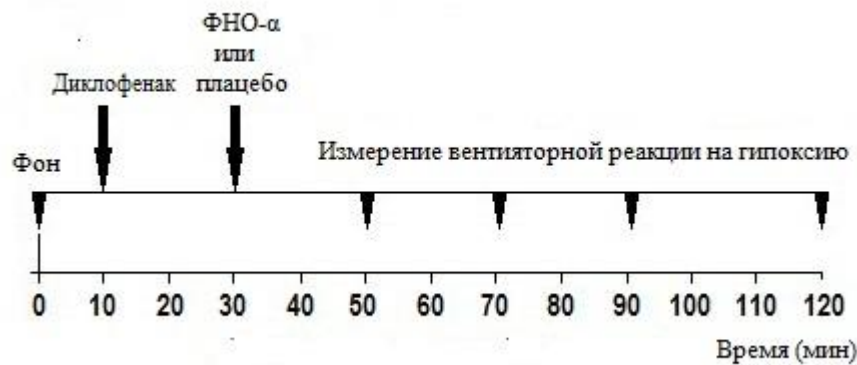


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

По оси абсцисс – продолжительность эксперимента в минутах. Стрелки - моменты измерения вентиляторного ответа на гипоксию.

5.3 Пневмотахографический метод регистрации объемно-временных параметров дыхания.

При помощи пневмотахографического метода регистрировались объемно-временные параметры дыхания. Пневмометрическая трубка для работы с мелкими животными MLT-1L (ADInstruments, Данидин, Новая Зеландия) присоединялась к трахеостомической канюле и пневмотахографу (спирометр ML141; ADInstruments, Данидин, Новая Зеландия), который использовался для измерения объемной скорости инспираторного потока и частоты дыхания. По пневмотахографической кривой рассчитывалась частота дыхания (ЧД). Для определения дыхательного объема (ДО) производилось интегрирование пневмотахографической кривой. Значение минутного объема дыхания (МОД) было рассчитано на основе произведения среднего дыхательного объема и частоты дыхания, за 10 дыхательных циклов. Среднюю скорость инспираторного потока ($V_{инс}$) рассчитывали, как частное от деления величины дыхательного объема на длительность вдоха. Парциальное давление кислорода в конечной порции выдыхаемого газа ($P_{ЕТO_2}$) измеряли с помощью газового анализатора Gemini (США).

5.4 Метод возвратного дыхания.

Вентиляционный ответ на гипоксическую стимуляцию измеряли при помощи метода возвратного дыхания. Возвратное дыхание изокапнически-гипоксической газовой смесью (5% CO_2 , 15% O_2 в азоте) проводили по методу Рида (Read, 1967) с модификациями для мелких лабораторных животных. Животные дышали из мешка с газовой смесью. Выдох производился в этот же мешок через фильтр, поглощающий углекислый газ. В результате по мере дыхания происходило постепенное снижение содержания кислорода в дыхательной смеси, тогда как концентрация CO_2 не изменялась.

Продолжительность тестирования возвратным дыханием не превышала 4 минут. При этом производилась параллельная регистрация параметров внешнего дыхания и парциального давления O_2 в конечной порции выдыхаемого газа. Оценку вентиляционной чувствительности во время проведения теста с возвратным дыханием проводили в диапазоне снижения парциального давления кислорода в альвеолярном газе от $80,0 \pm 3,0$ до $40,0 \pm 2,0$ мм рт.ст., учитывая, что в данном диапазоне зависимость прироста легочной вентиляции от степени нарастания гипоксического стимула является практически линейной.

Оценка вентиляционной реакции на гипоксическую стимуляцию осуществлялась двумя способами. Во-первых, с использованием программных средств производилось графическое построение линий тренда, отражающих зависимости величины вентиляционных параметров от интенсивности гипоксического стимула. Во-вторых, рассчитывалась величина прироста минутного объема дыхания и его составляющих при снижении парциального давления кислорода в альвеолярном газе на 1 мм рт. ст.

Тестирования производились до введения исследуемого вещества и после его введения через каждые 20 минут.

5.5 Статистика.

Все значения представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Для проверки нормальности распределения данных применялись критерии Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Уровень значимости был $p \geq 0,2$, что указывает на нормальность распределения данных. Значения до и после инъекций оценивались с помощью парного теста Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) для повторных измерений. Был проведен односторонний дисперсионный анализ с последующим тестом Бонферрони. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Для статистической обработки экспериментальных данных использовался пакет программ STATISTICA 7.0.

6. Результаты их обсуждение

6.1 Влияние ФНО- α на респираторные параметры при спокойном дыхании воздухом.

Внутривенное введение ФНО- α в хвостовую вену вызывало достоверное увеличение минутного объема дыхания, дыхательного объема, средней скорости инспираторного потока. Также наблюдалась тенденция к увеличению частоты дыхания под действием ФНО- α . Статистически значимые изменения в параметрах дыхания отмечались через 15 - 20 минут после введения препарата, достигая максимальных значений на 40 минуте. Через 40 минут после внутривенного введения цитокина частота дыхания превышала фоновые значения в среднем на 3%, что не было статистически

значимым. Величина дыхательного объема достоверно возросла на 18% через 40 минут действия ФНО- α и на 27% через 60 минут. Вследствие роста глубины дыхания и небольшого увеличения частоты происходило достоверное увеличение минутной вентиляции легких в среднем на 44%. Средняя скорость инспираторного потока, отражающая величину центральной инспираторной активности, возросла на 28%. Внутривенное введение физиологического раствора не оказывало влияние на параметры внешнего дыхания (Табл. 1).

