

**РОЛЬ NO-СИНТАЗНЫХ ПУТЕЙ В РЕАЛИЗАЦИИ ВЛИЯНИЯ  
ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ НА ПАТТЕРН ДЫХАНИЯ  
И ВЕНТИЛЯЦИОННЫЙ ОТВЕТ НА ГИПОКСИЮ**

© 2021 г. А. А. Клиникова<sup>1</sup>\*, Г. А. Данилова<sup>1</sup>, Н. П. Александрова<sup>1</sup>

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

\*E-mail: Klinnikova.an@gmail.com

Поступила в редакцию 21.08.2021 г.

После доработки 12.09.2021 г.

Принята к публикации 12.09.2021 г.

Интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) являются основными провоспалительными цитокинами. Их рецепторы экспрессируются в областях ствола мозга, участвующих в контроле дыхания, а также в каротидных телах, которые контролируют содержание O<sub>2</sub> в артериальной крови. Мы предположили, что циркулирующие провоспалительные цитокины могут влиять на вентиляцию легких и модулировать респираторный ответ на гипоксию посредством активации NO-зависимых путей. Целью нашего исследования было сравнение респираторных эффектов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  до и после предварительной обработки L-NAME – неселективным ингибитором NO-синтазы (NOS). Вентиляционный ответ на гипоксию измеряли у анестезированных крыс линии Вистар с использованием метода возвратного дыхания до и после внутривенного введения IL-1 $\beta$  (2 мкг/кг) и TNF- $\alpha$  (40 мкг/кг). В результате было обнаружено, что повышение системного уровня провоспалительных цитокинов увеличивает вентиляцию легких при нормоксии, в то же время снижая респираторную чувствительность к гипоксии. Предварительное интраперитонеальное введение L-NAME снижало обнаруженные респираторные эффекты как IL-1 $\beta$ , так и TNF- $\alpha$ . Мы полагаем, что активация NO-синтазных путей и усиление синтеза NO при взаимодействии цитокинов с соответствующими рецепторами, опосредует респираторные эффекты провоспалительных цитокинов и лежит в основе воздействия воспаления на дыхательную функцию.

*Ключевые слова:* интерлейкин-1 $\beta$ , фактор некроза опухоли- $\alpha$ , цитокины, вентиляция, респираторный хеморефлекс, гипоксия, оксид азота

DOI: 10.31857/S0869813921110042

## ВВЕДЕНИЕ

Гипоксический и гиперкапнический дыхательные хеморефлексы являются важнейшими элементами контроля дыхания. Эти рефлексы участвуют в поддержании газового гомеостаза артериальной крови. Хеморефлексы осуществляются при участии хеморецепторов каротидных тел, расположенных в бифуркации сонной артерии, которые возбуждаются при снижении напряжения кислорода, повышении напряжения углекислого газа и уменьшении рН артериальной крови. При гипоксии гломусные клетки каротидных тел деполаризуются в ответ на недостаток кислорода и выделяют нейромедиаторы, которые активируют сенсорные нервные волокна, передающие афферентную информацию в дыхательный центр ствола мозга.

Установлено, что гломусные клетки экспрессируют рецепторы воспалительных цитокинов, включая рецепторы TNF- $\alpha$  (TNF-R1 и TNF-R2), IL-1 $\beta$  (IL-1R1) и рецепторы IL-6 [1–4]. IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  являются основными провоспалительными цитокинами, продуцируемыми во время острой фазы иммунного ответа на инфекцию и воспаление. Сообщается, что системный уровень этих цитокинов повышается при многих респираторных заболеваниях, таких как астма, хроническая обструктивная болезнь легких и апноэ во сне [5–7]. Было обнаружено, что системное воспаление вызывает морфологические изменения в каротидном теле сонной артерии [3]. Эти изменения, связанные с повышением уровня провоспалительных цитокинов, снижают чувствительность каротидного тела к гипоксии [4]. Известно, что TNF- $\alpha$  может провоцировать высвобождение гломусными клетками медиатора дофамина [8, 9]. В совокупности, эти данные показывают, что функция каротидных телец при гипоксии может снижаться во время воспаления.

Однако механизмы, с помощью которых провоспалительные цитокины влияют на вентиляцию легких и гипоксическую хеморецепцию, до сих пор не изучены и могут включать множество воспалительных молекул, которые влияют не только на центральные и периферические хеморецепторы, но и на дыхательные нейроны [10]. Влияние цитокинов на дыхательную систему может быть опосредовано несколькими способами: высвобождением простагландинов, норадреналина, рилизинг-фактора кортикотропина, оксида азота (NO) [11–15].

