

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 57.017.647+616.053+612.133

Роль каналов $ВК_{Ca}$ в дилатации пиальных артерий у крыс разного возраста

В.Н. Шуваева* , О.П. Горшкова *Институт физиологии имени И.П. Павлова, Российская академия наук, Россия,
199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, д. 6***e-mail: shuvaevavn@infran.ru*

Исследование механизмов возрастных изменений сосудистых реакций и применение полученных знаний в клинике может способствовать снижению количества осложнений и смертности от заболеваний сердечно-сосудистой системы, частота которых увеличивается с возрастом. При старении усиливается дисфункция эндотелия и наблюдаются нарушения мозгового кровообращения, вызванные возникновением очагов ишемии. Одним из основных элементов регуляции сосудистого тонуса, наряду со множеством важных механизмов, являются ионные калиевые каналы. В настоящей работе изучали возрастные изменения роли кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости ($ВК_{Ca}$) в ацетилхолин-опосредованной дилатации мозговых артерий у крыс Wistar, поскольку вклад этих каналов в вазодилатацию при старении изучен недостаточно. Методом прижизненной микрофотосъемки ($\times 470$) сравнивали реакции пиальных артерий на ацетилхолин (АХ, ацетилхолина хлорид, 10^{-7} М, 5 мин) в отсутствие и на фоне блокады $ВК_{Ca}$ с помощью хлорида тетраэтиламмония (ТЭА, 2 мМ, 5 мин) у крыс Wistar в возрасте 4, 6, 9, 18 и 24 мес. Изменения вклада $ВК_{Ca}$ в дилатацию сосудов оценивали по изменению числа дилатаций пиальных артерий в ответ на воздействие АХ после блокады $ВК_{Ca}$, измеряя ширину сосудов в трех отдельных группах артерий: мелких (диаметром менее 20 мкм), средних (20–40 мкм) и крупных (более 40 мкм). Показано, что АХ-индуцированная дилатация зависит от начального диаметра артерий. Ингибирование активности $ВК_{Ca}$ у 4-месячных крыс уменьшало число АХ-индуцированных дилатаций во всех группах исследованных артерий. По сравнению с 4-месячными крысами у 6- и 18-месячных животных был снижен вклад $ВК_{Ca}$ в дилатацию мелких, у 9- и 24-месячных – увеличен вклад $ВК_{Ca}$ в дилатацию средних артерий; вклад $ВК_{Ca}$ в дилатацию крупных артерий снижался, начиная с 6-месячного возраста. Заключается, что $ВК_{Ca}$ играют значительную роль в АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий. Возрастные нарушения вклада этих каналов в АХ-опосредованную дилатацию пиальных артерий развиваются постепенно, имеют волнообразное течение и зависят от диаметра артерий. Выявленные нарушения функциональной активности $ВК_{Ca}$ могут служить терапевтическими мишенями для создания новых технологий лечения возрастных поражений церебральных сосудов.

Ключевые слова: старение, пиальные артерии, вазодилатация, ацетилхолин, кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости, гладкомышечные клетки сосудов

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-1-1

Введение

Знание механизмов возрастных изменений сосудистых реакций и применение полученных знаний в клинике может способствовать снижению выраженности осложнений и смертности от заболеваний сердечно-сосудистой системы, частота которых особенно высока у пожилых людей [1]. При старении усиливается дисфункция эндотелия и наблюдаются нарушения мозгового кровообращения, вызванные локальным сужением мелких церебральных сосудов и возникновением очагов

ишемии, поэтому исследование механизмов возрастной вазодилататорной регуляции сосудистого тонуса имеет важное значение. Изменение вазодилатации с возрастом связывают с нарушением синтеза и снижением биодоступности оксида азота (NO) в эндотелии [2]. Важнейшими элементами регуляции сосудистого тонуса являются также ионные каналы, экспрессируемые как в эндотелиальных, так и в сосудистых гладкомышечных клетках (ГМК). Эти каналы играют ключевую роль в интеграции и передаче генерируемых в эндоте-

лии химических сигналов к нижележащим ГМК сосудов [3]. Кальций-активируемые калиевые каналы (K_{Ca}) широко представлены в различных тканях и активируются увеличением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Эти каналы названы в соответствии с их проводимостью и механизмом открывания-закрывания: активируемые кальцием калиевые каналы с большой проводимостью ионов Ca^{2+} обозначаются как BK_{Ca} или K_{Ca} 1.1. BK_{Ca} состоят из порообразующей α -субъединицы и β -субъединицы и отличаются от других калиевых каналов наличием дополнительных участков на NH_2 -конце и C-конце молекулы α -субъединицы. Это позволяет α -субъединице соединяться с различными молекулами, что ведет к разнообразию BK_{Ca} , экспрессируемых в различных органах, и обеспечивает динамическую регуляцию их функций [4]. Эндотелий-зависимая вазодилатация опосредуется широким спектром факторов, включая NO, простагландин, эндотелиальный гиперполяризующий фактор (EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor) и ряд других. Одним из основных вазодилататоров, влияющих на активность BK_{Ca} , является NO. Исследования механизмов релаксирующего действия NO на кровеносные сосуды выявили роль BK_{Ca} в гладких мышцах в качестве одного из нижестоящих эффекторов NO [5]. В сосудах головного мозга NO может активировать BK_{Ca} , а также стимулировать саркоплазматический ретикулум, вызывая дискретные токи Ca^{2+} , активирующие соседние кластеры BK_{Ca} [6]. Синтезируемый под действием NO циклогуанидинмонофосфат активирует протеинкиназу G, а последняя способствует активации BK_{Ca} , что приводит к изменению мембранного потенциала ГМК в сторону их гиперполяризации и расслабления [7]. Имеются данные, что BK_{Ca} могут служить мишенью и для EDHF [8]. Изменение активности BK_{Ca} , в свою очередь, может стимулировать или ограничивать NO-зависимую дилатацию сосудов [9]. Однако роль BK_{Ca} сосудистых ГМК в поддержании миогенного тонуса и в вазоактивных реакциях сосудистого русла не вполне ясна.