Таблица 1.

Изменение параметров дыхания при повышении системного уровня ФНО- α .

Параметр	ФНО- α (n = 7)			Физиологический раствор (n = 8)		
	фон	40 мин	60 мин	фон	40 мин	60 мин
МОД (мл мин ⁻¹)	119 ± 15,6	172 ± 13,8*	179 ± 14,2*	100 ± 5,2	97 ± 4,0	96 ± 9,5
ДО (мл)	1,1 ± 0,07	1,3 ± 0,06*	1,4 ± 0,07*	1,0 ± 0,02	0,9 ± 0,05	1,0 ± 0,08
ЧД (цикл мин ⁻¹)	111 ± 5,0	114 ± 5,0	119 ± 6,0	107 ± 2,0	105 ± 4,0	105 ± 2,6
Винс (мл с ⁻¹)	4,2 ± 0,37	5,4 ± 0,46*	5,8 ± 0,52*	3,8 ± 0,29	3,9 ± 0,17	3,9 ± 0,15

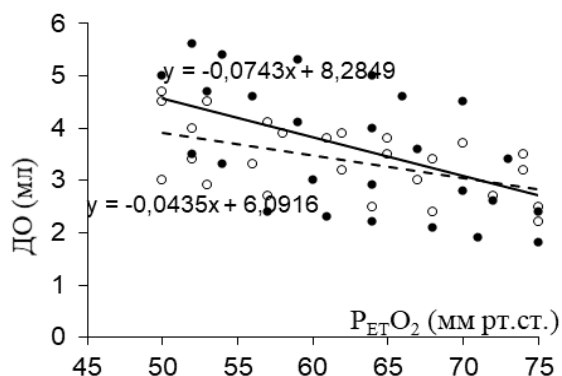
Примечание: * - P<0.05 по сравнению с исходными данными.

6.2 Влияние ФНО- α на гипоксическую хеморецепцию.

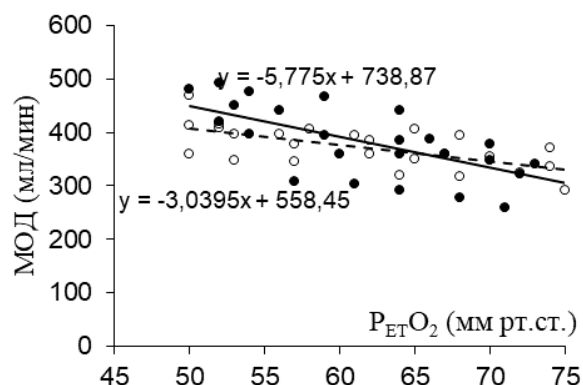
Гипоксический дыхательный хеморефлекс является важным элементом контроля дыхания. Этот рефлекс поддерживает гомеостаз газов в артериальной крови.

Внутривенное введение фактора некроза опухоли- α ослабляло вентиляционный ответ на гипоксию. Как и следовало ожидать, при возвратном дыхании гипоксической газовой смесью происходило увеличение ДО, МОД и средней скорости инспираторного потока, как до введения вещества, так и после его введения. Однако, после введения ФНО- α угол наклона линий тренда, отражающих зависимость регистрируемого параметра от величины гипоксического стимула достоверно уменьшался. Линии тренда становились более пологими, что свидетельствует о снижении вентиляционной чувствительности к гипоксии. (Рис. 2) Отмеченный респираторный эффект ФНО- α отчетливо проявлялся через 20 минут действия вещества, через 40 минут был выражен максимально и снижался через 90 минут после введения цитокина.

А



Б



В

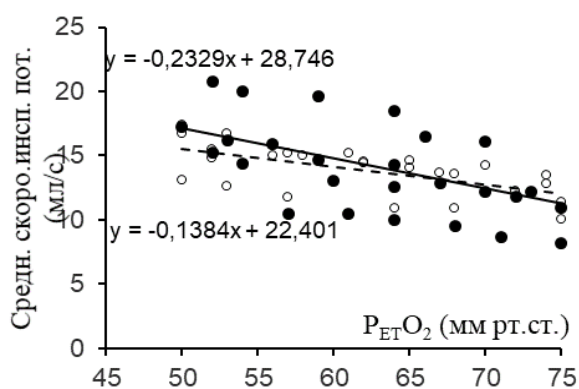


Рис.2 Зависимость параметров дыхания от величины гипоксического стимула до (сплошная линия) и через 40 минут после (прерывистая линия) внутривенного введения ФНО- α . А – дыхательный объем, Б – минутный объем дыхания, В – средняя скорость инспираторного потока.

