

УДК 57.052: 612.13

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РОЛИ КАЛЬЦИЙ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ В ОПОСРЕДОВАННОЙ АЦЕТИЛХОЛИНОМ ДИЛАТАЦИИ ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНЫХ СОСУДОВ У КРЫС

© 2020 г. О. П. Горшкова^{1,*}, В. Н. Шуваева¹

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: o_gorshkova@inbox.ru

Поступила в редакцию 24.05.2019 г.

После доработки 03.10.2019 г.

Принята к публикации 01.11.2019 г.

Исследовались возрастные изменения вклада эндотелиальной гиперполяризации, индуцируемой активацией Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов промежуточной проводимости (IK_{Ca}), и NO в опосредованную ацетилхолином (АХ) дилатацию пиальных артериальных сосудов крыс. С использованием метода прижизненной микрофотосъемки ($\times 470$) проведена сравнительная оценка реакций пиальных артерий на ацетилхолин хлорид (АХ, 10^{-7} М, 5 мин) в отсутствие и на фоне блокады IK_{Ca} -каналов (клотримазол, 10^{-5} М) и NO (L-NAME, 10^{-3} М) у крыс линии Wistar в возрасте 4 и 26 мес. Об изменении роли эндотелиальной гиперполяризации и NO судили по изменению числа дилатированных артерий и степени их дилатации в ответ на действие АХ после применения блокаторов, измеряя ширину потока эритроцитов в 3 отдельных группах артерий: мелких (диаметр менее 20 мкм), средних (20–40 мкм) и крупных (более 40 мкм). Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что с возрастом у крыс снижается вклад эндотелиальной гиперполяризации, индуцируемой активацией IK_{Ca} -каналов, в вызванную АХ дилатацию мелких пиальных артерий с одновременным усилением роли этого механизма у артерий среднего калибра. Изменения механизмов вазодилатации при старении, вероятно, связаны с усилением роли NO-зависимых механизмов регуляции эндотелий-зависимых дилаторных реакций.

Ключевые слова: эндотелиальная гиперполяризация, пиальные сосуды, эндотелиальная NO-синтаза

DOI: 10.31857/S0044452920020059

ВВЕДЕНИЕ

Эндотелий играет важную роль в регуляции сосудистого тонуса посредством продукции различных веществ, приводящих к вазодилатации или вазоконстрикции. В процессе развития организма постепенно изменяется роль эндотелия, связанная с обеспечением дилатации сосудов. Возрастное изменение эндотелий-зависимой вазодилатации связывают с нарушением синтеза и снижением биодоступности NO в эндотелии крупных магистральных сосудов [1]. В литературе имеются сведения о том, что при снижении секреции и/или продукции NO регуляция сосудистого тонуса обуславливается действием фактора эндотелиальной гиперполяризации [2, 3]. К настоящему времени структура эндотелий-зависимого гиперполяризующего фактора не установлена. В качестве претендентов на роль эндотелиального фактора гиперполяризации рассматриваются различные вещества, продуцируемые эндотелиальными клетками, такие как эпоксиэкозатриеновые кислоты, пероксид водорода, сероводород и др. [4–7]. Общим в действии этих

веществ является то, что они, выполняя функцию химических мессенджеров между эндотелиальными и гладкомышечными клетками, активируют Ca^{2+} -чувствительные K^+ -каналы, приводя в итоге к гиперполяризации мембраны гладкомышечных клеток, их расслаблению и вазодилатации [8–10]. Также имеется мнение о том, что источником возникновения гиперполяризации могут быть процессы, связанные с возникновением электрической связи между эндотелием и мышечной тканью через электрические щелевые каналы без участия генерации химических медиаторов [11]. Старение изменяет сосудистые функции на уровне эндотелия и гладкомышечной клетки [1, 12]. Однако изменение эндотелий-зависимой гиперполяризации в процессе развития организма мало исследовано. Целью нашей работы было изучение роли эндотелиальной гиперполяризации в эндотелий-зависимой регуляции тонуса мозговых сосудов крыс и оценка возрастных изменений этого механизма вазодилатации. В задачи исследования входило изучение роли эндотелиальной гиперполяризации,

индуцируемой активацией Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов промежуточной проводимости (IK_{Ca}), и роли NO в опосредованной ацетилхолином дилатации пиальных артериальных сосудов у молодых и старых крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты проведены на самцах крыс линии Wistar массой 230–380 г в возрасте 4 ($n = 17$) и 26 мес ($n = 17$) в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, принятыми Европейской конвенцией 19.07.2014 г., и требованиями Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. Животные содержались по 6 особей в клетках Т4 на стандартной лабораторной диете в условиях искусственного освещения (цикл: 12 часов свет/12 часов темнота).

