

## ИЗМЕНЕНИЕ ВКЛАДА $IK_{Ca}$ -КАНАЛОВ В ПОДДЕРЖАНИЕ ТОНУСА И ДИЛАТАЦИЮ ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ У СТАРЕЮЩИХ КРЫС ПОСЛЕ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ

© 2022 г. О. П. Горшкова<sup>1</sup>, \*, И. Б. Соколова<sup>1</sup>

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

\*E-mail: o\_gorshkova@inbox.ru

Поступила в редакцию 26.01.2022 г.

После доработки 24.02.2022 г.

Принята к публикации 15.03.2022 г.

В основе нарушения мозгового кровотока после ишемии/реперфузии (И/Р) может лежать эндотелиальная дисфункция, связанная с нарушением функциональной активности кальций-чувствительных калиевых каналов промежуточной проводимости ( $IK_{Ca}$ ). Однако данные об изменениях функциональной активности  $IK_{Ca}$ -каналов в сосудах головного мозга после И/Р немногочисленны и противоречивы. Старение сопровождается изменением вклада  $IK_{Ca}$ -каналов в эндотелий-зависимую дилатацию мозговых сосудов, что может нарушать перфузию и ухудшать процессы восстановления мозгового кровотока после перенесенной ишемии. В работе исследовали изменение вклада  $IK_{Ca}$ -каналов в поддержание тонуса и опосредованную ацетилхолином дилатацию пиальных артерий крыс Спрег–Доули в возрасте 18 месяцев после перенесенной однократной И/Р (перезажитие обеих сонных артерий с одновременным снижением и строгим поддержанием среднего АД на уровне  $45 \pm 2$  мм рт. ст. на 12 мин). Исследование сосудов проводили через 7, 14 и 21 день после И/Р. С использованием метода прижизненной микрофотосъемки оценивали реакции артерий у крыс, перенесших ишемию, и ложноперированных животных. Об изменении вклада  $IK_{Ca}$ -каналов в поддержание тонуса судили по изменению числа сосудов, сузившихся в ответ на воздействие блокатора  $IK_{Ca}$ -каналов (клотримазола,  $10^{-7}$  М, 5 мин). Изменение вклада каналов в дилатацию сосудов оценивали путем сравнения числа и степени дилатации артерий в ответ на действие ацетилхолин хлорида (АХ,  $10^{-7}$  М, 8 мин) до и после применения клотримазола. Установлено, что И/Р коры головного мозга у крыс в возрасте 18 месяцев приводит к уменьшению числа дилатаций пиальных артерий на воздействие АХ, которое сохраняется на протяжении первых 14 дней после ишемии. В этот отрезок постишемического периода вклад  $IK_{Ca}$ -каналов в поддержание тонуса пиальных артерий и АХ-опосредованную дилатацию также снижается. Снижение вклада  $IK_{Ca}$ -каналов в осуществление дилататорного ответа наблюдается уже через 7 дней после И/Р, а через 14 дней эти каналы практически не участвуют в АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий. К 21-му дню после И/Р все исследованные процессы восстанавливаются.

**Ключевые слова:**  $IK_{Ca}$ -калиевые каналы, ишемия головного мозга, пиальные артерии, эндотелиальная дисфункция

DOI: 10.31857/S0869813922050065

Ишемическое поражение головного мозга — одно из наиболее распространенных патологических состояний, значительным фактором риска развития которого

является возраст. Временное прекращение кровоснабжения мозга вызывает дисбаланс метаболических процессов, приводящий к тканевой гипоксии. Последующая реперфузия не всегда сопровождается восстановлением нормального кровотока и часто приводит к дополнительным повреждениям. Вопросы взаимосвязи между первичным ишемическим поражением и последующими процессами, происходящими в церебральной сосудистой сети, к настоящему времени изучены недостаточно.

В изменениях мозгового кровотока после ишемии/реперфузии (И/Р) большая роль принадлежит развитию эндотелиальной дисфункции в стенке мозговых сосудов, обусловленной нарушениями NO-опосредованных механизмов сосудистой регуляции [1–3]. В качестве параллельного компенсаторного сосудорасширяющего пути в этих условиях может выступать эндотелиальная гиперполяризация (EDH) [1, 4, 5]. Механизм развития EDH в настоящее время до конца не выяснен. Считается, что возникновение EDH связано с действием некоторых веществ, продуцируемых эндотелием (так называемых факторов EDH), которые активируют расположенные в эндотелии сосудов кальций-чувствительные калиевые каналы. Усиление выхода ионов калия из клеток эндотелия через эти каналы приводит к гиперполяризации мембраны гладкомышечных клеток, их расслаблению и вазодилатации [3, 6]. Значительная роль в возникновении EDH отводится кальций-чувствительным калиевым каналам промежуточной проводимости ( $IK_{Ca}$ ) [1, 4, 5]. В то же время многие исследователи утверждают, что источником EDH могут быть процессы, связанные с возникновением электрической связи между эндотелием и мышечной тканью через электрические щелевые каналы без участия генерации химических медиаторов [7]. Старение – это сложный процесс, в частности связанный с клеточными, метаболическими и структурными изменениями в сосудах головного мозга [8, 9], приводящими к развитию дисфункции сосудистых эндотелиальных клеток. Согласно данным, полученным нами в предыдущих экспериментах [10], а также результатам других авторов [6, 11], старение сопровождается изменением вклада  $IK_{Ca}$ -каналов в эндотелий-зависимую дилатацию сосудов головного мозга, что может приводить к нарушению перфузии мозга и способствовать ухудшению процессов восстановления мозгового кровотока после перенесенной И/Р.