Проведение количественных расчетов показало снижение величины прироста минутного объема дыхания и его составляющих в ответ на гипоксический стимул после внутривенного введения ФНО- α . Отмечалось достоверное снижение величины прироста МОД, ДО и средней скорости инспираторного потока на фоне действия ФНО- α . Установлено, что максимальный эффект проявлялся через 40 минут после внутривенного введения цитокина. При этом прирост ДО при увеличении $P_{ET}CO_2$ на 1 мм рт. ст. через 40 минут действия ФНО- α снижался на 27%, прирост МОД – на 40% и средней скорости инспираторного потока на 27% по сравнению с фоновыми величинами (рис. 3).

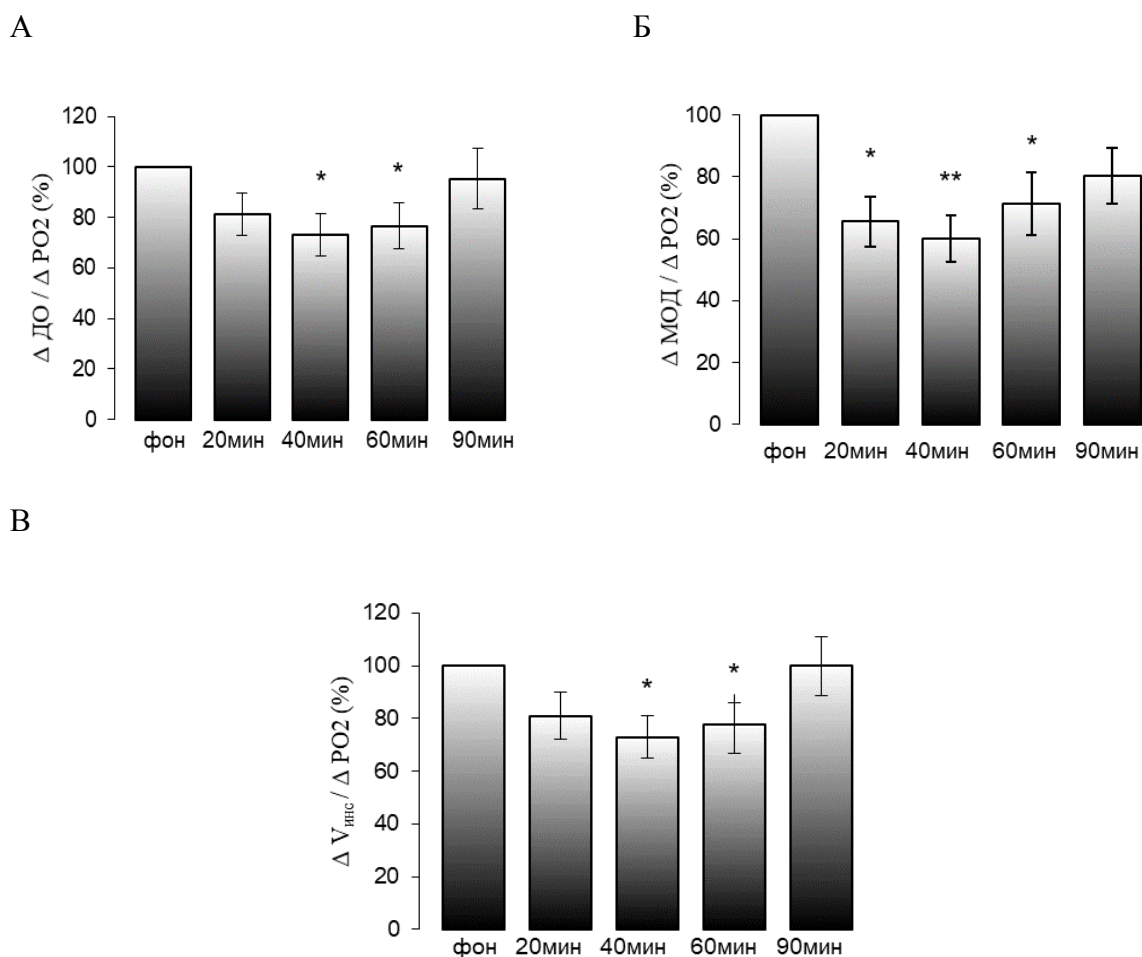


Рис. 3. Динамика изменений нормированных величин прироста (А – дыхательного объема, Б – минутного объема дыхания, В – средней скорости инспираторного потока) при гипоксической стимуляции на фоне повышения системного уровня ФНО-α. По оси абсцисс: период времени, прошедший после начала введения ФНО-α. По оси ординат: величина прироста параметров дыхания при снижении РО₂ на 1 мм рт. ст., выраженная в процентах к фону. За 100% принята величина прироста параметров до введения ФНО-α. * - достоверные отличия от фона при p<0,05, ** - достоверные отличия от фона при p<0,01.

В контрольных экспериментах с внутривенным введением физиологического раствора (плацебо) не было обнаружено снижения угла наклона линий тренда и величины прироста регистрируемых параметров при гипоксической стимуляции.

6.3 Влияние ФНО-α на паттерн дыхания на фоне ингибирования циклооксигеназной активности диклофенаком.