Так как вклад BK_{Ca} в вазодилатацию в связи со старением изучен недостаточно подробно, целью данной работы было исследование возрастных изменений вклада BK_{Ca} в ацетилхолин-опосредованную (АХ-опосредованную) дилатацию мозговых артерий у крыс.

Материалы и методы исследования

Использованы самцы крыс Wistar из Центра коллективного пользования «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем» (Санкт-Петербург, Институт физиологии имени И.П. Павлова РАН), содержавшиеся в стандартных условиях при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стан-

дартной диете в условиях искусственного освещения (12 ч свет/12 ч темнота).

Эксперименты проведены на крысах в возрасте 4 мес. ($n = 5$, масса 230 ± 25 г), 6 мес. ($n = 5$, 305 ± 15 г), 9 мес. ($n = 6$, 455 ± 25 г), 18 мес. ($n = 5$, 485 ± 20 г) и 24 мес. ($n = 7$, 515 ± 35 г). В эксперименте среднее артериальное давление (АД) (таблица) у наркотизированных хлоралгидратом (43 мг/100 г массы тела, внутривенно) крыс измеряли инвазивным методом через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlusTM (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к компьютеру.

Методом прижизненной микрофотосъемки [10] ($\times 470$) у каждого животного после трепанации в теменной области черепа фиксировали фоновое изображение пиальной сосудистой сети в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором Кребса (37°C) и реакцию артериальных сосудов на воздействие препаратов. Оценивали изменения в дилатации пиальных артерий по числу расширившихся участков сосудистой сети, дополнительно оценивали степень расширения артериальных сосудов. В качестве агониста эндотелий-зависимой вазодилатации использовали АХ [11] в концентрации 10^{-7} М, при орошении которым мягкой мозговой оболочки у молодых крыс наблюдали преимущественную дилатацию пиальных артерий [12]. Индуцированную АХ (10^{-7} М, 5 мин; Sigma, США) дилатацию считали базовой реакцией (100%) и с ней сравнивали результаты, полученные при действии АХ на фоне блокатора BK_{Ca} – хлорида тетраэтиламмония (ТЭА, «Вектон», Россия, 2 мМ, предварительное орошение поверхности мозга в течение 5 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора). У всех крыс регистрировали изображение пиальных артерий до и на фоне действия АХ, ТЭА и совместного действия ТЭА и АХ. Оценивали число сузившихся и дилатированных пиальных артерий и степень их реакции на воздействие АХ в каждой возрастной группе: у 4-, 6-, 9-, 18- и 24-месячных крыс. Проверка по критерию Краскела-Уоллеса показала отсутствие значимых различий между отдельными животными одного возраста в фоновых реакциях на воздействие АХ. Эксперимент длился 60–90 мин, после чего животных выводили из эксперимента передозировкой раствора хлоралгидрата.

Таблица

Показатели АД у крыс разного возраста

Возраст крыс	Показатели среднего АД, мм рт. ст.
4 мес. ($n = 5$)	100 ± 5
6 мес. ($n = 5$)	97 ± 4
9 мес. ($n = 6$)	95 ± 6
18 мес. ($n = 5$)	96 ± 4
24 мес. ($n = 7$)	92 ± 3

Диаметр сосудов измеряли на статических изображениях с помощью оригинальной компьютерной программы «Blood Vessel Media Analyzer» (© Denis Chouvaev, Швеция). В программе предусмотрен режим контраста и увеличения изображения, а также калибровки для пересчета всех координат в метрические единицы. У каждой крысы было измерено от 30 до 50 артериальных участков. Для анализа артерии были разделены на три группы в соответствии с их диаметрами: 1) <20 мкм (мелкие), 2) 20–40 мкм (средние) и 3) >40 мкм (крупные). В каждой возрастной группе примерно 30% артерий приходилось на мелкие, около 50% — на средние и 20% — на крупные сосуды; число проанализированных артерий в каждой из возрастных групп находилось в пределах 150–200. По изменению числа артерий, сузившихся в ответ на воздействие блокатора, судили об изменении вклада VK_{Ca} в базальный тонус сосудов с возрастом. Об изменении вклада VK_{Ca} в дилатацию артерий судили по изменению числа дилатированных сосудов и степени их дилатации в ответ на воздействие АХ на фоне ТЭА. Изменение числа расширившихся артерий выражали в процентах от общего числа исследованных артерий в группе с соответствующими диаметрами. Степень дилатации оценивали в процентах как разность между значениями диаметра после и до воздействия АХ, отнесенную к диаметру сосуда перед воздействием АХ. Изменения диаметра в покое в отсутствие каких-либо воздействий не превышали $5,0 \pm 0,5\%$, поэтому при таких значениях считали, что реакция на воздействие отсутствует.

Данные по отдельной группе артерий усреднялись для каждого животного и использовались для статистических сравнений. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США). Проверка экспериментальных данных на нормальность распределения проводилась с использованием критерия Колмогорова-Смирнова в программе InStat 3.02. В случае если хотя бы в одной из сравниваемых выборок отсутствовало нормальное распределение, для статистического анализа данных использовались непараметрические тесты: сравнение средних данных двух независимых выборок проводилось с использованием U-критерия Манна-Уитни, для сравнения нескольких выборок использовался критерий Краскела-Уоллиса (KW). Данные на графиках (боксплоты) представлены как медиана, минимум, максимум, проценти [25-й процентиль; 75-й процентиль]. Значимым уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Орошение поверхности головного мозга раствором АХ у крыс в возрасте 4 мес. вызывало дилатацию у 42% всех исследованных пиальных артерий, констрикцию — у 36%, а 22% артерий не изменяли

диаметр. В других возрастных группах наблюдалась сходная картина: дилатация и констрикция наблюдались в 30–40% случаев, а примерно 20% сосудов не изменяли диаметр. Такая гетерогенная реакция, как показывают наши многолетние исследования, характерна для пиальной сосудистой сети. Для анализа сосудистых реакций все исследованные артерии были распределены по группам в соответствии с их диаметрами. В литературе имеются сведения о том, что вклад калиевых каналов в сосудистые реакции неоднороден и варьируется в зависимости от размера сосудов [13], об этом свидетельствуют и наши предыдущие исследования [10, 14].