После окклюзии крупных сосудов участок мозга, подвергшийся ишемии, остается жизнеспособным за счет коллатерального кровотока [12]. Церебральные коллатерали являются вспомогательными сосудистыми путями, которые могут частично поддерживать приток крови к ткани, подвергшейся ишемии, при блокировании первичных сосудистых путей [12, 13]. Пиальные коллатерали представляют собой анастомотические соединения на кортикальной поверхности, соединяющие дистальные ветви передней и задней мозговой артерии с дистальными ветвями средней мозговой артерии [12]. Кровоток через пиальные коллатерали определяет степень ишемического поражения коры головного мозга и влияет на процессы восстановления.

Таким образом, нарушение процессов регуляции тонуса пиальных артерий и старение являются критическими факторами в определении исхода и последствий острой ишемии головного мозга. Поэтому целью данной работы было изучение вклада  $IK_{Ca}$ -каналов в регуляцию тонуса пиальных артерий после перенесенной ишемии/реперфузии у стареющих животных. В задачи исследования входило изучение изменения вклада  $IK_{Ca}$ -каналов в поддержание тонуса и осуществление опосредованной ацетилхолином (АХ) дилатации пиальных артерий у крыс в возрасте 18 месяцев на разных сроках постишемического периода (через 7, 14 и 21 день после перенесенной ишемии коры головного мозга).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на 18-месячных самцах крыс Спрег–Дули ( $n = 41$ ) массой 450–670 г из центра коллективного пользования “Биоколлекция ИФ РАН”. Работа выполнена в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, принятыми Европейской конвенцией 19.07.2014, и требованиями Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения (цикл: 12 ч свет/12 ч темнота).

Ишемия коры головного мозга воспроизводилась с использованием техники окклюзии двух сосудов с управляемой гипотензией, известной в англоязычной литературе как “2-vessel occlusion + hypotension model”, с авторскими модификациями [14]. У наркотизированных хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 43 мг/100 г массы тела) крыс проводилась 12-минутная окклюзия обеих сонных артерий с одновременной управляемой гипотензией (снижение и строгое поддержание артериального давления (АД) на уровне  $45 \pm 2$  мм рт. ст. путем забора/реинфузии крови (0.8–1.2 мл/100 г массы тела) в гепаринизированный шприц). Измерение АД осуществлялось прямым способом через катетер в бедренной артерии, соединенным с датчиком DTXPlus<sup>TM</sup> (Argon Critical Care Systems, Сингапур, <https://www.argonmedical.com>), подключенным к АЦП, входящему в состав микроконтроллера фирмы STMicroelectronics (США, <https://www.st.com>), выход которого был подключен к компьютеру через порт USB. Для работы устройства с компьютером в нашей лаборатории была разработана оригинальная программа визуализации значений АД. Расчет среднего АД в реальном времени производился программой по классической формуле:

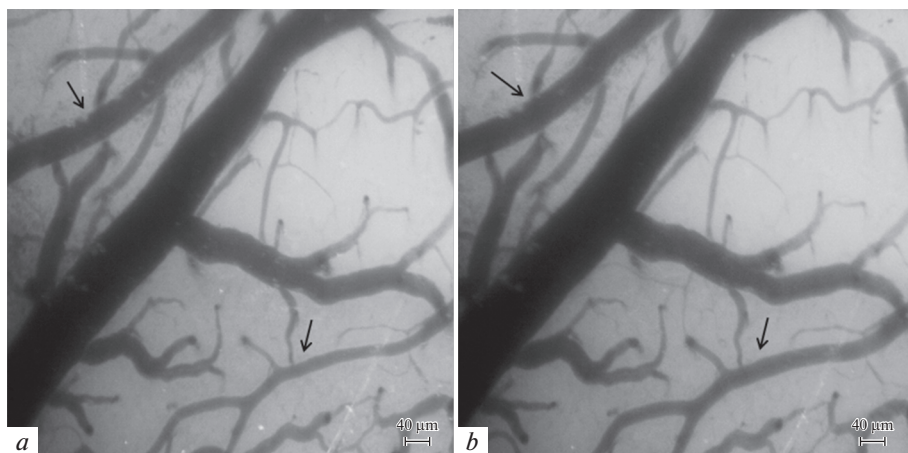
$$P_{\text{ср}} = P_{\text{д}} + 1/3(P_{\text{с}} - P_{\text{д}}),$$

где  $P_{\text{ср}}$  – среднее артериальное давление (мм рт. ст.),  $P_{\text{с}}$  – систолическое давление (мм рт. ст.),  $P_{\text{д}}$  – диастолическое давление (мм рт. ст.).

По окончании периода ишемии производилась полная реинфузия забранной крови и ушивание операционных ран. До выхода из наркоза крысы содержались на электрогрелках (S315, EcoSapiens, Россия) при температуре 38°C. После выхода из наркоза животные возвращались в клетки своего обычного содержания.

Постишемические изменения исследовались в отдельных группах крыс: на 7-, 14- и 21-й день после ишемии. Контролем служили ложнооперированные животные (ЛО). Эти крысы подвергались аналогичному оперативному вмешательству, но без проведения ишемии. Исследования на ЛО крысах проводились в отдельных группах через 7, 14 и 21 день после операции.

Для проведения прижизненного исследования реакций пиальных артерий крыс наркотизировали золетилом (внутрибрюшинно, 20 мг/кг, Virbac, Франция). В тенной области черепа животного высверливали отверстие ( $S \approx 1 \text{ см}^2$ ), твердую мозговую оболочку в пределах которого удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (в мМ: NaCl 120.4; KCl 5.9; NaHCO<sub>3</sub> 15.5; MgCl<sub>2</sub> 1.2; CaCl<sub>2</sub> 2.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; глюкоза 11.5; pH 7.4), аэрированного карбогеном. Раствор для орошения, как и все другие применяемые растворы, в течение всего эксперимента содержали в медицинском водяном термостате (TW-2, SIA “ELMI”, Латвия) при температуре 37°C. На протяжении всего эксперимента контролировали среднее АД, показатели которого оставались примерно на одном уровне и составляли  $127 \pm 4$  мм рт. ст. Температуру тела животного поддерживали на уровне 38°C. Визуализацию пиальных ар-



**Рис. 1.** Микрофотографии пияльных сосудов: *a* – исходное состояние; *b* – реакция на орошение поверхности головного мозга раствором АХ ( $10^{-7}$  М, 8 мин). Стрелками указаны артериальные участки пияльной сосудистой сети.