Внутривенное введение ФНО-α при спокойном дыхании вызывало достоверное увеличение минутного объема дыхания, дыхательного объема, средней скорости инспираторного потока, в то время как при введении ФНО-α на фоне действия диклофенака не отмечалось статистически значимых изменений в параметрах дыхания. (рис. 4.) Интраперитонеальное введение диклофенака без последующего введения ФНО-α

не вызывало изменения параметров дыхания, что свидетельствует об отсутствии собственного респираторного эффекта диклофенака.

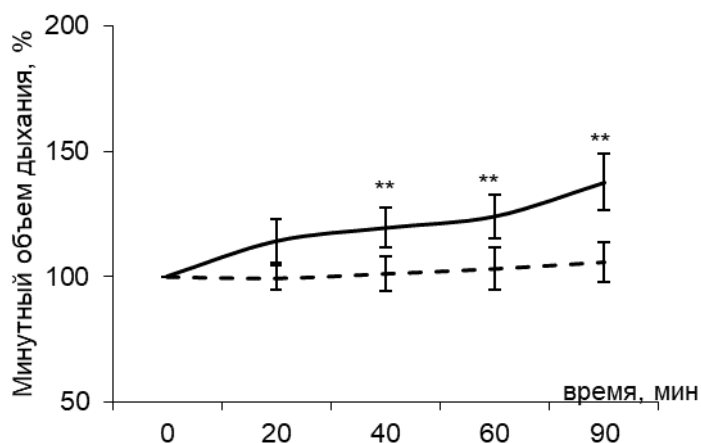


Рис. 4. Влияние диклофенака на минутный объем дыхания при повышении системного уровня ФНО-α.

По оси абсцисс: период времени, прошедший после начала введения веществ. По оси ординат: минутный объем дыхания (%). Сплошная линия при системном введении ФНО-α; пунктирная линия при системном введении ФНО-α на фоне действия диклофенака. ** - достоверные отличия от фона при $P < 0.01$.

6.4 Вентиляторный ответ на гипоксию при повышении системного уровня ФНО-α на фоне ингибирования циклооксигеназной активности.

При внутривенном введении ФНО-α на фоне действия диклофенака не удалось выявить характерного для действия ФНО-α достоверного уменьшения в приростах МОД, ДО и средней скорости инспираторного потока в ответ на гипоксическую стимуляцию. Прирост средней скорости инспираторного потока, отражающей величину центральной инспираторной активности, не снижался ниже фоновых величин на протяжении всего эксперимента. Отмечалась незначительная тенденция к снижению прироста ДО начиная с 40 минуты, однако это снижение не было статистически достоверным и не превышало 10%, тогда как в отсутствие диклофенака внутривенное введение ФНО-α вызывало достоверное снижение прироста этих параметров на 40-й минуте действия почти в два раза (рис. 5, 6).

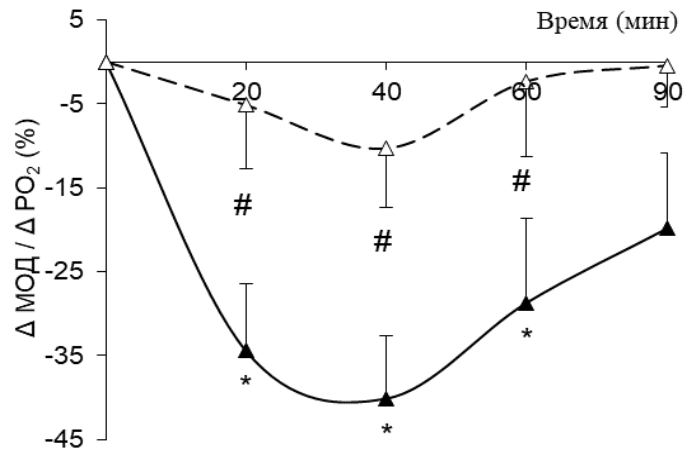


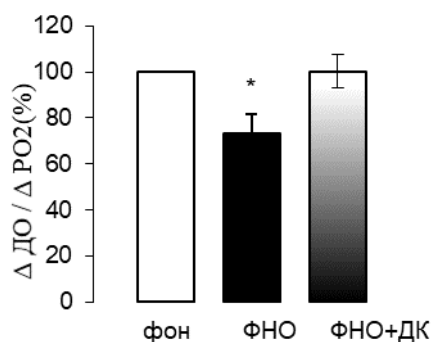
Рис. 5. Вентиляционный ответ на гипоксию после внутривенного введения ФНО- α на протяжении всего эксперимента до (сплошная линия) и после (пунктирная линия) предварительного введения диклофенака.

* - достоверные отличия от фона при $P < 0.05$. # - достоверные отличия от между двумя сериями экспериментов ($P < 0.05$) Символы представляют средние значения \pm SEM

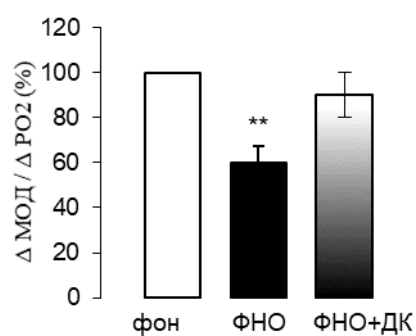
Для исключения влияния диклофенака на гипоксическую хеморецепцию были проведены пробы с возвратным дыханием на фоне действия этого ингибитора, без последующего введения цитокина. Было установлено, что интраперитонеальная инъекция диклофенака не вызывала изменения вентиляторного ответа на гипоксию у крыс.