Целью настоящего исследования было изучение влияния провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  на паттерн дыхания и гипоксическую хеморецепцию, а также выяснение роли NO-синтазных путей в реализации респираторных эффектов данных цитокинов.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование было выполнено на 48 наркотизированных трахеостомированных спонтанно дышащих крысах линии Вистар массой  $270 \pm 20$  г (ЦКП Биокolleкция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН). Все животные находились под общей анестезией (уретан, 1400 мг/кг, интраперитонеально). Эксперименты выполнены с соблюдением основных норм и правил биомедицинской этики (European Community Council Directives 86/609/EEC).

Для регистрации объемно-временных параметров внешнего дыхания использовалась пневмотахографическая методика. К трахеостомической канюле подключалась пневмометрическая трубка MLT-1L (AD Instruments, Австралия). По кривой пневмотахограммы измерялась средняя скорость инспираторного потока (Винсп) и частота дыхательных движений (ЧДД). При интеграции пневмотахографической кривой автоматически получали кривую дыхательных объемов – спирограмму и вычисляли дыхательный объем (ДО). Минутный объем дыхания (МОД) рассчитывали, как произведение ДО на ЧДД. Парциальное давление кислорода и углекислого газа ( $P_{ET}O_2$  и  $P_{ET}CO_2$ ) в конечной порции выдыхаемого воздуха измерялось с помощью респираторного газоанализатора (Gemini, США).

Животные были разделены на 6 экспериментальных групп. Животные первой группы ( $n = 8$ ) использовались для выяснения собственных респираторных эффектов IL-1 $\beta$ , этим животным вводили только IL-1 $\beta$  (2 мкг/кг, “Беталейкин”, ФГУП ОЧБ ФМБА) в хвостовую вену. Вторая группа ( $n = 8$ ) была предназначена для выяснения респираторных эффектов TNF- $\alpha$ , этой группе внутривенно вводили TNF- $\alpha$  (40 мкг/кг, Sigma). Третья и четвертая группы ( $n = 8$  каждая) были созданы для выяснения роли нитригических механизмов, участвующих в реализации респираторных эффектов цитокинов. Животным этих групп за 20 мин до введения IL-1 $\beta$  или TNF- $\alpha$  производилась внутрибрюшинная инъекция неселективного ингиби-

тора NO-синтаз (L-NAME) (10 мг/кг, Sigma). Пятая группа ( $n = 8$ ) использовалась для выявления возможного собственного влияния L-NAME на вентиляцию легких и гипоксическую хеморецепцию; этой группе вводили только ингибитор, внутрибрюшинно. Помимо этого, была создана группа животных ( $n = 8$ ), которая являлась контрольной. Этим животным вводили внутривенно 0.25 мл физиологического раствора.

Чувствительность к гипоксическому стимулу исследовали классическим методом возвратного дыхания, адаптированным нами для использования на мелких лабораторных животных. Дыхание производилось в замкнутом контуре, заполненном азотно-кислородной гипоксической газовой смесью (80% N<sub>2</sub>, 15% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). CO<sub>2</sub> добавлялся в дыхательную смесь в концентрации, соответствующей нормальному содержанию CO<sub>2</sub> в организме для предотвращения гипокапнии, развивающейся при гипоксической гипервентиляции.

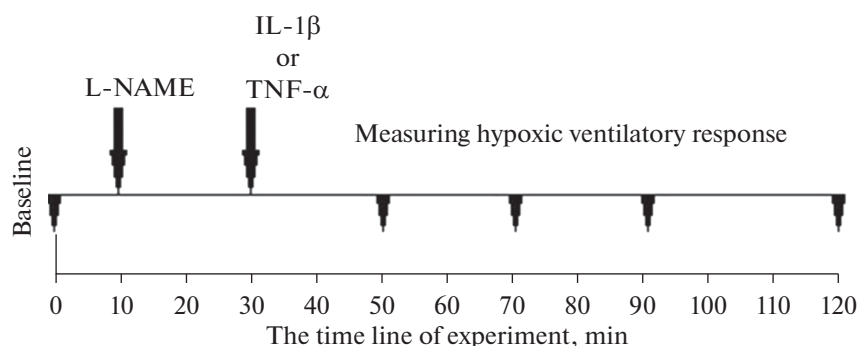
Изокапния поддерживалась за счет удаления с помощью адсорбента (натронная известь) из выдыхаемого воздуха, поступающего в мешок (объем 50 мл) для возвратного дыхания, углекислого газа, образующегося в организме. По мере потребления кислорода при дыхании из мешка происходило постепенное убывание содержания O<sub>2</sub> в дыхательной смеси, нарастала стимуляция периферических хеморецепторов и происходило соответствующее увеличение легочной вентиляции. Содержание CO<sub>2</sub> в дыхательной смеси не изменялось. Продолжительность проведения пробы с возвратным дыханием составляла 4 мин. Вентиляционный ответ на гипоксию тестировался в диапазоне снижения парциального давления кислорода в выдыхаемом воздухе от 80 до 40 мм рт. ст., т.к. в этом диапазоне зависимость величины вентиляции от интенсивности гипоксического стимула практически линейна.