терий проводили с помощью оригинальной установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп МС-2ZOOM (Микромед, Россия), цветную камеру-видеоокуляр для микроскопа Basler acA 4600–10uc (Германия) и персональный компьютер.

При проведении эксперимента крысы разделяли на 6 отдельных групп: крысы через 7 ( $n = 7$ ), 14 ( $n = 7$ ) и 21 ( $n = 8$ ) день после перенесенной ишемии и ЛО крысы через 7 ( $n = 6$ ), 14 ( $n = 7$ ) и 21 ( $n = 6$ ) день после оперативного вмешательства. Исследовали реакции сосудов на орошение поверхности головного мозга раствором ацетилхолин хлорида (Acetylcholine chloride, Sigma-Aldrich,  $10^{-7}$  М, 8 мин) в отсутствие и на фоне блокады  $IC_{Ca}$  – каналов раствором клотримазола (Акрихин, Польша) в концентрации  $10^{-5}$  М (предварительное орошение поверхности головного мозга в течение 5 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора). Фоновую реакцию на воздействие АХ в каждой группе анализировали по всему массиву сосудов и принимали за 100%. Проверка по критерию Краскела–Уоллеса показала отсутствие значимых различий между отдельными животными в фоновых реакциях на воздействие АХ внутри каждой из исследованных групп. Общая продолжительность эксперимента составляла 60–90 мин, после чего животных усыпляли передозировкой раствора золетила (60 мг/кг).

Диаметр сосудов измеряли на статических изображениях (рис. 1) с помощью компьютерной программы для цитофотометрии “Photo M 1.21” (авторская разработка А. Черниговского, [http://www.t\\_lambda.chat.ru](http://www.t_lambda.chat.ru)). В программе предусмотрен режим увеличения изображения и калибровки для пересчета всех координат в метрические единицы. С использованием программы вручную измеряли ширину потока эритроцитов, соответствующую внутреннему диаметру сосуда. Об изменении вклада  $IC_{Ca}$ -каналов в поддержание тонуса сосудов судили по изменению числа сосудов, сузившихся в ответ на воздействие блокатора  $IC_{Ca}$ -каналов клотримазола. Изменение вклада каналов в дилатации сосудов оценивали путем сравнения числа дилатированных сосудов и степени их дилатации в ответ на воздействие АХ до и после применения блокатора.

Изменение количества расширившихся и сузившихся сосудов на воздействие выражали в процентах относительно общего числа исследованных сосудов в группе. Степень дилатации  $\Delta D$  %: рассчитывали по формуле:

$$\Delta D = (D_2 - D_1) / D_1 \times 100,$$

где  $D_1$  – диаметр сосуда до воздействия АХ,  $D_2$  – после воздействия.

Изменения диаметра в покое не превышали  $5.0 \pm 0.5\%$ , поэтому при таких значениях считали, что реакция на воздействие отсутствует.

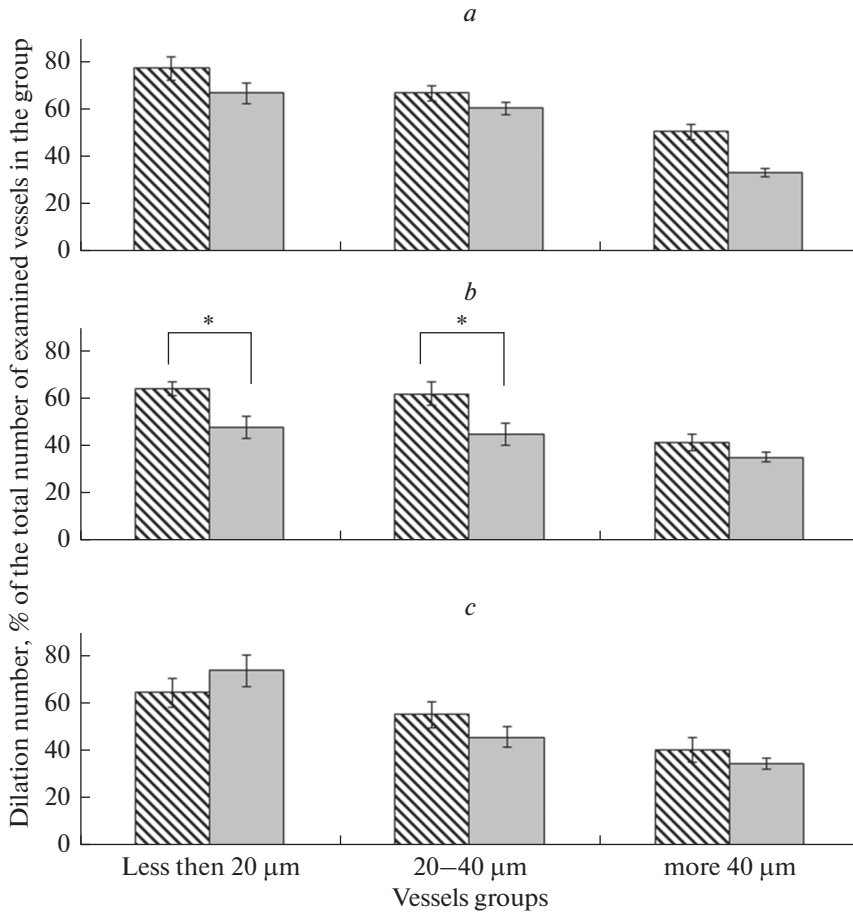
У каждой крысы было измерено от 40 до 70 участков сосудов. В литературе имеются сведения о том, что вклад EDH в эндотелий-зависимые релаксации неоднороден и варьируется в зависимости от размера сосудов [15–17]. Поэтому для последующего анализа измеренные сосуды были разделены на группы в соответствии с их диаметрами: мелкие сосуды (диаметром от 9 до 20 мкм), сосуды среднего диаметра (от 20 до 40 мкм) и крупные сосуды (более 40 мкм). Данные по отдельной группе сосудов усредняли для каждого животного и использовали для статистических сравнений.