У 4-месячных крыс число расширившихся в ответ на воздействие АХ мелких и средних артерий составило 41,9 [33,3; 50,0] и 55,0% [30,0; 65,0] соответственно, крупных — 34,6% [31,6; 37,1] (рис. 1А). Степень АХ-опосредованных дилатаций от мелких к крупным пиальным артериям снижалась (рис. 1Б).

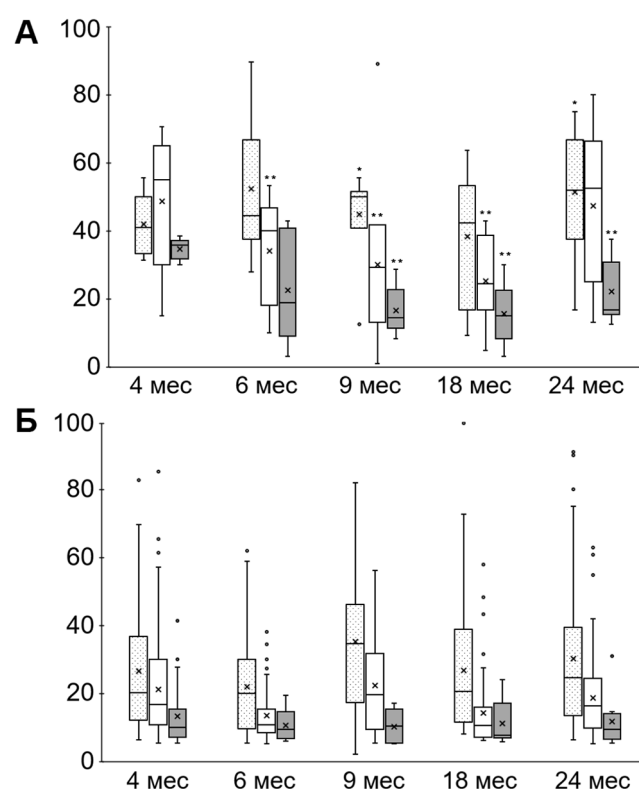


Рис. 1. АХ-индуцированная дилатация пиальных артерий у крыс разного возраста в группах сосудов с различными диаметрами. **А** — число дилатаций, **Б** — степень дилатаций. По оси ординат — число дилатаций, % от числа сосудов соответствующего диаметра (**А**), изменение диаметра сосудов относительно их диаметра перед воздействием АХ (**Б**). По оси абсцисс — возраст крыс, мес. Точечная штриховка — артерии диаметром <20 мкм, белая заливка — артерии диаметром 20–40 мкм, серая заливка — артерии диаметром >40 мкм. Различия между группами сосудов с одинаковым диаметром относительно соответствующих значений у 4-месячных крыс (парные сравнения) статистически значимы: * — $p < 0,05$.

Обозначения на рисунке: Верхняя и нижняя граница каждого прямоугольника — первый и третий квартили (25-й и 75-й процентиля) соответственно, поперечная линия внутри — медиана (50-й процентиль), крестик внутри — среднее арифметическое, концы отрезков — 10-й и 90-й процентиля, точки — выбросы.

Для изучения роли BK_{Ca} в индуцированной АХ дилатации пиальных артерий использовали блокатор BK_{Ca} – ТЭА – в миллимолярной концентрации. В каждой возрастной группе сравнивали изменение реакции артерий определенного калибра на АХ (по числу дилатированных артерий и степени их дилатации) на фоне блокады BK_{Ca} с числом и степенью дилатаций в ответ на воздействие АХ перед применением блокатора. Значения указанных параметров перед применением блокатора принимали за 100% (базовый тест на АХ).

На фоне блокады BK_{Ca} у крыс в возрасте 4 мес. уменьшилось число АХ-индуцированных дилатаций артерий всех диаметров (рис. 2) по сравнению с их числом до блокады BK_{Ca} . Максимальное уменьшение числа дилатаций до 55,6% [42,2; 68,9], наблюдалось в мелких сосудах. Число дилатированных средних и крупных артерий на фоне блокады BK_{Ca} снизилось в меньшей степени: до 81,3% [80,7; 81,8]) и до 78,4% [74,6; 82,1] соответственно. Степень дилатации на фоне блокады в сравнении с ответом на воздействие АХ в отсутствие блокады BK_{Ca} (рис. 3) сильнее всего снизилась у крупных сосудов до 59,8% [55,5; 62,7]). У мелких и средних артерий она снижалась до 71,5% [67,7; 75,5] и до 74,7% [73,0; 76,4] соответственно.

У крыс в возрасте 6 мес. общее число дилатированных в ответ на воздействие АХ артерий составило 43%. Сопоставление реакций артерий разных диаметров на воздействие АХ показало, что наибольшее число АХ-опосредованных дилатаций наблюдалось в группе мелких (44,4% [37,5; 66,6]) и средних артерий (40,0% [18,0; 46,7]), число расширившихся крупных артерий составило 18,8% [8,3; 40,7] (рис. 1А). Степень дилатации артерий всех диаметров у 6-месячных крыс, а также у крыс в возрасте 9–24 мес. достоверно не отличалась от аналогичных показателей у крыс в возрасте 4 мес. (рис. 1Б), снижаясь от мелких к крупным сосудам у крыс одного возраста.

На фоне блокады BK_{Ca} число АХ-индуцированных дилатаций мелких артерий у 6-месячных крыс снизилось до 71,4% [63,4; 81,0], а их степень не менялась, тогда как степень дилатации средних и крупных сосудов незначительно снизилась, соответственно, до 90,2 [88,0; 91,6] и 90,0% [84,6; 93,1] при неизменном числе дилатаций средних и небольшом увеличении числа дилатаций крупных артерий до 112,5% [97,6; 113,7] (рис. 2, 3).