Для количественной оценки вентиляционного ответа на гипоксию производилось вычисление приростов ДО, МОД и V<sub>инсп</sub> при снижении парциального давления кислорода в конечной порции выдыхаемого воздуха на 1 мм рт. ст. Кроме того, производилось графическое построение зависимости роста вентиляции и ее составляющих от содержания O<sub>2</sub> в выдыхаемом воздухе. Гипоксический вентиляционный ответ тестировался до введения препаратов, а затем на 20-ой, 40-ой, 60-ой и 90-ой мин после их введения (рис. 1).

Для статистической обработки экспериментальных данных использовался программный пакет STATISTICA 7.0. Все значения представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка. Для проверки нормальности распределения данных применялись критерии Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Значения до и после введения препаратов оценивали с помощью парного теста Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Достоверными считали различия при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Паттерн дыхания.** Эксперименты показали, что экзогенное повышение системного уровня как IL-1 $\beta$ , так и TNF- $\alpha$  оказывает активирующее влияние на систему внешнего дыхания, вызывая увеличение средней скорости инспираторного потока, дыхательного объема и минутного объема дыхания (табл. 1, 2). Достоверные изменения минутного объема дыхания отмечались уже на 20-ой мин после введения цитокинов, средней скорости инспираторного потока и дыхательного объема — на 40-ой мин. Значимое увеличение частоты дыхательных движений наблюдалось лишь через 90 мин после введения IL-1 $\beta$  или TNF- $\alpha$ . При проведении серии контрольных экспериментов с внутривенным введением физиологического раствора, а также с внутрибрюшинным введением раствора L-NAME не было выявлено достоверных изменений дыхательных параметров.



**Рис. 1.** Схема эксперимента. Эксперимент длился 120 мин, на тридцатой минуте вводили IL-1 $\beta$  или TNF- $\alpha$ . L-NAME вводили на десятой минуте эксперимента (т.е. за 20 мин до введения цитокина). Треугольники – моменты измерения дыхательной реакции при гипоксии. Стрелки – моменты введения препаратов.

После предварительной обработки L-NAME влияние IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  на паттерн дыхания было ослаблено. Достоверное увеличение минутного объема дыхания наблюдалось только через 60 мин после повышения системного уровня данных цитокинов (табл. 1, 2). Величина прироста этого параметра составляла 25 и 50% при введении IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  соответственно. При действии IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  на фоне предварительного введения L-NAME прирост минутного объема дыхания через 60 мин после введения цитокинов составлял 16 и 10%.

**Таблица 1.** Изменение параметров дыхания при повышении системного уровня IL-1 $\beta$  и IL-1 $\beta$  на фоне действия L-NAME

Параметр	Физиологический раствор (n = 8)			IL-1 $\beta$ (n = 8)			IL-1 $\beta$ + L-NAME (n = 8)		
	фон	40 мин	60 мин	фон	40 мин	60 мин	фон	40 мин	60 мин
МОД, мл/мин	100 $\pm$ 5.2	97 $\pm$ 4.0	96 $\pm$ 9.5	117 $\pm$ 9.6	143 $\pm$ 12.8*	146 $\pm$ 12.0*	210 $\pm$ 8.3	237 $\pm$ 10.1	244 $\pm$ 9.3*
ДО, мл	1.0 $\pm$ 0.02	0.9 $\pm$ 0.05	1.0 $\pm$ 0.08	1.0 $\pm$ 0.08	1.36 $\pm$ 0.07*	1.4 $\pm$ 0.07*	1.8 $\pm$ 0.08	1.9 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	1.9 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>
ЧДД, мин <sup>-1</sup>	107 $\pm$ 2.0	105 $\pm$ 4.0	105 $\pm$ 2.6	113 $\pm$ 7.0	106 $\pm$ 9.0	105 $\pm$ 8.0	114 $\pm$ 3.3	118 $\pm$ 2.6	122 $\pm$ 2.7 <sup>#</sup>
V <sub>инсп</sub> , мл/с <sup>-1</sup>	3.8 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.5	4.2 $\pm$ 0.4*	4.3 $\pm$ 0.4*	7.8 $\pm$ 0.3	8.7 $\pm$ 0.3	8.8 $\pm$ 0.3

МОД – минутный объем дыхания; ДО – дыхательный объем; ЧДД – частота дыхания; V<sub>инсп</sub> – средняя скорость инспираторного потока. Значения являются средними  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  достоверные отличия от исходного уровня. <sup>#</sup>  $p < 0.05$  достоверные отличия IL-1 $\beta$  от IL-1 $\beta$  на фоне действия L-NAME.