Полученные данные свидетельствуют об ослаблении влияния ФНО- α на вентиляторную чувствительность к гипоксии на фоне действия диклофенака. Таким образом, повышение системного уровня ФНО- α в сочетании с ингибированием циклооксигеназной активности не оказывает влияния на вентиляторную чувствительность к гипоксии.

А



Б



В

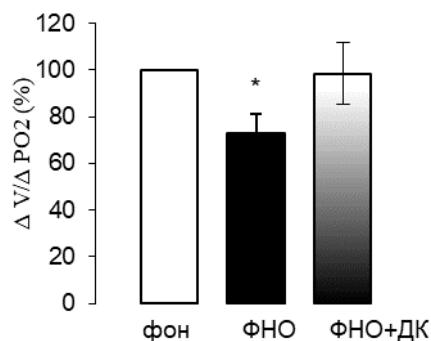


Рис. 6. Устранение ингибирующего влияния ФНО- α на вентиляторный гипоксический ответ при действии диклофенака. По оси ординат: прирост дыхательного объема (А), минутного объема дыхания (Б), инспираторного потока (В), при гипоксической стимуляции на 40 минуте после введения ФНО- α . Белые столбики-фоновое значение, черные столбики-действие ФНО- α , черно-белые столбики-сочетанное действие диклофенака и ФНО- α .* - достоверные отличия от фона при $P \leq 0.05$.** - достоверные отличия от фона при $P < 0.01$.

7. Заключение

В представленном исследовании на примере основного провоспалительного цитокина ФНО- α было показано, что провоспалительные цитокины усиливают вентиляцию легких, в тоже время снижая респираторную чувствительность к гипоксии. Кроме того, было установлено, что респираторные эффекты воспалительных цитокинов могут опосредоваться активацией циклооксигеназных путей.

Внутривенное введение ФНО- α увеличивало минутную вентиляцию, дыхательный объем и среднюю скорость инспираторного потока при спокойном дыхании воздухом. Эти данные соответствуют результатам, полученным при внутривенном введении эндотоксинов, которые приводят к высвобождению воспалительных цитокинов (ИЛ-1 β ,

ИЛ-6 и ФНО- α). Показано, что при этом наблюдается усиление вентиляции легких (Preas et al., 2001). Мы полагаем, что цитокины влияют на центральный механизм регуляции паттерна дыхания, что подтверждается, проведенными ранее исследованиями (Graff G.R., Gozal D., 1999). Ранее в исследованиях нашей лаборатории также было обнаружено, что экзогенное повышение церебрального уровня ИЛ-1 β способствует значительному усилению вентиляции легких при дыхании воздухом. В то же время ИЛ-1 β ослаблял чувствительность дыхательной системы к гиперкапнии и гипоксии. (Александрова и др., 2015, 2017). Представленные результаты показывают, что системное введение ФНО- α оказывает такие же респираторные эффекты.

В настоящее время имеются данные о роли воспалительных цитокинов в физиологии и пластичности каротидного тела. Было обнаружено, что циркулирующие цитокины могут влиять на артериальные хеморецепторы (Porzionato et al., 2013). Как известно, каротидные тела сонных артерий выполняют хеморецепторную функцию, контролируя постоянство O_2 , CO_2 и pH в артериальной крови и интерстициальной жидкости. Гломусные клетки каротидных тел являются хеморецепторами, которые передают информацию в дыхательный центр. Эти клетки могут экспрессировать медиаторы, способные воздействовать на нервные окончания. Экспрессия медиаторов усиливается в ответ на гипоксию, гиперкапнию и ацидоз. Заметное увеличение экспрессии, как воспалительных цитокинов, так и их рецепторов было обнаружено в каротидном теле крысы при хронической гипоксии (Lam et al., 2008; Gauda et al., 2013). Было показано, что системное воспаление, а также хроническая стойкая гипоксия вызывают морфологические изменения каротидного тела. Эти изменения связаны с повышением уровня провоспалительных цитокинов и приводят к снижению гипоксической хемочувствительности. Было обнаружено, что каротидное тело постоянно экспрессирует рецепторы ФНО- α TNF-R1 и TNF-R2. ФНО- α может распознаваться мембранными рецепторами, расположенными в гломусных клетках, а также может способствовать выделению гломусными клетками тормозного медиатора дофамина (Fernandez et al., 2008; Zapata et al., 2011). В экспериментах, проведенных *in vitro* установлено, что в каротидном теле ФНО- α может увеличивать базальную частоту хемосенсорных разрядов нерва, иннервирующего сонную артерию, а также уменьшать хемосенсорные разряды, вызванные гипоксией (Fernandez et al., 2008). В нашей работе, в экспериментах *in vivo*, было показано, что внутривенная инъекция ФНО- α увеличивает минутную вентиляцию легких при спокойном дыхании воздухом, и в то же время снижает чувствительность респираторной системы к гипоксии. Основываясь на представленных выше литературных данных можно предположить, что обнаруженные нами

респираторные эффекты ФНО- α , могут быть связаны с тем, что повышение уровня ФНО- α в циркулирующей крови изменяет хемосенсорную активность каротидного тела.