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и программы InStat 3.02 (“GraphPad Software Inc.”, США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. При сравнении 2 групп использовали U-критерий Манна–Уитни. Сравнение средних данных независимых выборок при сравнении более 2 групп при нормальном характере распределения вариант в совокупности данных (выборке) проводили при помощи дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. При распределении вариант в выборке, отличном от нормального, при сравнении групп применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Данна.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

И/Р изменяла выраженность АХ-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов только в первые 14 дней после перенесенного воздействия. Через 7 дней у крыс, перенесших ишемию, по сравнению с ЛО животными, в группе артерий диаметром более 40 мкм отмечалось снижение числа дилататорных реакций на воздействие АХ (на  $33.9 \pm 2.4\%$ ;  $p = 0.02$ ,  $U = 54$ , критерий Манна–Уитни), без изменения амплитуды дилатации. В остальных группах исследованных артерий число АХ-опосредованных дилатаций и амплитуда дилатации не отличались от аналогичных показателей в соответствующих группах сосудов ЛО животных (рис. 2). На 14-й день число и амплитуда дилататорных реакций на воздействие АХ сосудов крупных диаметров у крыс, перенесших ишемию, и ЛО животных достоверно не отличались. Число дилатаций мелких и средних артерий было достоверно ниже (в среднем на 25%; рис. 2). Через 21 день число и амплитуда вызванных АХ дилатаций у животных, перенесших ишемию, и ЛО крыс во всех группах исследованных сосудов достоверно не отличались.

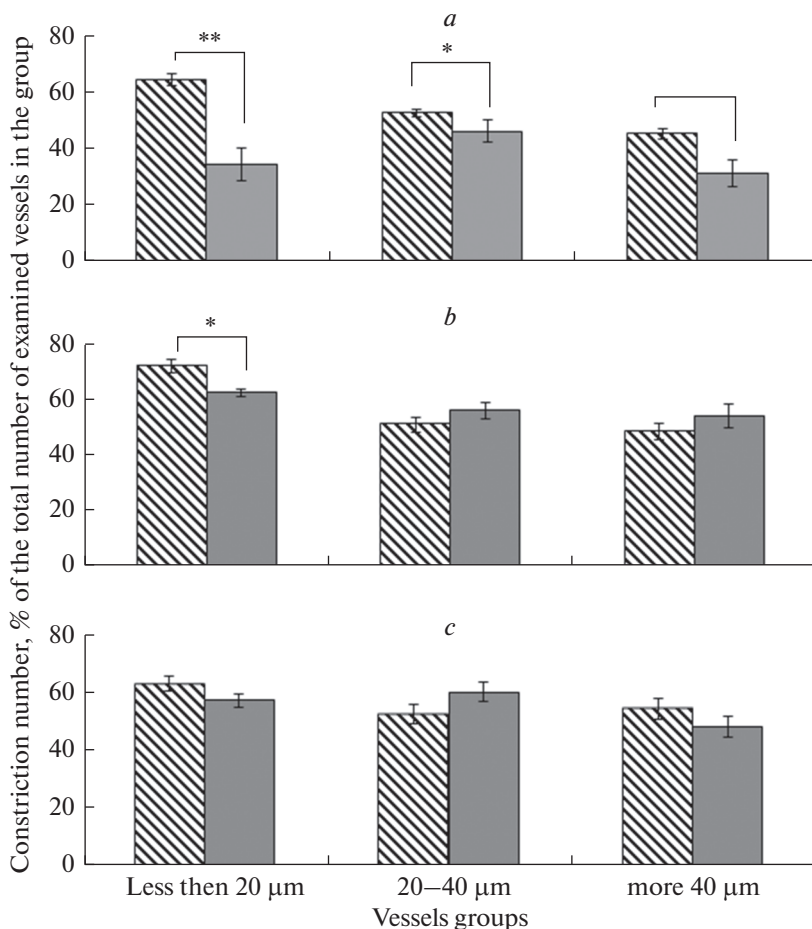
Аппликация клотримазола у ЛО крыс через 7 дней после оперативного вмешательства вызывала констрикцию сосудов всех исследованных диаметров (рис. 3а). Наибольшее число констрикций отмечено в группе артерий диаметром менее 20 мкм ( $65.1 \pm 2\%$ ). С увеличением диаметра сосудов число констрикций на воздействие клотримазола достоверно снижалось ( $p < 0.0001$ , критерий Краскела–Уоллиса). Блокада  $IK_{Ca}$ -каналов уменьшала число АХ-опосредованных дилатаций пиальных артерий всех диаметров в среднем на 80–85% (рис. 4а). Амплитуда дилатации во всех группах исследованных сосудов также достоверно уменьшалась (рис. 4б). У крыс, перенесших ишемию, через 7 дней после И/Р, по сравнению с ЛО живот-



**Рис. 2.** Дилататорная реакция пияльных артерий различных диаметров на воздействие АХ. *Косая штриховка* – ЛО крысы; *темная заливка* – крысы после И/Р (*a* – 7 дней; *b* – 14 дней; *c* – 21 день). \* – различия статистически значимы при  $p < 0.05$  (U-критерий Манна–Уитни).