Крыс наркотизировали хлоралгидратом (43 мг/100 г массы тела, внутривенно). Среднее АД у наркотизированных молодых животных составило 95.0 ± 4.4 мм рт.ст., у крыс в возрасте 26 месяцев – 92.0 ± 3.9 мм рт.ст. В теменной области черепа животного высверливали отверстие площадью 2 см², твердую мозговую оболочку в пределах которого удаляли. Поверхность мозга в пределах трепанационного отверстия орошали раствором Кребса ($t = 37^\circ\text{C}$). Методом прижизненной микрофотосъемки [13] ($\times 470$) фиксировали фоновое изображение пиальных сосудов и их реакцию на воздействие. Исследовали реакции пиальных артериальных сосудов на 5-минутное орошение поверхности головного мозга раствором ацетилхолин хлорида (АХ, Sigma) в концентрации 10^{-7} М. Крысы были разделены на 4 отдельные группы. В первых двух группах (крысы в возрасте 4 мес, $n = 9$ и 26 мес, $n = 8$) исследовали реакции пиальных артериальных сосудов на АХ в отсутствие и на фоне блокады IK_{Ca} -каналов. В качестве блокатора IK_{Ca} -каналов использовали раствор клотримазола (Акрихин, Польша) в концентрации 10^{-5} М [13] (предварительное орошение поверхности головного мозга в течение 5 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора). В двух других группах (крысы в возрасте 4 мес, $n = 8$ и 26 мес, $n = 9$) исследовали реакции пиальных артериальных сосудов на АХ в отсутствие и на фоне блокады эндотелиальной NO-синтазы. В качестве блокатора eNOS использовали раствор метилового эфира нитро-L-аргинина (L-NAME, ICN Biomed. Inc) в концентрации 10^{-3} М (предварительное орошение поверхности головного мозга в течение 10 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора). После регистрации реакции пиальных сосудов на АХ на фоне блокады eNOS в реакционную среду вводили клотримазол, дополнительно блокируя

IK_{Ca} -каналы клотримазолом. Это позволило исследовать реакцию пиальных артериальных сосудов на АХ как на фоне блокады eNOS, так и на фоне совместного действия обоих блокаторов. Фоновую реакцию на АХ анализировали по всему массиву сосудов у 4-месячных ($n = 17$) и по всему массиву сосудов у 26-месячных ($n = 17$) крыс. Проверка по критерию Краскела–Уоллиса показала отсутствие значимых различий между отдельными животными в фоновых реакциях на АХ у крыс одного возраста.

Диаметр сосудов измеряли при помощи программы Inspector Matrox, измеряя ширину потока эритроцитов, соответствующую внутреннему диаметру сосуда. Об изменении роли эндотелиальной гиперполяризации и NO в дилатации пиальных артериальных сосудов судили по изменению числа дилатированных сосудов и степени их дилатации в ответ на воздействие ацетилхолина до и после применения блокаторов. Для последующего анализа сосуды в соответствии с их диаметрами были разделены на группы (см. Результаты). Изменение количества так или иначе прореагировавших сосудов (дилатация, констрикция) выражалось в процентах относительно общего числа исследованных сосудов в группе. Степень дилатации ΔD оценивали как разность между значениями диаметра после (D2) и до (D1) воздействия ацетилхолина относительно диаметра сосуда D1 перед воздействием ацетилхолина, %:

$$\Delta\text{D} = (\text{D2} - \text{D1})/\text{D1} \times 100.$$

Изменениями диаметра сосудов менее или равными 5.5% относительно значения перед воздействием пренебрегали (см. Результаты).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2003 и программы InStat 3.02 (“GraphPad Software Inc.”, США). Данные представляли в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Применяли U-критерий Манна–Уитни (при сравнении двух групп) и критерий Краскела–Уоллиса (при сравнении более двух групп). Для определения значимости связи между двумя выборками использовали критерий χ^2 Пирсона. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У каждой крысы было измерено от 25 до 30 участков сосудов диаметром от 8 до 78 мкм у 4-месячных и диаметром от 7 до 63 мкм у 26-месячных. Для последующего анализа и у 4-месячных, и у 26-месячных крыс все сосуды в соответствии с их диаметрами были разделены на 3 группы: I группа включала в себя сосуды диаметром от 7 до 20 мкм, II группа – сосуды диаметром от 20 до 40 мкм и III группа – сосуды диаметром более 40 мкм. Пред-