**Таблица 2.** Изменение параметров дыхания при повышении системного уровня TNF- $\alpha$  и TNF- $\alpha$  на фоне действия L-NAME

Параметр	Физиологический раствор (n = 8)			TNF- $\alpha$ (n = 8)			TNF- $\alpha$ + L-NAME (n = 8)		
	фон	40 мин	60 мин	Фон	40 мин	60 мин	фон	40 мин	60 мин
МОД, мл/мин	100 $\pm$ 5.2	97 $\pm$ 4.0	96 $\pm$ 9.5	119 $\pm$ 15.6	172 $\pm$ 13.8*	179 $\pm$ 11.5*	132 $\pm$ 8.8	138 $\pm$ 7.0 <sup>#</sup>	145.2 $\pm$ 7.0* <sup>#</sup>
ДО, мл	1.0 $\pm$ 0.02	0.9 $\pm$ 0.05	1.0 $\pm$ 0.08	1.1 $\pm$ 0.07	1.3 $\pm$ 0.06*	1.4 $\pm$ 0.05*	1.3 $\pm$ 0.06	1.2 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	1.2 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>
ЧДД, мин <sup>-1</sup>	107 $\pm$ 2.4	105 $\pm$ 3	105 $\pm$ 2.6	111 $\pm$ 5.1	114 $\pm$ 5.3	119 $\pm$ 6.1	108 $\pm$ 5.6	112 $\pm$ 4.8	110 $\pm$ 6.0
V <sub>инсп</sub> , мл/с <sup>-1</sup>	3.8 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.5*	5.8 $\pm$ 0.3*	4.2 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.2 <sup>#</sup>	4.4 $\pm$ 0.4 <sup>#</sup>

Обозначения такие же, как в табл. 1.

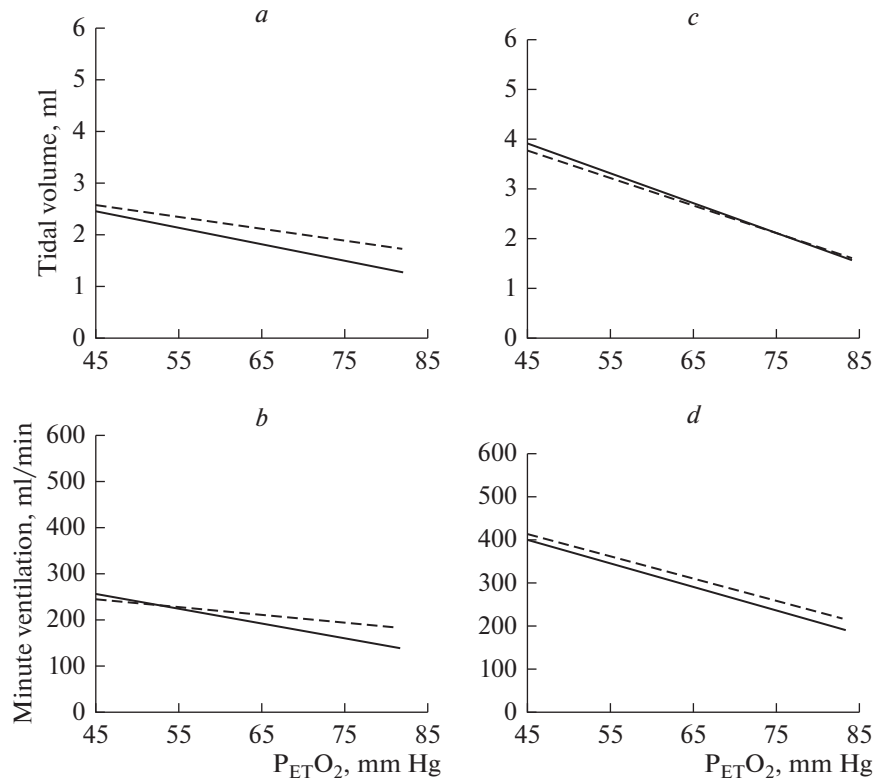


Рис. 2. Вентиляционный ответ на гипоксию до (сплошная линия) и через 40 мин после (пунктирная линия) внутривенного введения IL-1 $\beta$  (a, b) и IL-1 $\beta$  на фоне действия L-NAME (c, d).

**Вентиляционный ответ на гипоксию.** При возвратном дыхании гипоксической газовой смесью наблюдалась значительная корреляция между увеличением минутной вентиляции, дыхательного объема, средней скорости инспираторного потока и снижением  $P_{ET}O_2$  как до, так и после внутривенных инъекций IL-1 $\beta$  или TNF- $\alpha$ . Однако внутривенное введение как IL-1 $\beta$ , так и TNF- $\alpha$  вызывало уменьшение угла наклона линий тренда, усредняющих вентиляционные кривые, зарегистрированные в нескольких экспериментах. Линии тренда становились более пологими, что свидетельствует о снижении вентиляционной чувствительности к гипоксической стимуляции (рис. 2a, b; 3a, b).