Однако провоспалительные цитокины могут влиять не только на артериальные хеморецепторы, но и на активность дыхательных нейронов ствола головного мозга (Wang et al., 2002; Zhang et al., 2007; Lin et al., 2011; Zapata et al., 2011). Ранее в нашей лаборатории было продемонстрировано снижение респираторной чувствительности к гиперкапнии и гипоксии после экзогенного повышения церебрального уровня ИЛ-1 β у анестезированных крыс (Александрова и др., 2015, 2017). Экспрессия цитокинов и их рецепторов была обнаружена в большинстве областей мозга, включая ядро солитарного тракта, где расположена дорсальная группа респираторных нейронов (Dantzer et al., 2000; Gordon, 2000; Maier et al., 1998). Известно, что ФНО- α стимулирует экспрессию *c-fos* в ядре солитарного тракта (Nadeau et al., 1999), т.е. активирует нейроны ствола мозга, участвующие в контроле дыхания.

Известно, что цитокины представляют собой крупные молекулы, которые не обладают способностью перемещаться через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Однако благодаря специфическим механизмам транспорта из плазмы в спинномозговую жидкость (Banks et al., 1995) цитокины могут попадать в ЦНС и напрямую влиять на нейроны. Кроме того, проникновение периферических цитокинов из крови в ЦНС возможно через циркумвентрикулярные области мозга, в которых отсутствует ГЭБ. Было показано, также что ГЭБ отсутствует в каудально-медиальной области ядра солитарного тракта. Капилляры этой области сильно фенестрированы, что делает возможным проникновение цитокинов из крови в периваскулярное пространство, и взаимодействие их с респираторными нейронами (Gross et al., 1990). Кроме того, увеличение проницаемости ГЭБ происходит в ответ на повышение уровня циркулирующих воспалительных цитокинов таких (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6), что делает возможным их проникновение в ЦНС.

В основе центральных эффектов цитокинов могут быть механизмы, не требующие транспорта через ГЭБ. Предполагается, что один из этих механизмов связан с индукцией вторичных посредников, продукция которых является результатом взаимодействия между цитокинами и рецепторами в сосудах головного мозга (Ericsson et al., 1995). Одними из этих посредников могут быть простагландины (PG). Периваскулярные клетки и клетки церебрального эпителия в больших количествах экспрессируют простагландины после воздействия цитокинов (Nadeau et al., 1999; Wong et al., 1995). Будучи небольшими растворимыми молекулами, PG легко проникают через клеточные мембраны и ГЭБ. Посредством этих молекул цитокины могут влиять на функции даже тех нейронов, которые не имеют рецепторов цитокинов. Рецепторы PGE₂, такие как EP₃R,

экспрессируются в областях ствола мозга, регулирующих дыхание (Ek et al., 2000; Nakamura et al. 2000). Эти данные соответствуют результатам нашего исследования и подтверждают гипотезу о том, что простагландины могут участвовать в респираторных эффектах ФНО- α .

Синтез простагландинов в организме осуществляется под действием циклооксигеназы (ЦОГ). В данном исследовании мы показали, что ингибирование ЦОГ в значительной степени снижает влияние ФНО- α на паттерн дыхания и гипоксический респираторный ответ. Синтез простагландинов может быть одним из основных механизмов воздействия цитокинов на функции нейронов. Простагландины также могут опосредовать действие воспалительных цитокинов на периферическую хеморецепцию, участвуя в модуляции активности каротидного тела. Известно, что гломусные клетки экспрессируют PGE2 и цитокины воспаления (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α) с соответствующими рецепторами. Проведенный нами ингибиторный анализ респираторных эффектов ФНО- α подтверждает участие простагландинов в реализации их эффектов. Влияние ФНО- α на паттерн дыхания и на вентиляторный гипоксический ответ почти полностью исчезают на фоне действия диклофенака, ингибирующего активность циклооксигеназы, фермента необходимого для синтеза простагландинов.

8. Выводы

1. Экзогенное повышение системного уровня провоспалительного цитокина ФНО- α вызывает увеличение вентиляции легких, связанное с усилением центральной инспираторной активности и ростом дыхательного объема.

2. Оказывая активирующее влияние на базовые параметры дыхания, ФНО- α в тоже время снижает вентиляторную чувствительность к гипоксии, ухудшая тем самым компенсаторные возможности системы внешнего дыхания.

3. Повышение системного уровня ФНО- α на фоне ингибирования циклооксигеназной активности диклофенаком не оказывает влияния на вентиляторную чувствительность к гипоксии, свидетельствуя о том, что в основе модулирующих влияний провоспалительных цитокинов на хеморецепторные механизмы регуляции дыхания лежит усиление синтеза простагландинов.

9. Апробация работы.