Таблица 1. Реакция пиальных артериальных сосудов различных диаметров на ацетилхолин, % от общего числа исследованных сосудов в каждой группе артерий

Группы артерий	4-месячные крысы ($n = 17$)			26-месячные крысы ($n = 17$)		
	Менее 20 мкм	20–40 мкм	Более 40 мкм	Менее 20 мкм	20–40 мкм	Более 40 мкм
Дилатация	$46.8 \pm 1.2\%$	$30.8 \pm 2.1\%$	$33.0 \pm 1.1\%$	$49.0 \pm 1.4\%$	$47.0 \pm 1.8\%$	$21.4 \pm 2.6\%$
Констрикция	$37.7 \pm 1.9\%$	$52.7 \pm 2.2\%$	$36.9 \pm 3.4\%$	$34.7 \pm 3.3\%$	$30.5 \pm 1.8\%$	$48.0 \pm 0.9\%$
Отсутствие реакции	$15.5 \pm 2.1\%$	$16.5 \pm 2.3\%$	$30.1 \pm 2.7\%$	$16.3 \pm 2.9\%$	$22.5 \pm 0.5\%$	$30.6 \pm 3.2\%$

варительно нами было установлено, что в покое изменения диаметра не превышают $5.0 \pm 0.5\%$; в таком случае считали, что реакция на воздействие отсутствует.

Орошение поверхности головного мозга раствором ацетилхолина (АХ) у молодых крыс вызывало дилатацию 35.4% исследованных пиальных артериальных сосудов, констрикцию 44.0%, а 26.6% сосудов не изменяли диаметра. Преимущественно расширялись самые мелкие сосуды, диаметром менее 20 мкм, в этой группе расширилось $46.8 \pm 1.2\%$ артерий. В остальных группах наблюдалась дилатация в среднем около 30% исследованных артерий (табл. 1).

Анализ степени дилатации артерий различных диаметров показал, что от мелких к более крупным сосудам она снижается (рис. 1). В группе мелких пиальных артериальных сосудов диаметр увеличивался в среднем на $34.2 \pm 3.6\%$, в группе крупных артерий – в среднем только на $13.2 \pm 0.7\%$ (рис. 1).

Оценка возрастных изменений опосредованной ацетилхолином дилатации пиальных артерий показала, что с возрастом общее число расширившихся под действием АХ артерий увеличивается: у крыс в возрасте 26 мес расширились 41.4% исследованных артериальных сосудов, 35.8% сузились, 22.8% сосудов – не изменили диаметр. Сопоставление реакций сосудов различных диаметров у крыс в возрасте 4 и 26 мес показало, что по мере старения число дилатированных артерий диаметром менее 20 мкм значительно не меняется (табл. 1). Число дилатированных артерий диаметром 20–40 мкм увеличивается до $47.0 \pm 1.8\%$ по сравнению с $30.8 \pm 2.1\%$ у молодых крыс. А в группе сосудов диаметром более 40 мкм количество дилатированных под действием АХ артерий уменьшается до $21.4 \pm 2.6\%$ по сравнению с $33.0 \pm 1.1\%$ у крыс в возрасте 4 мес (табл. 1). При этом старение не влияло на степень дилатации пиальных артериальных сосудов: во всех исследованных группах сосудов у 4- и 26-месячных животных она была примерно одинаковой (рис. 1).

Для выявления возрастных изменений эндотелий-зависимой гиперполяризации в реакциях дилатации пиальных артериальных сосудов на АХ нами были проведены исследования с применением раствора клотримазола. Клотримазол является

блокатором Ca^{2+} -чувствительных K^+ -каналов промежуточной проводимости, ингибируя систему цитохрома P450 [3, 14]. Система цитохрома P450 играет значительную роль в метаболизме полиненасыщенных жирных кислот, особенно в биотрансформации арахидоновой кислоты (АА) [15]. Метаболиты арахидоновой кислоты участвуют в регуляции сосудистого тонуса церебральных сосудов, влияют на активный транспорт ионов и вызывают гиперполяризацию мембран гладкомышечных клеток путем активации калиевых каналов и повышения количества ионов калия, поступающего в цереброваскулярные гладкомышечные клетки [15, 16]. В наших экспериментах орошение поверхности головного мозга раствором клотримазола у молодых крыс приводило к изменению диаметра исследованных сосудов, что может быть доказательством участия метаболитов АА в поддержании тонуса пиальных артериальных сосудов в покое. Однако изменение диаметра артерий носило разнонаправленный характер: по 34% сосудов в ответ