У 9-месячных крыс число дилатированных в ответ на воздействие АХ артерий составило 35%. Сопоставление реакций на воздействие АХ артерий различных диаметров показало, что наибольшее число дилатаций приходится на мелкие артерии – 50% [40,6; 51,4]. Число дилатированных средних и крупных артерий составило 29,2 [12,5; 41,7] и 14,3% [11,3; 22,6] соответственно (рис. 1А).

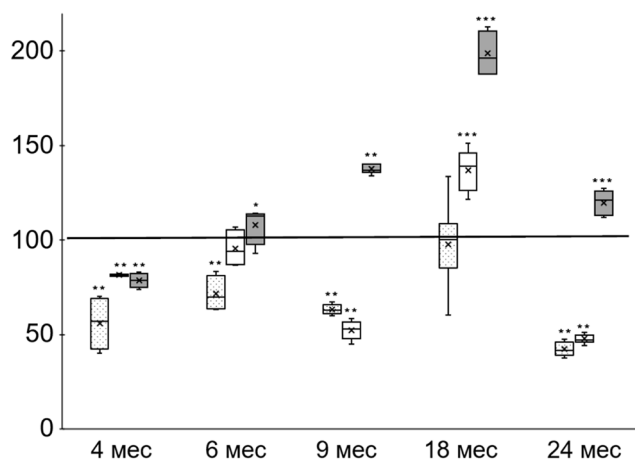


Рис. 2. Число АХ-индуцированных дилатаций пиальных артерий разного диаметра в каждой возрастной группе после блокады BK_{Ca} -каналов относительно числа АХ-индуцированных дилатаций артерий того же калибра в отсутствие блокады. По оси ординат – число дилатаций в ответ на АХ на фоне блокады BK_{Ca} относительно числа дилатаций в ответ на АХ перед блокадой, %. По оси абсцисс – возраст крыс, мес. Прямая линия 100% – число АХ-индуцированных дилатаций в отсутствие блокады. Точечная штриховка – артерии диаметром < 20 мкм, белая заливка – артерии диаметром 20–40 мкм, серая заливка – артерии диаметром > 40 мкм. Различия статистически значимы относительно значений перед блокадой: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

Обозначения на рисунке: Верхняя и нижняя граница каждого прямоугольника – первый и третий квартили (25-й и 75-й процентиля) соответственно, поперечная линия внутри – медиана (50-й процентиль), крестик внутри – среднее арифметическое, концы отрезков – 10-й и 90-й процентиля, точки – выбросы.

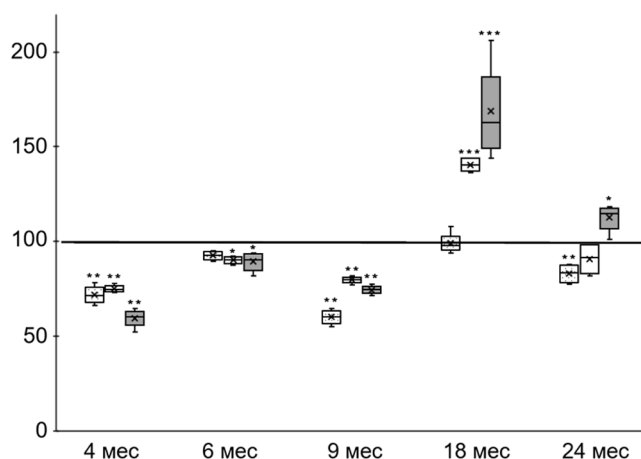


Рис. 3. Степень дилатации пиальных артерий в ответ на АХ в каждой возрастной группе в группах сосудов с различными диаметрами на фоне блокады BK_{Ca} -каналов относительно степени дилатации артерий того же калибра в ответ на АХ в отсутствие блокады. По оси ординат – изменение диаметра сосудов в ответ на АХ при блокаде BK_{Ca} относительно изменения их диаметра в ответ на АХ перед блокадой BK_{Ca} , %. По оси абсцисс – возраст крыс, мес. Прямая линия 100% – степень АХ-индуцированных дилатаций в отсутствие блокады. Точечная штриховка – артерии диаметром < 20 мкм, белая заливка – артерии диаметром 20–40 мкм, серая заливка – артерии диаметром > 40 мкм. Различия статистически значимы относительно значений перед блокадой: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

Обозначения на рисунке те же, что на рис. 2.

У 9-месячных крыс на фоне блокады $ВК_{Ca}$ АХ-индуцированная дилатация мелких и средних артерий снизилась: число дилатированных мелких артерий уменьшилось до 62,9 [61,0; 65,5], средних артерий — до 53,0 [47,8; 56,6], в то время как число дилатированных крупных артерий увеличилось до 137,3% [135,6; 140,0] по сравнению с соответствующим числом дилатаций в ответ на воздействие АХ в отсутствие блокады (рис. 2). Степень дилатации при этом во всех группах артерий снижалась (рис. 3): до 59,9 [56,5; 63,3] у мелких артерий, до 79,8 [78,2; 81,0] — у средних и до 74,4% [72,3; 75,9] — у крупных.

У достигших 18-месячного возраста крыс общее число артерий, расширившихся в ответ на воздействие АХ, составило 26%. Наибольшее число АХ-индуцированных дилатаций отмечено в группе мелких артерий 42,2% [16,6; 53,2]. Число дилатированных средних и крупных артерий составило 25,2 [16,6; 38,6] и 15,5% [8,3; 22,5] соответственно (рис. 1А).