Проведение количественных расчетов подтвердило достоверность снижения прироста респираторных параметров в ответ на гипоксическую стимуляцию на фоне действия IL-1 $\beta$ . Максимальное снижение приростов дыхательных параметров наблюдалось на 40-ой мин действия цитокина. Так, расчет величины прироста параметров при снижении  $P_{ET}O_2$  на 1 мм рт. ст. показал, что через 40 мин после введения IL-1 $\beta$  прирост МОД уменьшался с  $3.34 \pm 0.23$  до  $2.02 \pm 0.19$  мл/мин/мм рт. ст. ( $-41\%$ ,  $p < 0.05$ ), ДО – с  $0.031 \pm 0.005$  в контроле до  $0.022 \pm 0.004$  мл/мм рт. ст. ( $-29\%$ ,  $p < 0.05$ ) и скорости инспираторного потока с  $0.114 \pm 0.017$  до  $0.06 \pm 0.012$  мл/с/мм рт. ст. ( $-47\%$ ,  $p < 0.05$ ) по сравнению с фоновыми величинами (рис. 4a).

Максимальное снижение чувствительности респираторной системы к гипоксии было обнаружено и через 40 мин после введения TNF- $\alpha$ . Количественные расчеты показали, что МОД снизился с  $6.06 \pm 0.91$  до  $3.48 \pm 0.38$  мл/мин/мм рт. ст. ( $-40\%$ )

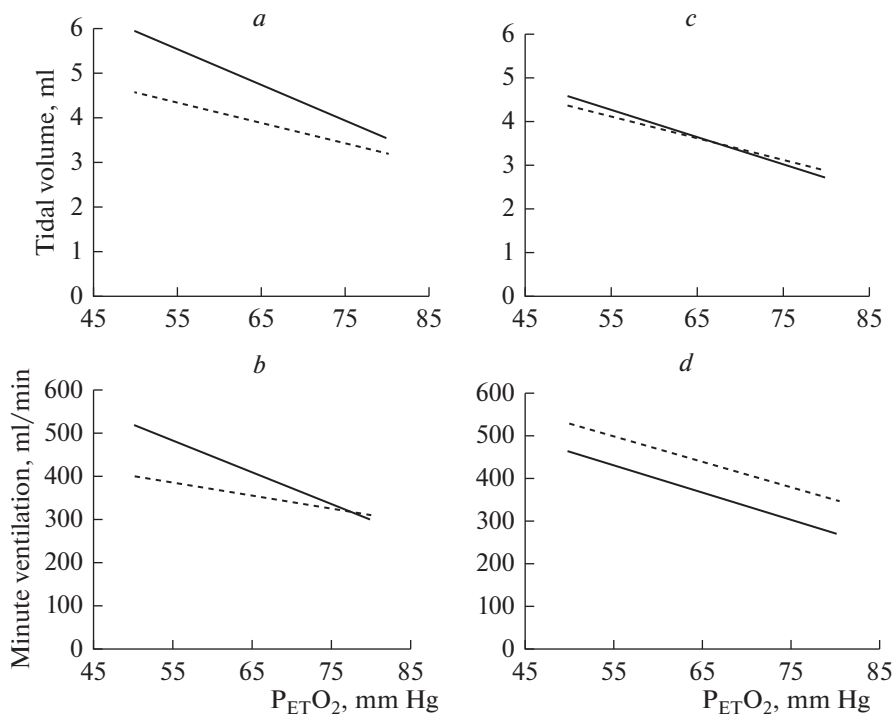


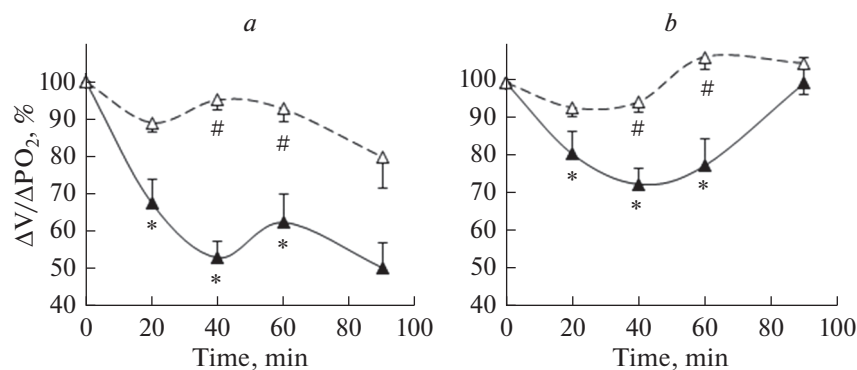
Рис. 3. Вентиляционный ответ на гипоксию до (сплошная линия) и через 40 мин после (пунктирная линия) внутривенного введения TNF- $\alpha$  (a, b) и TNF- $\alpha$  на фоне действия L-NAME (c, d).

через 40 мин после введения TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ). ДО и  $V_{\text{инсп}}$  снизились с  $0.06 \pm 0.01$  до  $0.04 \pm 0.01$  мл/мм рт. ст. ( $-27\%$ ,  $p < 0.05$ ) и с  $0.23 \pm 0.02$  в контроле до  $0.15 \pm 0.01$  мл/с/мм рт. ст. ( $-27\%$ ,  $p < 0.05$ ) через 40 мин после введения TNF- $\alpha$  соответственно (рис. 4b). В то же время, внутривенное введение физиологического раствора не изменило вентиляционный ответ на гипоксию.