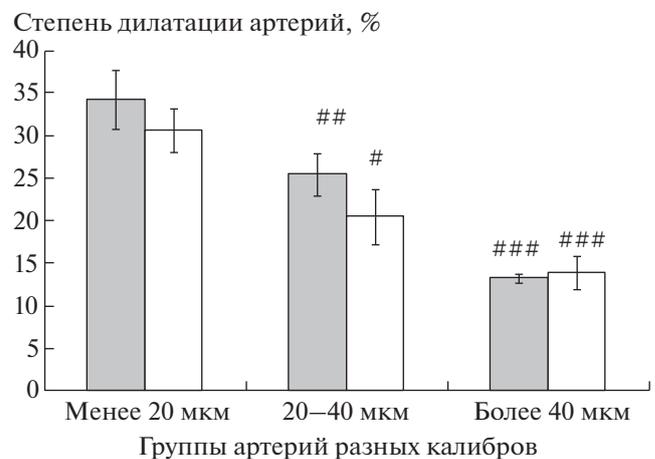


Рис. 1. Степень дилатации артерий различных диаметров на воздействие ацетилхолина. По оси абсцисс – группы сосудов с различными диаметрами, по оси ординат – степень дилатации АД, % относительно диаметра перед воздействием. Серая заливка – крысы в возрасте 4 мес, белая заливка – крысы в возрасте 26 мес. Изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у артерий диаметром менее 20 мкм (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, критерий Краскела–Уоллиса).