На фоне блокады $ВК_{Ca}$ у 18-месячных крыс АХ-индуцированная дилатация мелких артерий не изменялась: число дилатированных артерий и степень дилатации остались такими же, как до блокады $ВК_{Ca}$ (рис. 2, 3). Число дилатированных средних артерий увеличилось до 138,9 [126,2; 145,8] и крупных — до 196,1% [187,7; 210,3] по сравнению с таковым до воздействия блокатора, степень дилатации также увеличилась — до 140,3 [137,1; 143,6] у средних и до 162,5% [149,5; 186,5] у крупных артерий по сравнению со значениями данных показателей до блокады.

В возрасте 24 мес. у крыс в ответ на воздействие АХ расширилось 43% всех исследованных артерий. Сопоставление реакций на воздействие АХ по группам артерий различных диаметров показало, что у животных этого возраста расширялись преимущественно мелкие (51,2% [37,5; 66,6]) и средние артерии (52,5% [25,0; 66,3]) число расширившихся крупных артерий составило 16,7% [15,4; 30,8] (рис. 1А).

На фоне блокады $ВК_{Ca}$ число АХ-индуцированных дилатаций мелких и средних артерий уменьшилось, соответственно, до 42,2 [38,8; 45,8]) и до 47,5% [46,1; 49,6], а крупных — увеличилось до 120,8% [113,0; 125,6] по сравнению с базовым тестом на АХ (рис. 2). Степень дилатации достоверно не изменялась относительно соответствующих значений до блокады $ВК_{Ca}$ -каналов в группе средних артерий, в группе мелких снизилась до 82,9 [78,1; 87,4] и увеличилась до 114,4% [106,7; 117,2] у крупных артерий (рис. 3). Такая неоднозначная реакция сосудов разного диаметра может быть обусловлена как их разным миогенным тонусом, так, вероятно, и различной плотностью $ВК_{Ca}$. Поскольку $ВК_{Ca}$ являются нижестоящим эффектором и для NO [5], и для EDHF [8], а NO и EDHF по-разному представлены в сосудах

разного калибра [13], это может влиять на реакцию сосудов. Изменение активности $ВК_{Ca}$, в свою очередь, может стимулировать либо ограничивать NO-зависимую дилатацию [9]. Для дилатации важно также продольное распространение гиперполяризующего тока [15].

Характерной особенностью реакции пиальной сосудистой сети на воздействия является не только изменение степени реакции сосуда, но и вовлечение новых участков в сосудистый ответ. В наших экспериментах в ряде случаев не наблюдалось значительных различий в степени дилатации сосудов, тогда как число расширившихся участков увеличивалось, поэтому основное внимание было уделено оценке числа расширившихся сосудов. По изменению числа расширившихся в ответ на воздействие АХ артерий на фоне блокады $ВК_{Ca}$ судили о вкладе последних в дилатацию сосудов разных калибров у крыс разного возраста. Исследование возрастных изменений в АХ-индуцированной дилатации пиальных артерий на фоне блокады $ВК_{Ca}$ показало, что по сравнению с 4-месячными крысами у 6- и 18-месячных снижен вклад $ВК_{Ca}$ в дилатацию мелких, у 9- и 24-месячных увеличен вклад $ВК_{Ca}$ -каналов в дилатацию средних артерий, а вклад $ВК_{Ca}$ в дилатацию крупных артерий снижается, начиная с 6-месячного возраста.

Артерии мягкой мозговой оболочки обеспечивают распределение мозгового кровотока и компенсацию последствий снижения системного АД в дополнение к функциям магистральных артерий, отвечающих за стабилизацию величины мозгового кровотока при изменении АД. Мелкие пиальные артерии ответственны за регуляцию притока крови во внутримозговые сосуды, тогда как для пиальных артерий среднего калибра характерна функция перераспределения кровотока в зависимости от потребностей того или иного участка мозга [12, 16]. Базальные нейроны переднего мозга увеличивают кровоток в коре, высвобождая АХ, который стимулирует эндотелиальные клетки (ЭК) к выработке вазодилаторов [17]. Учитывая воздействие АХ непосредственно на ЭК, мы использовали его в качестве вазодилаторного агента [11].

АХ вызывал дилатацию пиальных артериальных сосудов в 30–50% случаев, при этом степень дилатации снижалась от мелких к более крупным сосудам во всех возрастных группах (рис. 1Б). По сравнению с молодыми 4-месячными крысами число АХ-индуцированных дилатаций изменялось с возрастом, при этом реакции артерий малого, среднего и большого диаметров изменялись по-разному.

Так, у 6-месячных крыс при примерно одинаковой с 4-месячными крысами степени дилатации число дилатированных средних артерий было меньше (рис. 1А, Б). В возрасте 9 мес. эта тенден-

ция усиливалась: число дилатированных не только средних, но и крупных артерий снижалось по сравнению с таковым у 4-месячных крыс. Следовательно, изменения в реакциях пиальной сосудистой сети начинают проявляться уже в 6 мес. и сохраняются в более старшем возрасте. Дальнейшее старение, вплоть до 24 мес., практически не влияло на степень АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий. В 18-месячном возрасте были отмечены более значительные изменения: значительно уменьшалось общее число АХ-индуцированных дилатаций (26% по сравнению с 42% у 4-месячных и с 35% — у 9-месячных), преимущественно за счет снижения числа дилатаций средних и крупных артерий. Число дилатаций мелких артерий соответствовало значениям у 4-месячных крыс. Указанные изменения свидетельствуют о нарушении эндотелий-зависимой регуляции тонуса средних и крупных пиальных артерий на этом этапе старения. У крыс в возрасте 24 мес. число расширившихся мелких артерий было значительно больше, а крупных — меньше, чем у 4-месячных крыс. Следовательно, снижение роли АХ-опосредованных механизмов в дилатации пиальных артерий диаметром более 20 мкм и повышение роли этих механизмов в дилататорной реакции мелких пиальных артерий у крыс может обуславливать возрастные изменения мозгового кровотока, связанные с функционированием пиальной сосудистой сети [18, 19].