ными, аппликация клотримазола вызывала достоверно меньшее число констрикций. Во всех исследованных группах артерий в ответ на воздействие клотримазола сужалось в среднем от 30 до 45% сосудов (рис. 3а). Число АХ-опосредованных дилатаций на фоне введения клотримазола во всех группах сосудов снижалось в среднем на 60–70%. В группе артерий мелких диаметров также уменьшалась амплитуда дилатаций (рис. 4).

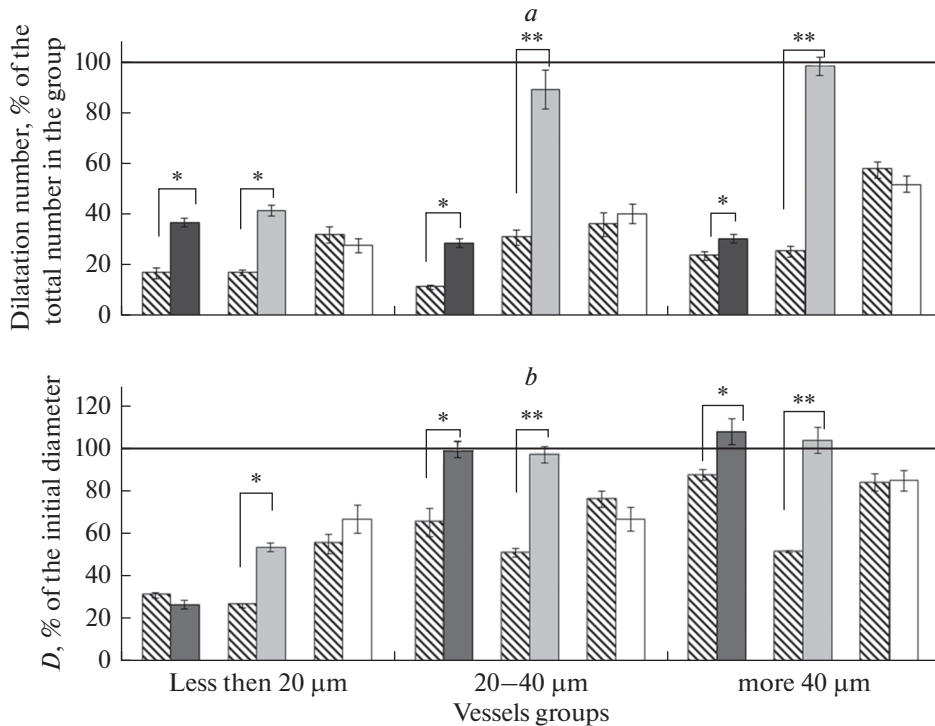
Аппликация клотримазола у ЛО крыс через 14 дней после операции вызывала констрикцию  $71.3 \pm 4.4\%$  мелких сосудов и около 50% артерий средних и крупных диаметров (рис. 3б). На фоне введения клотримазола во всех группах исследованных сосудов уменьшалось число дилатаций на воздействие АХ (в среднем на 70–80%). Также снижалась и амплитуда АХ-опосредованной дилататорной реакции (рис. 4). У крыс, перенесших ишемию, через 14 дней после И/Р орошение поверхности головного мозга раствором клотримазола приводило к констрикции около 60% сосудов всех исследованных групп (рис. 3б). Число дилатаций на воздействие АХ на



**Рис. 3.** Констрикторная реакция пиальных артерий различных диаметров на воздействие блокатора  $IK_{Ca}$ -каналов (клотримазола). *Косая штриховка* — ЛО крысы; *темная заливка* — крысы после И/Р (*a* — 7 дней; *b* — 14 дней; *c* — 21 день). \* — различия статистически значимы при  $p < 0.05$  (U-критерий Манна–Уитни).

фоне применения клотримазола в группах сосудов мелких сосудов уменьшалось на  $58.3 \pm 2.1\%$  ( $p = 0.01$ ,  $U = 11$ , критерий Манна–Уитни). В этой группе также уменьшалась и амплитуда дилаторной реакции (рис. 4). В группах артерий крупных и средних диаметров число и амплитуда АХ-опосредованных дилатаций на фоне применения клотримазола соответствовали значениям, полученным без применения блокатора (рис. 4).

Через 21 день применение клотримазола у ЛО крыс приводило к констрикции 55–60% сосудов всех исследованных диаметров (рис. 3с). Число дилаторных реакций на воздействие АХ на фоне применения клотримазола у сосудов мелких и средних диаметров уменьшалось в среднем на 65%. В этих группах сосудов также уменьшалась и амплитуда дилатации (рис. 4). Число АХ-опосредованных дилатаций в группе крупных сосудов на фоне блокады  $IK_{Ca}$ -каналов уменьшалось на  $42.2 \pm 3.2\%$  ( $p = 0.004$ ,  $U = 9$ , критерий Манна–Уитни). У животных, перенесших ишемию, во всех группах артерий в ответ на воздействие клотримазола сужалось в



**Рис. 4.** Изменение дилататорной реакции пиальных артериальных сосудов различных диаметров на воздействие АХ на фоне блокады  $IK_{Ca}$ -каналов: *a* – число дилатаций (% от общего числа исследованных сосудов); *b* – диаметр артерий после воздействия АХ (% относительно их диаметра до воздействия АХ). *Линия* – дилататорная реакция сосудов в группе на введение АХ без применения блокатора, принятая за 100%. *Косая штриховка* – ЛО крысы; *черная заливка* – крысы через 7 дней после И/Р; *серая заливка* – крысы через 14 дней после И/Р; *белая заливка* – крысы через 21 день после И/Р. Различия статистически значимы: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (U-критерий Манна–Уитни).