Результаты работы были представлены на XVIII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2016 г); III Всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2016 г); XIII Всероссийской Школе-семинаре «Экспериментальная и

клиническая физиология дыхания» (Санкт-Петербург 2016г); Форуме, посвященном 100-летию Физиологического общества им. И. П. Павлова. (Санкт-Петербург, 2017 г); XX Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина-человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2017 г); XXIII съезде Физиологического общества им. И. П. Павлова (Воронеж, 2017 г); XX конкурсе бизнес-идей, научно-технических разработок и научно-исследовательских проектов «Молодые, дерзкие, перспективные» (Санкт-Петербург, 2017 г); XXIV Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины. (Санкт-Петербург, 2018 г); XIV международном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2018 г); Всероссийской молодежной конференции «Современные аспекты интегративной физиологии» (Санкт-Петербург, 2018 г); XXI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2018 г); Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2018» (Москва, 2018); 8th International congress of pathophysiology. (Братислава, Словакия, 2018 г); ERS International Congress (Paris, France, 2018 г.); XXV Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, 2019 г); XV международном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 2019 г), XXII Международной медико-биологической конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2019 г); Международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2019» (Москва, 2019 г); 7-м Международном Симпозиуме «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (Санкт-Петербург, 2019г); ERS International Congress (Madrid, Spain, 2019 г); XIX Всероссийской Школе-семинаре «Экспериментальная и клиническая физиология дыхания» (Санкт-Петербург, 2019); XXVI Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы биомедицины» (онлайн, 2020 г); ERS International Congress (online, 2020 г).

10. Список публикаций по теме научно-квалификационной работы.

По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них: 6 публикаций в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 4 публикации в журналах, входящих в базы WoS и Scopus.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Клиникова А.А., Данилова Г. А., Александрова Н.П. Изменение вентиляторного ответа на гиперкапнию в условиях липополисахаридной модели системного воспаления. Ульяновский медико-биологический журнал. 2016. Выпуск № 4. С 70-75. Статья, РИНЦ, ВАК.

2. Клиникова А.А., Данилова Г. А., Александрова Н.П. Влияние системного воспаления на вентиляцию легких и гиперкапническую хеморецепцию. Ульяновский медико-биологический журнал. 2016. Выпуск № 4. Приложение. С 38-39. Статья, РИНЦ, ВАК.
3. Клиникова А.А., Данилова Г.А. Влияние липополисахарида на вентиляторный ответ при гиперкапнии. Медицинский академический журнал. 2016. Выпуск: Том 16, № 4; С 24-25. Статья, РИНЦ, ВАК. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ16424-24>
4. Клиникова А.А., Данилова Г. А., Александрова Н.П. Роль iNOS в реализации респираторных эффектов ИЛ1-β. Медицинский академический журнал. 2019. Спецвыпуск. С 26-27. Статья, РИНЦ, ВАК DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ191S126-27>
5. Данилова Г. А., Клиникова А.А., Александрова Н.П. Циклооксигеназные механизмы в регуляции респираторных эффектов ФНО-α. Медицинский академический журнал. 2019, Спецвыпуск. С 17. Статья, РИНЦ, ВАК. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ191S117>
6. Клиникова А.А., Данилова Г. А., Александрова Н.П. Участие оксида азота в проявлении респираторных эффектов экзогенного повышения уровня ИЛ-1β в кровеносной системе. Ульяновский медико-биологический журнал. 2019. Выпуск № 4. С 91-99. Статья, РИНЦ, ВАК. DOI: <https://doi.org/10.34014/2227-1848-2019-4-91-102>

Публикации в других рецензируемых изданиях:

1. Klinnikova A., Danilova G., Aleksandrova N. A major inflammatory cytokine TNF-α inhibits the ventilatory response to hypoxia. *European Respiratory Journal* 2018, V.52, Suppl.62. p.415. WoS.
2. Klinnikova A. The effect of pro-inflammatory cytokine TNF – α on lung ventilation and hypoxic chemo-reception. *Pathophysiology* V. 25/3, 2018. P.2018. DOI: 10.1016/j.pathophys. 2018.07.146. Scopus.
3. Klinnikova A., Danilova G., Aleksandrova N. Tumor necrosis factor-α suppresses the ventilatory hypoxic response via NO - dependent pathways. *European Respiratory Journal* 2019, V.54, Suppl.63. WoS
4. Данилова Г. А., Александрова Н. П., Клиникова А.А. Участие оксида азота в механизмах влияния провоспалительного цитокина ИЛ-1β на гиперкапнический вентиляционный ответ. *Интегративная физиология*, 2020. Том 1, № 2 С 101-107. Статья. DOI: <https://doi.org/10.33910/2687-1270-2020-1-2-101-107>

5. Klinnikova A. A., Danilova G.A, Aleksandrova N.P. Participation COX and NOS in effect of IL-1 β on lung ventilation and hypoxic chemoreception. European Respiratory Journal 2020, WoS. Отправлено в печать.