Эндотелий кровеносных сосудов играет решающую роль в регуляции кровотока, контролируя механические функции гладких мышц артерий [20]. Регуляция эндотелием релаксации и сокращения гладких мышц сосудов в основном достигается за счет высвобождения вазоактивных веществ, преимущественно NO, который оказывает расслабляющее действие на кровеносные сосуды через активацию растворимой гуанилатциклазы. Исследования механизмов релаксирующего действия NO на кровеносные сосуды выявили роль $ВК_{Ca}$ в гладких мышцах в качестве одного из нижестоящих эффекторов NO [5]. Как упоминалось выше, NO через посредничество протеинкиназы G участвует в активации $ВК_{Ca}$, что в итоге вызывает гиперполяризацию и расслабление ГМК [7]. Существует сложное взаимодействие между многочисленными эндотелиальными сосудорасширяющими механизмами, которое позволяет поддерживать эндотелий-зависимую вазодилатацию. Например, при снижении биодоступности NO и/или простагландинов происходит усиление механизмов вазодилатации, зависящих от EDHF, особенно в микроциркуляции [8]. Указывается также, что при уменьшении синтеза NO, остаточная дилатация происходит благодаря увеличенной выработке простагличина, который играет компенсаторную роль в механизме вазодилатации в условиях дефицита

NO [21]. Простагличин, связываясь со специфическими рецепторами ГМК, активирует аденилатциклазу, которая индуцирует синтез цАМФ, а цАМФ активирует протеинкиназу A, что в конечном счете ведет к расслаблению гладкой мускулатуры. При этом происходит открытие одного или нескольких типов калиевых каналов. Таким образом, образование простагличина ЭК синергично дополняет дилататорные реакции, обусловленные системой NO [22].

Сама структура $ВК_{Ca}$ определяет значительное функциональное разнообразие их подтипов, экспрессируемых в различных тканях. Различия в степени связывания α - и β -субъединиц канала обуславливают гетерогенность Ca^{2+} -чувствительности $ВК_{Ca}$ между сосудистыми ГМК и внутри них в различных органах и тканях. $ВК_{Ca}$ активны в условиях покоя, вносят вклад в мембранный потенциал и участвуют в регуляции миогенного тонуса по принципу отрицательной обратной связи, что было показано *in vivo* в экспериментах с использованием ТЭА в качестве блокатора $ВК_{Ca}$ для артериол трапецевидной мышцы (*musculus trapezius*) крыс и человека [4]. С другой стороны, ряд работ в конце 90-х гг. продемонстрировал, что ТЭА в концентрации 1 ммоль/л не влияет на диаметр пиальных артериол крыс *in vivo*, несмотря на значительный миогенный тонус в покое [23, 24]. Отмечается, что действие ТЭА на тонус сосудов имеет существенные видовые и регионарные различия [4]. Поэтому роль $ВК_{Ca}$ сосудистых ГМК в поддержании миогенного тонуса и в вазоактивных реакциях в системном сосудистом русле не вполне ясна. Однако наше предыдущее исследование [14] четко продемонстрировало, что аппликация ТЭА вызывает констрикцию 65% мелких пиальных артерий и в среднем около 40% средних и крупных артерий у крыс в возрасте 4 мес., что свидетельствует об участии $ВК_{Ca}$ в регуляции сокращения-расслабления ГМК в этих сосудах. В настоящем исследовании аппликация ТЭА вызывала констрикцию 63% всех проанализированных пиальных артерий у 4-месячных крыс, 40% — у 6-месячных, 60% — у 9-месячных, 40% — у 18-месячных и 50% — у 24-месячных.

В данном исследовании установлено, что число и амплитуда АХ-опосредованных дилатаций артерий, предварительно подвергнутых воздействию ТЭА, у 4-месячных крыс в группах артерий всех исследованных нами диаметров снижается по сравнению с базовым АХ-тестом в отсутствие блокады (рис. 2, 3). Эти результаты указывают на участие $ВК_{Ca}$ в АХ-индуцированной дилатации пиальных артерий наряду с другими факторами. У 6-месячных крыс число дилатаций артерий в ответ на воздействие АХ на фоне действия ТЭА снижалось только в группе мелких артерий (на 30%), но в значительно меньшей степени, чем у 4-месячных крыс (на 44%), сни-

жение степени дилатации также было менее выраженным по сравнению с таковым у 4-месячных крыс. Число дилатаций крупных артерий по сравнению с их числом в реакции на воздействие АХ в отсутствие блокады $ВК_{Ca}$ и с аналогичным показателем у 4-месячных животных увеличивалось. У крыс в возрасте 9 мес. число АХ-индуцированных дилатаций мелких артерий на фоне введения ТЭА соответствовало значениям у 4-месячных животных, а средних — уменьшалось в более значительной степени, чем у молодых крыс. Это может указывать на то, что $ВК_{Ca}$ не играют существенной роли в АХ-индуцированной дилатации средних артерий у 6-месячных крыс, тогда как в возрасте 9 мес. они вносят значительный вклад в дилатацию как мелких, так и средних пиальных артерий. Однако у 9-месячных крыс, также как и у животных в возрасте 6 мес., на фоне ТЭА увеличивалось число АХ-индуцированных дилатаций крупных артерий по сравнению с их числом до блокады. В возрасте 18 мес. увеличение числа и степени дилатаций в ответ на воздействие АХ наблюдалось уже не только в крупных, но и в средних артериях. У 24-месячных крыс на фоне блокады $ВК_{Ca}$ число дилатаций крупных артерий также увеличивалось. Как уже указывалось [14], активация $ВК_{Ca}$ внутриклеточными — локальными — токами («искрами») Ca^{2+} гиперполяризует мембрану ГМК, снижая активность потенциал-зависимых кальциевых каналов и ограничивая приток Ca^{2+} в клетку, тем самым способствуя релаксации ГМК и расширению сосудов. $ВК_{Ca}$ регулируются различными факторами, которые могут изменять условия их открытия, чувствительность к Ca^{2+} и экспрессию субъединиц. С увеличением возраста экспрессия и функции $ВК_{Ca}$ изменяются [3]. В силу того, что у старых животных открыто больше K^+ -каналов, блокада этих каналов, предотвращая диссипацию электрического сигнала путем изменения сопротивления клеточной мембраны, может приводить к восстановлению и даже увеличению продольной проводимости сигнала, и, как следствие, к увеличению дилатации [24–26]. Показано [15], что активированные $ВК_{Ca}$ снижают эффективность проводимой дилатации. Из этого следует, что при ингибировании этих каналов проводимая дилатация будет усиливаться. Полученные нами данные показывают, что старение у крыс сопровождается изменением вклада $ВК_{Ca}$ в АХ-опосредованную дилатацию пиальных артерий диаметром более 20 мкм. Уже с 6-месячного возраста и в процессе дальнейшего старения крыс эти каналы практически не участвуют в дилататорном ответе крупных артерий на воздействие АХ (диаметром > 40 мкм).