среднем около 55% сосудов, что достоверно не отличалось от соответствующих реакций сосудов ЛО крыс (рис. 3с). Число и амплитуда АХ-опосредованных дилататорных реакций артерий всех исследованных диаметров на фоне предварительного введения клотримазола у крыс, перенесших ишемию, снижались, но эти изменения у животных после И/Р и у ЛО крыс были выражены в равной степени (рис. 4).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования было установлено, что И/Р коры головного мозга крыс, вызванная окклюзией обеих сонных артерий с управляемой гипотензией, у крыс в возрасте 18 месяцев приводит к угнетению АХ-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов, которое сохраняется на протяжении первых 14 дней после восстановления кровотока. Нами [18], а также другими исследователями [1–3], ранее было показано, что развитие сосудистой дисфункции после ишемии и последующей реперфузии может быть связано с возникновением эндотелиальной дисфункции, в основе которой лежит нарушение NO-опосредованных механизмов сосудистой регуляции, развивающееся вследствие снижения биодоступности и



синтеза NO. Уменьшение секреции и/или продукции NO может усиливать роль фактора эндотелиальной гиперполяризации (EDHF) в регуляции сосудистого тонуса [1, 3]. Структура EDHF к настоящему времени не установлена. Но известно, что важным начальным шагом в развитии эндотелий-зависимой гиперполяризации является активация расположенных в эндотелии сосудов  $IK_{Ca}$ -каналов (1, 4, 5). Во многих сигнальных событиях, развивающихся после И/Р, центральное место играет увеличение уровня внутриклеточного кальция в эндотелиальных клетках [19–22]. Высокие уровни кальция могут нарушать функцию эндотелия и изменять активность процессов, участвующих в регуляции сосудистого тонуса, в частности, влиять на активность  $IK_{Ca}$ -каналов [5, 20, 22].

В наших экспериментах у ЛО животных через 7 дней после операции клотримазол, являющийся ингибитором  $IK_{Ca}$ -каналов [23], вызывал сужение в среднем 45–65% пиальных артерий. Эти данные свидетельствуют о том, что у крыс в возрасте 18 мес. в физиологических условиях  $IK_{Ca}$ -каналы участвуют в поддержании тонуса пиальных артерий. У крыс, перенесших ишемию, через 7 дней после И/Р во всех группах исследованных сосудов отмечалось уменьшение числа констрикторных реакций на аппликацию клотримазола, по сравнению с реакциями сосудов в соответствующих группах у ЛО животных. Следовательно, можно утверждать, что И/Р вызывает снижение вклада  $IK_{Ca}$ -каналов в поддержание тонуса пиальных артерий. Но эти данные противоречат результатам, полученным другими исследователями и свидетельствующим об отсутствии [22, 24] изменения или усилении [21] роли  $IK_{Ca}$ -каналов в поддержании тонуса мозговых сосудов после перенесенной И/Р. Различия в результатах могут быть обусловлены региональной и видовой изменчивостью в экспрессии  $IK_{Ca}$ -каналов [3]. Также причина появления противоречивых выводов может быть связана с методологическими подходами, приводящими к достижению различной степени ишемии и времени реперфузии [24, 25]. Немаловажным фактором, влияющим на результаты исследования, могут быть и отличия в строении исследованных сосудов. В сосудах, имеющих менее выраженный слой гладкомышечных клеток, в базальных условиях эндотелий может оказывать большее влияние на гладкую мускулатуру, так как такое структурное расположение допускает более полный перенос гиперполяризации, что невозможно в сосудах с более выраженным гладкомышечным слоем [16].

На протяжении последующего постишемического периода в наших экспериментах различия в реакциях артерий на воздействие клотримазола у крыс, перенесших И/Р, и ЛО животных уменьшались. Через 14 дней достоверные отличия наблюдались только в группе мелких сосудов. К 21-му дню реакции артерий всех исследованных диаметров на аппликацию клотримазола у животных, перенесших И/Р, не отличались от реакций артерий у ЛО крыс, что указывает на восстановление вклада  $IK_{Ca}$ -каналов в поддержании тонуса пиальных артерий в этот отрезок постишемического периода.

Число и амплитуда дилататорных реакций на воздействие АХ у артерий всех исследованных диаметров, предварительно подвергнутых воздействию клотримазола, у ЛО крыс во все временные отрезки послеоперационного периода достоверно уменьшались. Это свидетельствует о том, что у ЛО животных  $IK_{Ca}$ -каналы играют значительную роль в осуществлении АХ-опосредованных дилататорных реакций пиальных артериальных сосудов. Согласно современным представлениям в основе механизма АХ-опосредованной активации  $IK_{Ca}$ -каналов лежит увеличение уровня внутриклеточного кальция посредством активации ваниллоидных каналов (TRPV4) в плазматической мембране и рецепторов инозитолтрифосфата (IP3Rs) в эндоплазматическом ретикулуме [26]. У крыс, перенесших ишемию, характер АХ-опосредованных дилататорных реакций пиальных артерий на фоне предваритель-

ной блокады  $IK_{Ca}$ -каналов также менялся. Через 7 дней после И/Р на фоне введения клотримазола число дилатаций пиальных артерий всех диаметров достоверно снижалось. Но это снижение было выражено в меньшей степени, чем у ЛО крыс. Наши данные отличаются от результатов, полученных другими исследователями, свидетельствующих об усилении EDHF-опосредованных ответов после перенесенной ишемии [1, 3, 21, 22, 24]. Мы полагаем, что различия могут быть обусловлены возрастными особенностями экспериментальных животных. В большинстве исследований, описанных в литературе, использовались молодые животные в возрасте 3–4 месяцев. В наших же экспериментах возраст крыс составлял 18 месяцев. Основной механизм, приводящий к изменениям EDHF-опосредованных вазодилаторных ответов, связывают с увеличением внутриклеточного кальция в эндотелиальных клетках, что может повышать активность  $IK_{Ca}$ -каналов, вызывая отток  $K^+$  и гиперполяризацию мембраны [22, 27, 28]. В литературе имеются сведения о том, что в условиях покоя у старых животных по сравнению с молодыми особями открыто больше  $IK_{Ca}$ -каналов [29], что способствует гиперполяризации эндотелия. Связанное с перенесенной И/Р увеличение внутриклеточного кальция в эндотелиальных клетках может способствовать дополнительной активации  $IK_{Ca}$ -каналов. Известно, что гиперактивация  $IK_{Ca}$ -каналов уменьшает сопротивление клеточных мембран и снижает способность эндотелия артерий проводить электрические сигналы [15]. Вероятно, именно эти процессы и являются одной из причин снижения вклада  $IK_{Ca}$ -опосредованных дилаторных ответов пиальных артерий на воздействие АХ у стареющих крыс после перенесенной И/Р.