В совокупности полученные данные показывают, что повышенный уровень провоспалительных цитокинов в крови снижает чувствительность дыхательной системы к гипоксии и подавляет гипоксический хеморецепторный контроль дыхания.

Повышение системного уровня как IL-1 $\beta$ , так и TNF- $\alpha$  на фоне действия ингибитора NO-синтаз – L-NAME не вызвало ослабления вентиляционного ответа на гипоксию: угол наклона линий тренда, характеризующий зависимость дыхательных параметров (МОД, ДО,  $V_{\text{инсп}}$ ) от величины гипоксической стимуляции, не изменялся после введения цитокинов (рис. 2c, d; 3c, d).

Количественная оценка реакции на гипоксию после введения цитокинов на фоне ингибирования активности NO-синтаз также показала, что в течение всего эксперимента достоверного снижения приростов МОД, ДО и  $V_{\text{инсп}}$  в ответ на гипоксическую стимуляцию, относительно их фоновых значений, не наблюдалось. Сохранялась лишь слабо выраженная тенденция к ослаблению вентиляционного ответа на гипоксию (рис. 4).



**Рис. 4.** Динамика вентиляционного ответа на гипоксию на протяжении всего эксперимента, т.е. на исходном уровне и через 20, 40, 60 и 90 мин после введения IL-1 $\beta$  (a) или TNF- $\alpha$  (b), до (сплошная линия) и после (пунктирная линия) предварительного введения L-NAME.

\*  $p < 0.05$  — достоверные отличия от фоновых значений, #  $p < 0.05$  — достоверные отличия от IL-1 $\beta$  или TNF- $\alpha$ . Представлены средние значения  $\pm$  SEM.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нормальных условиях уровень цитокинов в организме очень низкий. Однако при системном воспалении, стрессе, гипоксии, обструктивной болезни легких наблюдается значительный рост уровня провоспалительных цитокинов. Известно, что внутривенное введение липополисахарида вызывает повышение уровня TNF в крови с 750 до 5000 нг/мл [16].

Проведенное нами исследование показало, что при спокойном дыхании воздухом экзогенное повышение уровня IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  вызывает увеличение минутной вентиляции, дыхательного объема и средней скорости инспираторного потока. Подобное влияние провоспалительных цитокинов на вентиляцию легких было показано и в более ранних исследованиях. Было обнаружено, что вводимый внутривенно эндотоксин, который приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ ), вызывает усиление вентиляции легких [17]. В предыдущих исследованиях мы показали, что повышение церебрального уровня IL-1 $\beta$  приводит к значительному увеличению объемно-временных параметров дыхания в условиях нормоксии, но в то же время ослабляет гиперкапнический и гипоксический вентиляционные ответы [15, 18]. Результаты, представленные в данной статье, показывают, что внутривенное введение IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  имеет такие же респираторные эффекты: усиление вентиляции легких и ослабление респираторной чувствительности к гипоксии.

На основании полученных нами данных мы полагаем, что повышение системного уровня провоспалительных цитокинов снижает чувствительность периферических артериальных хеморецепторов к изменению газового состава крови. Этот вывод подтверждается результатами, полученными в других исследованиях. Установлено, что IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  могут распознаваться мембранными рецепторами, расположенными в гломусных клетках каротидных телец, а также могут способствовать выделению гломусными клетками медиатора дофамина [8, 9]. В экспериментах, проведенных *in vitro*, установлено, что в каротидном теле TNF- $\alpha$  может увеличивать базовую частоту хемосенсорных разрядов нерва, иннервирующего каротидные тела, но в то же время — уменьшать хемосенсорные разряды, вызванные гипоксией [8]. В нашей работе, в экспериментах *in vivo*, было показано, что внутри-

венная инъекция как IL-1 $\beta$ , так и TNF- $\alpha$  увеличивает минутную вентиляцию легких при спокойном дыхании воздухом, и в то же время снижает вентиляционный ответ респираторной системы на гипоксию. Принимая во внимание представленные данные литературы, можно предположить, что обнаруженные нами респираторные эффекты провоспалительных цитокинов связаны с тем, что повышение их уровня в циркулирующей крови изменяет хемосенсорную активность каротидного тела.

Результаты представленного исследования показывают также, что респираторные эффекты провоспалительных цитокинов опосредуются активацией NO-синтазных путей. Наличие NO-синтаз было обнаружено в нервных волокнах, окружающих гломусные клетки каротидных тел, а также в самих гломусных клетках [19]. При взаимодействии цитокинов с соответствующими мембранными рецепторами в этих клетках может усиливаться синтез конститутивных форм NO-синтазы и образование молекул NO, которые оказывают как аутокринное, так и паракринное действие. Внутриклеточный механизм действия NO заключается в активации циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), способного влиять на проводимость ионных каналов и, таким образом, изменять функциональное состояние клеточной мембраны.