У 9- и 24-месячных крыс блокада $ВК_{Ca}$ приводит к уменьшению числа АХ-индуцированных дилатаций средних сосудов (20–40 мкм) в значитель-

но большей степени, чем у 4-месячных животных, что свидетельствует об увеличении вклада этих каналов в дилатацию средних артерий. Это, возможно, является компенсаторным механизмом регуляции притока и перераспределения крови в условиях нарушения регуляции тонуса крупных артерий. Число дилатаций мелких артерий у 6- и 18-месячных крыс на фоне блокады $ВК_{Ca}$ было больше по сравнению с аналогичными показателями у 4-месячных крыс, т.е. на фоне блокады $ВК_{Ca}$ снижение числа дилатаций мелких артерий у 6- и 18-месячных крыс выражено в меньшей степени, чем у 4-месячных, что указывает на снижение вклада этих каналов в дилатацию мелких артерий (< 20 мкм). Таким образом, можно говорить о зависимости вклада $ВК_{Ca}$ в регуляцию дилатации пиальных артерий как от возраста, так и от калибра сосудов.

Заключение

Можно констатировать, что дилатация пиальных артерий крыс Wistar в возрасте 4–24 мес. зависит от начального диаметра сосуда. Значительную роль в АХ-опосредованной дилатации этих сосудов играют $ВК_{Ca}$. Возрастные нарушения вклада этих каналов в АХ-опосредованную дилатацию пиальных артерий развиваются постепенно и имеют волнообразное течение. По сравнению с 4-месячными крысами у 6- и 18-месячных снижается вклад $ВК_{Ca}$ в дилатацию пиальных артерий диаметром менее 20 мкм. Изменения регуляции пиальных артерий диаметром 20–40 мкм проявляются в увеличении вклада $ВК_{Ca}$ в дилатацию этих сосудов у 9- и 24-месячных крыс по сравнению с 4-месячными. Также с возрастом снижается вклад $ВК_{Ca}$ в дилатацию артерий диаметром более 40 мкм: уже у 6-месячных крыс, они практически не участвуют в дилататорном ответе на воздействие АХ. Выявленные нарушения функциональной активности калиевых каналов могут служить терапевтическими мишенями для создания новых технологий лечения возрастных поражений церебральных сосудов.

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания Института физиологии имени И.П. Павлова РАН (№1021062411784-3-3.1.8). Все процедуры, выполненные на животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии имени И.П. Павлова РАН (протокол № 12/26 от 26.12.2022 г.). Все международные, национальные и/или институциональные принципы содержания и использования животных были соблюдены. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мадьянова В.В. Болезни системы кровообращения у пожилых в России: динамика показателей заболеваемости и смертности. *Пробл. стандарт. здравоохран.* 2020;(11–12):44–52.
2. Chennupati R., Lamers W.H., Koehler S.T., De Mey G.R. Endothelium-dependent hyperpolarization-related relaxations diminish with age in murine saphenous arteries of both sexes. *Br. J. Pharmacol.* 2013;169(7):1486–1499.
3. Carvalho-de-Souza J.L., Varanda W.A., Tostes R.C., Chignalia A.Z. BK Channels in cardiovascular diseases and aging. *Aging Dis.* 2013;4(1):38–49.
4. Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr. Physiol.* 2017;7(2):485–581.
5. Tanaka Y., Koike K., Toro L. Maxi K channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *J. Smooth Muscle Res.* 2004;40(4–5):125–153.
6. Jackson W.F. Calcium-dependent ion channels and the regulation of arteriolar myogenic tone. *Front. Physiol.* 2021;12:770450.
7. Hofmann F., Bernhard D., Lukowski R., Weinmeister P. cGMP regulated protein kinases (cGK). *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 191. Eds. H.H.H.W. Schmidt, F. Hofmann and J.P. Stasch. Berlin; Heidelberg: Springer; 2009:137–162.
8. Serviente C., Berry C.W., Kenney W.L., Alexander L.M. Healthy active older adults have enhanced K⁺ channel-dependent endothelial vasodilatory mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2020;319(1):R19–R25.
9. Schmid J., Müller B., Heppeler D., Gaynullina D., Kassmann M., Gagov H., Mladenov M., Gollasch M., Schubert R. The unexpected role of calcium-activated potassium channels: limitation of NO-induced arterial relaxation. *J. Am. Heart Assoc.* 2018;7(7):e007808.
10. Shuvaeva V.N., Gorshkova O.P. Contribution of IK_{Ca}-channels to dilatation of pial arteries in young rats after ischemia/reperfusion. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022;58(6):1926–1936.
11. Sandow S.L., Senadheera S., Grayson T.H., Welsh D.G., Murphy T.V. Calcium and endothelium-mediated vasodilator signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012;740:811–831.
12. Шуваева В.Н., Горшкова О.П. Модуляция тонуса церебральных артерий ацетилхолином у крыс разных линий. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2018;104(7):807–816.
13. Davis C.M., Siler D.A., Alkayed N.J. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: influence of sex, vessel size and disease state. *Womens Health (Lond.)*. 2011;7(3):293–303.
14. Shuvaeva V.N., Gorshkova O.P. AgeRelated Changes in the contribution of nitric oxide and potassium channels to dilation of rat pial arteries. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2021;57(6):1408–1418.
15. Beleznaï T.Z., Yarova P.L., Yuill K.H., Dora K.A. Smooth muscle Ca²⁺-activated and voltagegated K⁺ channels modulate conducted dilation in rat isolated small mesenteric arteries. *Microcircul.* 2011;18(6):487–500.
16. Черваев А.А., Буцких М.Г., Галагудза М.М. Механизмы нейрососудистого сопряжения. *Рег. кровообр. микроциркул.* 2023;22(2):67–73.
17. Zuccolo E., Lim D., Kheder D.A., Perna A., Catarisi P., Botta L., Rosti V., Riboni L., Sancini G., Tanzi F., D'Angelo E., Guerra G., Moccia F. Acetylcholine induces intracellular Ca²⁺ oscillations and nitric oxide release in mouse brain endothelial cells. *Cell Calcium.* 2017;66:33–47.
18. Gorshkova O.P. Age-related changes in the indices of cerebral blood flow velocity in rats. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2022;58(3):894–900.
19. Gorshkova O.P. Changes in rat cerebral blood flow velocities at different stages of aging. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2023;59(2):569–576.
20. Krüger-Genge A., Blocki A., Franke R.P., Jung F. Vascular endothelial cell biology: An update. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(18):4411.
21. Mitchell J.A., Kirkby N.S. Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* 2018;176(8):1038–1050.
22. Иванов А.Н., Попыхова Э.Б., Терешкина Н.Е., Степанова Т.В., Злобина О.В., Норкин И.А. Вазомоторная функция эндотелия. *Усп. физиол. наук.* 2020;51(4):82–104.
23. Lang M.G., Paterno R., Faraci F.M., Heistad D.D. Mechanisms of adrenomedullin-induced dilatation of cerebral arterioles. *Stroke.* 1997;28(1):181–185.
24. Sobey C.G., Heistad D.D., Faraci F.M. Potassium channels mediate dilatation of cerebral arterioles in response to arachidonate. *Am. J. Physiol.* 1998;275(5):H1606–H1612.
25. Behringer E.J., Shaw R.L., Westcott E.B., Socha M.J., Segal S.S. Aging impairs electrical conduction along endothelium of resistance arteries through enhanced Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013;33(8):1892–1901.
26. Behringer E.J., Segal S.S. Tuning electrical conduction along endothelial tubes of resistance arteries through Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ. Res.* 2012;110(10):1311–1321.