Список литературы:

1. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М., 2000. 582 с.
2. Мюльберг А.А., Гришина Е.В. Цитокины как медиаторы нейроиммунных взаимодействий. Успехи физиологических наук. 2006. Т. 37. № 1. С 18.
3. Aleksandrova N.P., Danilova G.A., 2010. Effect of intracerebroventricular injection of interleukin-1-beta on the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia. *Eur. J. Med. Res.* 15 (II), 3-6.
4. Aleksandrova N.P., Danilova G.A., Aleksandrov V.G., 2015. Cyclooxygenase pathway in modulation of the ventilatory response to hypercapnia by interleukin-1 β in rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 209, 85-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2014.12.006>.
5. Aleksandrova N.P., Danilova G.A., Aleksandrov V.G., 2017. Interleukin-1beta suppresses the ventilatory hypoxic response in rats via prostaglandin independent pathways. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 95 (6), 681-685. <http://dx.doi.org/10.1139/cjpp-2016-0419>.
6. 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.
7. Banks W.A., Kastin A.J., Broadwell R.D., 1995. Passage of Cytokines across the Blood Brain Barrier, *Neuroimmunomodulation.* 2 (4), 241-248.
8. Dantzer R., Konsman J.P., Bluthé R.M., Kelley K.W., 2000, Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton. Neurosci.* 85 (1-3), 60-65.
9. Ek M, Arias C, Sawchenko P, Ericsson-Dahlstrand A. 2000. Distribution of the EP3 prostaglandin E (2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. *J. Comp. Neurol.* 428 (1), 5–20.
10. Ericsson A., Liu C., Hart R., Sawchenko P.E., 1995. Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J. Comp. Neurol.* 361 (4), 681-698.
11. Fernandez R., Nardocci G., Simon F., Martin A., Becerra A., RodriguezTirado C., Maisey K.R., Acuna-Castillo C., Cortes P.P. Lipopolysaccharide signaling in the carotid chemoreceptor pathway of rats with sepsis syndrome // *Respiratory Physiology and Neurobiology.* 2011. V. 175. P. 336–348.
12. Gauda E.B., Shirahata M., Mason A., Pichard L. E., Kostuk E. W., Chavez-Valdez R. Inflammation in the carotid body during development and its contribution to apnea of prematurity // *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 2013. V. 185. P. 120-131.
13. Gordon F.J., 2000. Effect of nucleus tractus solitarius lesions on fever produced by interleukin-1beta. *Auton. Neurosci.* 85, 102-110.

14. Graff G.R., Gozal D., 1999. Cardiorespiratory responses to interleukin-1beta in adult rats: role of nitric oxide, eicosanoids and glucocorticoids. *Arch. Physiol. Biochem.* 107 (2), 97–112.
15. Lam S.Y., Tipoe G.L., Liong E.C., Fung M.L., 2008. Chronic hypoxia upregulates the expression and function of proinflammatory cytokines in the rat carotid body. *Histochem. Cell Biol.* 130 (3), 549–559. doi: 10.1007/s00418-008-0437-4.
16. Lin S., Li H., Xu L., Moldoveanu B., Guardiola J., Yu J., 2011. Arachidonic acid products in airway nociceptor activation during acute lung injury. *Exp Physiol* 96, 966-976. doi: 10.1113/expphysiol.2011.058263.
17. Maier S.F., Goehler L.E., Fleshner M., Watkins L.R., 1998. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. *Ann. New York: Acad. Sci.* 840, 289-300.
18. Nadeau S., Rivest S., 1999. Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neuroscience.* 93 (4), 1449-1464.
19. Nakamura K., Kaneko T., Yamashita Y., Hasegawa H., Katoh H., Negishi M., 2000. Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. *J. Comp. Neurol.* 421 (4), 543–569.
20. Porzionato A., Macchi V., De Caro R., Di Giulio C., 2013. Inflammatory and immunomodulatory mechanisms in the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol.* 187 (1), 31-40. doi: 10.1016/j.resp.2013.02.017.
21. Preas H.L., Jubran A., Vandivier R.W. et al. Effect of endotoxin on ventilation and breath variability: role of cyclooxygenase pathway // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001. V. 164. P. 620.
22. Shu H.F., Wang B.R., Wang S.R., Yao W., Huang H.P., Zhou Z., Wang X., Fan J., Wang T., Ju G. IL-1beta inhibits IK and increases [Ca²⁺]_i in the carotid body glomus cells and increases carotid sinus nerve firings in the rat // *Eur J Neurosci.* 2007. V. 12. P. 3638-3647.
23. Zapata P., Larrain C., Reyes P., Fernández R., 2011. Immunosensory signaling by carotid body chemoreceptors. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 178 (3), 370–374. doi:10.1016/j.resp.2011.03.025. PMID:21458599.
24. Zhang L., Wilson C.G., Liu S., Haxhiu M.A., Martin R.J. Hypercapnia-induced activation of brainstem GABAergic neurons during early development // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2003. V. 136. № 1. P. 25-37
25. Wajant H., Pfizenmaier K., Scheurich P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10 (1), 45-65.

26. Wang X., Zhang X.J., Xu Z., Li X., Li G.L., Ju G., Wang B.R. Morphological evidence for existence of IL-6 receptor alpha in the glomus cells of rat carotid body // *Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. 2006 V. 288 P. 292–296.
27. Wong M.L., Bongiorno P.B., Gold P.W., Licinio J., 1995. Localization of interleukin-1 beta converting enzyme mRNA in rat brain vasculature: evidence that the genes encoding the interleukin-1 system are constitutively expressed in brain blood vessels. *Pathophysiological implications, Neuroimmunomodulation*. 2 (3), 141-148.