Установлено, что оксид азота в физиологических концентрациях является тормозным модулятором хемосенсорных разрядов каротидных тел. Уменьшение эндогенной продукции NO вносит вклад в усиление хемосенсорных разрядов каротидных тел [20, 21]. Известно, что NO модулирует хеморецепторные процессы посредством различных механизмов, опосредовано через изменения тонуса сосудов в каротидных телах и доставки кислорода, и напрямую через модуляцию возбудимости гломусных клеток и сенсорных нейронов. При этом эффект NO имеет двойственное дозозависимое влияние на хеморецепцию каротидных тел. В гипоксических условиях NO является преимущественно тормозным модулятором каротидной хеморецепции, тогда как при нормоксии NO усиливает хемосенсорные разряды [20, 21]. Этот факт объясняет обнаруженный нами двойственный респираторный эффект IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ : увеличение базовой вентиляции при нормоксии, но уменьшение гипоксического вентиляционного ответа.

Полученные нами данные, указывающие на восстановление вентиляционного гипоксического ответа после ингибирования NO-синтаз, находят объяснения и в других исследованиях, которые показывают, что уменьшенная эндогенная продукция NO усиливает хеморецепторную активность каротидных тел. Так, например, было установлено, что у кроликов с сердечной недостаточностью и усиленным ответом на гипоксию наблюдается уменьшенная эндогенная активность NO-синтаз в каротидных телах по сравнению с нормальными животными. При этом было показано, что внедрение этим животным аденовируса, экспрессирующего NO-синтазы, уменьшало базовые разряды хеморецепторов каротидных тел и ослабляло ответ на гипоксию [22]. В экспериментах *in vitro* на перфузированных каротидных телах кошек при регистрации активности синусного нерва было показано, что обе конститутивные изоформы NO-синтазы – нейрональная (nNOS) и эндотелиальная (eNOS) – вносят вклад в действие NO на хеморецепторную активность [23].

Таким образом, результаты проведенных нами исследований и анализ данных литературы указывают на участие ключевых воспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  в модуляции паттерна дыхания и гипоксического хеморефлекса посредством активации NO-синтаз и усиления синтеза NO в гломусных клетках каротидных тел.



## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа профинансирована за счет Государственной программы Российской Федерации 47 ГП.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Н.П.А., А.А.К.); сбор данных (А.А.К., Г.А.Д.); обработка данных (А.А.К., Г.А.Д.); написание и редактирование манускрипта (А.А.К., Н.П.А., Г.А.Д.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang X, Wang BR, Duan XL, Zhang P, Ding YQ, Jia Y, Jiao XY, Ju G (2002) Strong expression of interleukin-1 receptor types I in the rat carotid body. *J Histochem Cytochem* 50 (12): 1677–1684.  
<https://doi.org/10.1177/002215540205001213>
2. Wang X, Zhang XJ, Xu Z, Li X, Li GL, Ju G, Wang BR (2006) Morphological evidence for existence of IL-6 receptor alpha in the glomus cells of rat carotid body. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288 (3): 292–296.  
<https://doi.org/10.1002/ar.a.20310>
3. Lam SY, Tipoe GL, Liong EC, Fung ML (2008) Chronic hypoxia upregulates the expression and function of proinflammatory cytokines in the rat carotid body. *Histochem Cell Biol* 130 (3): 549–559.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-008-0437-4>
4. Gauda EB, Shirahata M, Masona A, Pichard LE, Kostuk EW, Chavez-Valdeza R (2013) Inflammation in the carotid body during development and its contribution to apnoea of prematurity. *Respir Physiol Neurobiol* 185 (1): 120–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.08.005>
5. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO (2000) Sleep apnoea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1151–1158.
6. Vernooy JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurman WA, Dentener MA, Wouters EF (2002) Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1218–1224.
7. Bucchioni E, Kharitonov SA, Allegra L, Barnes PJ (2003) High levels of interleukin-6 in the exhaled breath condensate of patients with COPD. *Respir Med* 97: 1299–1302.
8. Fernández R, González S, Rey S, Cortés PP, Maisey KR, Reyes EP, Larrain C, Zapata P (2008) Lipopolysaccharide-induced carotid body inflammation in cats: functional manifestations, histopathology and involvement of tumour necrosis factor-alpha. *Exp Physiol* 93 (7): 892–907.  
<https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.041152>
9. Zapata P, Larrain C, Reyes P, Fernández R (2011) Immunosensory signaling by carotid body chemoreceptors. *Respir Physiol Neurobiol* 178 (3): 370–374.  
<https://doi.org/doi:10.1016/j.resp.2011.03.025>
10. Huxtable AG, Vinit S, Windelborn JA, Crader SM, Guenther CH, Watters JJ, Mitchell GS (2011) Systemic inflammation impairs respiratory chemoreflexes and plasticity. *Respir Physiol Neurobiol* 178(3): 482–489.  
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.06.017>
11. Nakamori T, Morimoto A, Murakami N (1993) Effect of a central CRF antagonist on cardiovascular and thermoregulatory responses induced by stress or IL-1 $\beta$ . *Am J Physiol* 265(4): 834–839.
12. Watanabe T, Tan N, Saiki Y, Makisumi T, Nakamura S (1996) Possible involvement of glucocorticoids in the modulation of interleukin-1-induced cardiovascular responses in rats. *J Physiol* 491(1): 231–239.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021211>
13. Graff GR, 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.