Поступила в редакцию 04.10.2023

После доработки 05.03.2024

Принята в печать 16.03.2024

RESEARCH ARTICLE

Role of BK_{Ca} channels in pial vessel dilation in rats of different agesV.N. Shuvaeva* , O.P. Gorshkova 

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, Makarov emb., 6, St. Petersburg, 199034, Russia

*e-mail: shuvaevavn@infran.ru

Studying the mechanisms of age-related changes in vascular reactions and applying the acquired knowledge in the clinic can help reduce complications and mortality from diseases of the cardiovascular system, the frequency of which increases with age. This study is important

because with aging, endothelial dysfunction increases and cerebral circulation disorders caused by the occurrence of ischemic foci are observed. One of the main elements in the regulation of vascular tone, along with many important mechanisms, are potassium ion channels. In this work, we studied age-related changes in the role of calcium-activated potassium channels (BK_{Ca}) in acetylcholine-mediated dilatation of cerebral arteries in Wistar rats, since their contribution to vasodilation in aging is poorly understood. Using intravital microphotography ($\times 470$), we compared the responses of pial arteries to acetylcholine chloride (ACh, 10^{-7} M, 5 min) in the absence and against the background of BK_{Ca} blockade with tetraethylammonium chloride (TEA, 2 mM, 5 min) in aged Wistar rats 4, 6, 9, 18 and 24 months. Changes in the contribution of BK_{Ca} to vascular dilatation were assessed by changes in the number of dilatations of the pial arteries on the exposure to ACh after BK_{Ca} blockade, measuring the width of vessels in 3 separate groups of arteries: small (with a diameter of less than 20 μ m), medium (20–40 μ m) and large (more than 40 μ m). It has been shown that ACh-induced dilatation depends on the initial diameter of the arteries. Inhibition of BK_{Ca} activity in 4-month-old rats reduces the number of ACh-induced dilatations in all groups of arteries studied. Compared to 4-month-old rats, in 6- and 18-month-old rats the contribution of BK_{Ca} channels to the dilatation of small arteries is reduced, in 9- and 24-month-old rats the contribution of BK_{Ca} channels to the dilatation of medium arteries is increased; the contribution of BK_{Ca} to the dilatation of large arteries decreases starting from 6 months of age. Dilatation of the pial arteries of Wistar rats at the age of 4–24 months depends on the initial diameter of the vessel. BK_{Ca} play a significant role in ACh-mediated dilatation of these vessels. Age-related impairments in the contribution of these channels to ACh-mediated dilatation of pial arteries develop gradually, have a wave-like course and depend on the diameter of the arteries. The identified disturbances in the functional activity of the BK_{Ca} can serve as therapeutic targets for the creation of new technologies for the treatment of age-related lesions of cerebral vessels.

Keywords: *aging, pial arteries, vasodilation, acetylcholine, calcium-activated potassium channels of large conductance, vascular smooth muscle cells*

Funding: This study was supported by the State funding allocated to the Pavlov Institute of Physiology Russian Academy of Sciences (N 1021062411784-3-3.1.8).

Сведения об авторах

Шуваева Вера Николаевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Тел.: 8-813-707-25-53; e-mail: shuvaevavn@infran.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8517-7467>.

Горшкова Оксана Петровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Тел.: 8-813-707-25-53; e-mail: gorshkovao@infran.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8026-6161>.