Через 14 дней после И/Р снижение вклада  $IK_{Ca}$ -каналов промежуточной проводимости в АХ-опосредованную дилатацию отмечалось только на сосудах диаметром менее 20 мкм. В остальных группах артерий клотримазол не изменял характер дилаторных ответов на АХ. Следовательно, в этот отрезок постишемического периода  $IK_{Ca}$ -каналы практически не участвовали в АХ-опосредованной дилатации пиальных артерий средних и крупных диаметров. Через 21 день после И/Р снижение числа и амплитуды дилаторных реакций на воздействие АХ на фоне блокады  $IK_{Ca}$ -каналов у ЛО крыс и крыс, перенесших ишемию, достоверно не отличались.

Таким образом, нами было установлено, что И/Р коры головного мозга у крыс в возрасте 18 месяцев приводит к снижению вклада  $IK_{Ca}$ -каналов в поддержание тонуса пиальных артериальных сосудов, которое сохраняется на протяжении первых 14 дней после ишемического воздействия. Также снижается вклад  $IK_{Ca}$ -каналов в осуществление АХ-опосредованных дилаторных реакций. Это явление наблюдается уже через 7 дней после И/Р, а через 14 дней  $IK_{Ca}$ -каналы практически не участвуют в дилаторном ответе пиальных артерий на АХ. Обнаруженные нами постишемические изменения  $IK_{Ca}$ -сигнализации у стареющих животных могут являться причиной нарушения эндотелий-зависимой вазодилатации и возникновения вазоспастических реакций, а также фактором риска развития повторных ишемических повреждений головного мозга.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Источник финансирования – госбюджет. Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019-2030), тема 0134-2019-0001.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (О.П.Г.), сбор данных (И.Б.С.), обработка данных (О.П.Г., И.Б.С.), написание и редактирование статьи (О.П.Г., И.Б.С.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Davis CM, Siler DA, Alkayed NJ* (2011) Endothelium-derived hyperpolarizing factor in the brain: influence of sex, vessel size and disease state. *Womens Health (Lond)* 7(3): 293–303. <https://doi.org/10.2217/whe.11.26>
2. *Ma J, Ma Y, Shuaib A, Winship IR* (2020) Impaired collateral flow in pial arterioles of aged rats during ischemic stroke. *Transl Stroke Res* 11(2): 243–253. <https://doi.org/10.1007/s12975-019-00710-1>
3. *Yang Q, He GW, Underwood MJ, Yu CM* (2016) Cellular and molecular mechanisms of endothelial ischemia/reperfusion injury: perspectives and implications for postischemic myocardial protection. *Am J Transl Res* 8(2): 765–777.
4. *Goto K, Ohtsubo T, Kitazono T* (2018) Endothelium-dependent hyperpolarization (EDH) in hypertension: The role of endothelial ion channels. *Int J Mol Sci* 19(1): 315. <https://doi.org/10.3390/ijms19010315>
5. *Tano JY, Gollasch M* (2014) Calcium-activated potassium channels in ischemia reperfusion: a brief update. *Front Physiol* 5: 381. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00381>
6. *Hakim MA, Chum PP, Buchholz JN, Behringer EJ* (2020) Aging alters cerebrovascular endothelial GPCR and K<sup>+</sup> channel function: divergent role of biological sex. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 75(11): 2064–2073. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz275>
7. *Garland CJ, Bagher P, Powell C, Ye X, Lemmey HAL, Borysova L, Dora KA* (2017) Voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> entry into smooth muscle during contraction promotes endothelium-mediated feedback vasodilation in arterioles. *Sci Signal* 10: eal3806. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aal3806>
8. *Dong P, Zhao J, Zhang Y, Dong J, Zhang L, Li D, Li L, Zhang X, Yang B, Lei W* (2014) Aging causes exacerbated ischemic brain injury and failure of sevoflurane post-conditioning: role of B-cell lymphoma-2. *Neuroscience* 275: 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.064>
9. *Tang Y, Wang L, Wang J, Lin X, Wang Y, Jin K, Yang GY* (2016) Ischemia-induced angiogenesis is attenuated in aged rats. *Aging Dis* 7: 326–335. <https://doi.org/10.14336/AD.2015.1125>
10. *Gorshkova OP, Shuvaeva VN* (2020) Age related changes in the role of calcium activated potassium channels in acetylcholine mediated dilatation of pial arterial vessels in rats. *J Evol Biochem Physiol* 56(2): 145–152. <https://doi.org/10.1134/S0022093020020064>
11. *Izzo C, Carrizzo A, Alfano A, Virtuoso N, Capunzo M, Calabrese M, De Simone E, Sciarretta S, Frati G, Olivetti M, Damato A, Ambrosio M, De Caro F, Remondelli P, Vecchione C* (2018) The impact of aging on cardio and cerebrovascular diseases. *Int J Mol Sci* 19(2): 481. <https://doi.org/10.3390/ijms19020481>
12. *Winship IR* (2015) Cerebral collaterals and collateral therapeutics for acute ischemic stroke. *Microcirculation* 22(3): 228–236. <https://doi.org/10.1111/micc.12177>
13. *Van der Worp HB, Van Gijn J* (2007) Acute ischemic stroke. *New England J Med* 357(6): 572–579. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp072057>
14. *Lensman M, Korzhevskii D, Mourovets VO, Kostkin V, Izvarina N, Perasso L, Gandolfo C, Otellin V, Polenov S, Balestrino M* (2006) Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 1114 (1): 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.06.103>
15. *Behringer EJ, Hakim MA* (2019) Functional interaction among K<sub>Ca</sub> and TRP channels for cardiovascular physiology: modern perspectives on aging and chronic disease. *Int J Mol Sci* 20(6): 1380. <https://doi.org/10.3390/ijms20061380>
16. *Cipolla MJ, Smith J, Kohlmeyer MM, Godfrey JA* (2009) SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels, myogenic tone, and vasodilator responses in middle cerebral arteries and parenchymal arterioles: effect of ischemia and reperfusion. *Stroke* 40(4): 1451–1457. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.535435>
17. *Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A* (1996) The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric

- circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 28(5): 703–711.  
<https://doi.org/10.1097/00005344-199611000-00014>
18. Горшкова ОП, Шуваева ВН, Ленцман МВ, Артемьева АИ (2016) Постишемические изменения вазомоторной функции эндотелия. *Совр пробл науки и образов* 5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=25270> (дата обращения: 09.01.2022). [*Gorshkova OP, Shuvaeva VN, Lentsman MV, Artemyeva AI* (2016) Postischemic changes in the vasomotor function of the endothelium. *Modern Probl Sci and Educat* 5. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=25270> (accessed: 09.01.2022). (In Russ)].
  19. Dabertrand F, Nelson MT, Brayden JE (2012) Acidosis dilates brain parenchymal arterioles by conversion of calcium waves to sparks to activate BK channels. *Circ Res* 110(2): 285–294  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.258145>
  20. Li Y, Lapina N, Weinzierl N, Schilling L (2018) Enhancement of bradykinin-induced relaxation by focal brain ischemia in the rat middle cerebral artery: receptor expression upregulation and activation of multiple pathways. *PLoS One* 13(6): e0198553.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198553>
  21. Marrelli SP (2002) Altered endothelial  $Ca^{2+}$  regulation after ischemia/reperfusion produces potentiated endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated dilations. *Stroke* 33(9): 2285–2291.  
<https://doi.org/10.1161/01.str.0000027439.61501.39>
  22. Palomares SM, Cipolla MJ (2011) Vascular protection following cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurol Neurophysiol* 2011: S1-004.  
<https://doi.org/10.4172/2155-9562.s1-004>
  23. Wulff H, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (2001) Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel,  $IK_{Ca1}$ . *J Biol Chem* 276: 32040-5.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M105231200>
  24. Cipolla MJ, Bullinger LV (2008) Reactivity of brain parenchymal arterioles after ischemia and reperfusion. *Microcirculation* 15(6): 495–501.  
<https://doi.org/10.1080/10739680801986742>
  25. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ (2016) Ischemia/reperfusion. *Compr Physiol* 7(1): 113–170.  
<https://doi.org/10.1002/cphy.c160006>
  26. Sonkusare SK, Dalsgaard T, Bonev AD, Nelson MT (2016) Inward rectifier potassium ( $Kir2.1$ ) channels as end-stage boosters of endothelium-dependent vasodilators. *J Physiol* 594(12): 3271–3285.  
<https://doi.org/10.1113/JP271652>
  27. Dora KA, Gallagher NT, McNeish A, Garland CJ (2008) Modulation of endothelial cell  $KCa_{3.1}$  channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries. *Circ Res* 102: 1247–1255.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.172379>
  28. Mozaffari MS, Liu JY, Abebe W, Baban B (2013) Mechanisms of load dependency of myocardial ischemia reperfusion injury. *Am J Cardiovasc Dis* 3(4): 180–196.
  29. Behringer EJ, Shaw R.L, Westcott EB, Socha MJ, Segal SS (2013) Aging impairs electrical conduction along endothelium of resistance arteries through enhanced  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(8): 1892–1901.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301514>

### Changes in the Contribution of $IK_{Ca}$ -Channels to the Maintenance of Tone and Dilation of the Pial Arteries in Aging Rats after Ischemia/Reperfusion

O. P. Gorshkova<sup>a</sup>, \* and I. B. Sokolova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

\**e-mail: o\_gorshkova@inbox.ru*

The changes in the contribution of calcium – sensitive potassium channels of intermediate conductivity ( $IK_{Ca}$ ) in basal tone and acetylcholine (ACh) mediated dilation of pial arteries after global cerebral ischemia (2VO + hypo model) was studied in Sprague-Dawley 18-month-old rats. Vascular examination was performed 7, 14 and 21 days after ischemia. Sham-operated rats served as a control. The change in the contribution of  $IK_{Ca}$  – channels in basal tone was assessed using intravital microphotography. The number of vessels that constricted in response to the effect of the  $IK_{Ca}$  – channels blocker (clotrimazole,

$10^{-5}$  M, 5 min) was assessed. The change in the contribution of channels in vascular dilatation was assessed by comparing the number and degree of arterial dilatation in response to ACh ( $10^{-7}$  M, 8 min) before and after the use of a  $IK_{Ca}$  – channels blocker. It was found that ischemia/reperfusion (I/R) in 18-month-old rats leads to a decrease in the number of the pial arteries dilatations to the effect of ACh, which persists for the first 14 days after ischemic exposure. During this post-ischemic period the contribution of  $IK_{Ca}$  – channels to the pial arteries tone and ACh–mediated dilatory response is also reduced. This phenomenon is observed already 7 days after I/R, and after 14 days, the  $IK_{Ca}$ -channels practically do not participate in the dilatory response of the pial arteries to ACh. By 21 days after I/R, all the studied processes are restored.

*Keywords:*  $IK_{Ca}$  potassium channels, aging, ACh–dependent vasodilatation, pial arteries, endothelial dysfunction