14. *Herlenius E* (2011) An inflammatory pathway to apnea and autonomic dysregulation. *Respir Physiol Neurobiol* 178: 449–457.  
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.06.026>
15. *Aleksandrova NP, Danilova GA, Aleksandrov VG* (2015) Cyclooxygenase pathway in modulation of the ventilatory response to hypercapnia by interleukin-1 $\beta$  in rats. *Respir Physiol Neurobiol* 209: 85–90.  
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2014.12.006>
16. *Foster SJ, McCormick LM, Ntolosi BA, Campbell D* (1993) Production of TNF alpha by LPS-stimulated murine, rat and human blood and its pharmacological modulation. *Agents Actions* 38: 77–79.  
<https://doi.org/10.1007/BF01991143>
17. *Preas HL 2nd, Jubran A, Vandivier RW, Reda D, Godin PJ, Banks SM, Tobin MJ, Suffredini AF* (2001) Effect of endotoxin on ventilation and breath variability: role of cyclooxygenase pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 164(4): 620–626.
18. *Aleksandrova NP, Danilova GA, Aleksandrov VG* (2017) Interleukin-1beta suppresses the ventilatory hypoxic response in rats via prostaglandin dependent pathways. *Canad J Physiol Pharmacol* 95(6): 681–685.  
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0419>
19. *Tanaka K, Chiba T* (1994) Nitric oxide synthase containing neurons in the carotid body and sinus of the guinea pig. *Microscopy Res Techniq J* 29(2): 90–93.  
<https://doi.org/10.1002/jemt.1070290205>
20. *Iturriaga R* (2001) Nitric oxide and carotid body chemoreception. *Biol Res* 34(2): 135–139.  
<https://doi.org/10.4067/s0716-97602001000200019>
21. *Moya EA, Alcayaga J, Iturriaga R* (2012) NO modulation of carotid body chemoreception in health and disease. *Respir Physiol Neurobiol* 184(2): 158–164.  
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2012.03.019>
22. *Li HF, Yu J* (2009) Airway chemosensitive receptors in vagus nerve perform neuro-immune interaction for lung-brain communication. *Adv Exp Med Biol* 648: 421–426.  
[https://doi.org/10.1007/978-90-481-2259-2\\_48](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2259-2_48)
23. *Valdés V, Mosqueira M, Rey S* (2003) Inhibitory effects of NO on carotid body: contribution of neural and endothelial nitric oxide synthase isoforms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(1): 57–68.

### **The Role of NO-Synthase Pathways in the Effects of Proinflammatory Cytokines on the Respiratory System during Normoxia and Hypoxia**

**A. A. Klinnikova<sup>a,\*</sup>, G. A. Danilova<sup>a</sup>, and N. P. Aleksandrova<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Pavlov Institute of Physiology of RAS, St. Petersburg, Russia*

<sup>\*</sup>*e-mail: Klinnikova.an@gmail.com*

Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) are the major proinflammatory cytokines. Cytokine receptors are expressed in areas of the brainstem involved in the control of respiration, as well as in the carotid bodies, which control the O<sub>2</sub> balance in arterial blood. We hypothesized that circulating proinflammatory cytokines can affect lung ventilation and alter the respiratory response to hypoxia by activating NO-dependent pathways. The aim of our study was to compare the respiratory effects of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  before and after pretreatment with L-NAME, a non-selective inhibitor of NO synthase (NOS). The ventilation response to hypoxia was measured in anesthetized Wistar rats using the rebreathing method before and after intravenous administration of IL-1 $\beta$  (2  $\mu$ g/kg) and TNF- $\alpha$  (40  $\mu$ g/kg). As a result, it was found that an increase in the systemic level of proinflammatory cytokines increases lung ventilation during normoxia, while reducing respiratory sensitivity to hypoxia. Pretreatment with L-NAME reduced these respiratory effects of both IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . We believe that the activation of NO-synthase pathways and an increase in NO synthesis, when cytokines interact with the corresponding receptors, mediates the respiratory effects of proinflammatory cytokines and underlies the effect of inflammation on respiratory function.

**Keywords:** interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , cytokines, ventilation, respiratory chemoreflex, hypoxia, nitric oxide