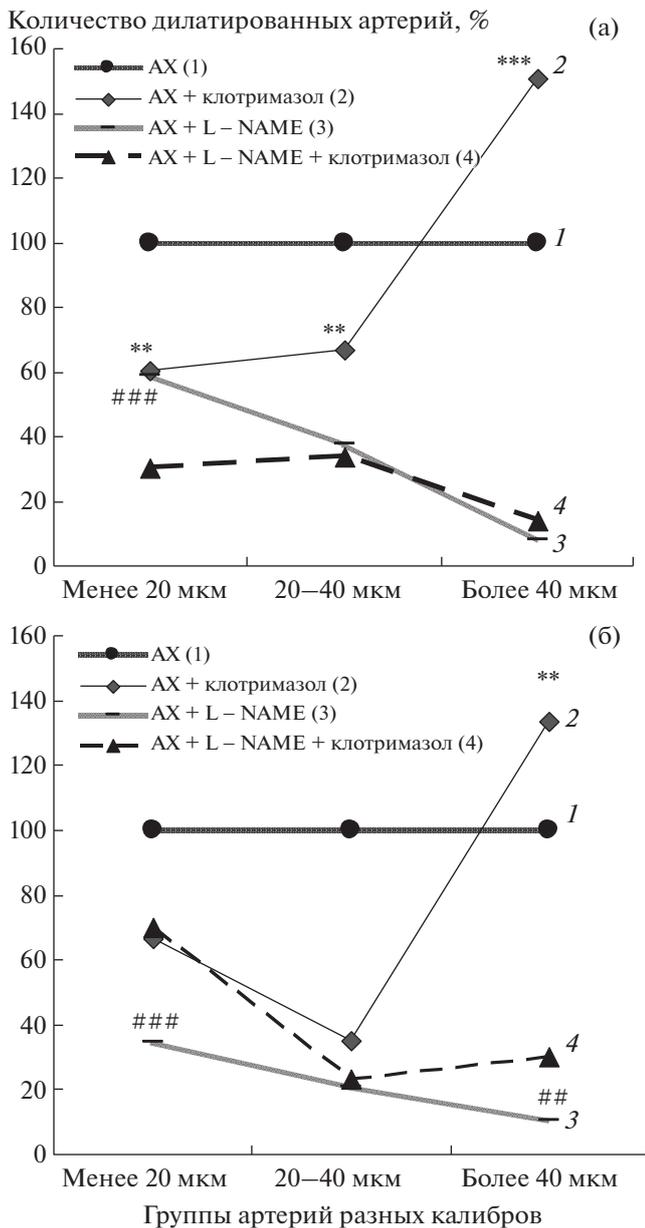


Рис. 2. Изменение числа расширившихся на ацетилхолин пиальных артериальных сосудов различных диаметров на фоне блокаторов. а – крысы в возрасте 4 мес, б – крысы в возрасте 26 мес. По оси абсцисс – группы сосудов с различными диаметрами, по оси ординат – число расширившихся на АХ артерий на фоне блокаторов относительно числа расширившихся на чистый АХ артерий, %. Изменения значимы по сравнению с соответствующими данными при одновременном применении блокаторов eNOS и IK_{Ca} -каналов (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ для данных при применении только клотримазола, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ для данных при применении только L-NAME, критерий χ^2 Пирсона).

на действие клотримазола сузились либо расширились, 32% – не изменили диаметр. В настоящее время известно, что в клетках сосудистой стенки образуются две основные группы метаболитов АА:

эпоксикоэкозатриеновые кислоты (ЕЕТ) и гидроксикоэкозатриеновые кислоты (НЕТЕ), которые обладают разнонаправленной активностью. ЕЕТ вызывают расслабление гладких мышц и расширение сосудов. НЕТЕ, в частности 20-НЕТЕ, напротив, являются одним из основных эндотелиальных факторов, обладающим сосудосуживающим действием [16]. Возникновение в наших экспериментах разнонаправленных реакций пиальных артериальных сосудов на клотримазол, вероятно, связано с блокадой различных реакций метаболизма АА. Поэтому для анализа изменения характера опосредованной АХ вазодилатации нами были отобраны только сосуды, сузившиеся в ответ на ингибирующее воздействие клотримазола. Сопоставление реакций дилатации этих сосудов на действие АХ до и на фоне клотримазола выявило, что у молодых крыс в группе мелких и средних сосудов воздействие клотримазола приводит к уменьшению числа расширившихся под действием АХ артерий в среднем на 39.8 и 33.6% соответственно (рис. 2а). В группе пиальных сосудов диаметром до 20 мкм на фоне действия клотримазола также достоверно снижается степень дилатации сосудов под действием АХ (рис. 3а). В то же время число расширившихся под действием АХ артерий и степень дилатации артерий диаметром более 40 мкм на фоне применения блокатора значительно возрастают (рис. 2а, 3а). Изменение реакции пиальных артериальных сосудов на АХ на фоне действия клотримазола может свидетельствовать о том, что механизм эндотелиальной гиперполяризации, индуцируемый активацией IK_{Ca} -каналов, играет значимую роль в опосредованной АХ дилатации пиальных артериальных сосудов крыс. Этот механизм выражен преимущественно в группе мелких пиальных артериальных сосудов. С увеличением диаметра сосудов роль этого механизма в опосредованной ацетилхолином дилатации снижается. Отмеченное нами значительное увеличение числа дилатированных артерий в ответ на действие АХ на фоне клотримазола в группе крупных пиальных артерий (диаметром более 40 мкм) может быть результатом перераспределения мозгового кровотока. Это необходимо для обеспечения нормального кровоснабжения головного мозга, в результате которого дилатация в одних участках пиальной сосудистой сети может быть реакцией на сужение сосудов в других ее участках.

У крыс в возрасте 26 мес, так же, как и у более молодых животных, клотримазол уменьшал число вызванных АХ дилатаций мелких и средних артерий (рис. 2б). Число дилатированных артерий диаметром более 40 мкм на фоне действия клотримазола значительно возросло. Однако, если у молодых животных число расширившихся под действием АХ мелких и средних артериальных сосудов снижалось примерно в равной степени (в среднем на 35%), то у крыс в возрасте 26 мес в этих группах сосудов были обнаружены различия (рис. 2а, 2б). Наибольшее

снижение числа дилатированных артерий отмечено в группе пиальных сосудов среднего калибра (на 65.7% по сравнению с 33.4% у мелких сосудов). В этой группе артерий на фоне действия клотримазола также зарегистрирована наименьшая степень дилатации (рис. 3а, 3б). Отмеченное нами возрастание роли эндотелиальной гиперполяризации, индуцируемой активацией $I\text{K}_{\text{Ca}}$ -каналов, в дилатации пиальных артериальных сосудов диаметром 20–40 мкм у крыс в возрасте 26 мес по сравнению с более молодыми животными, возможно, связано с описанным в литературе возрастным уменьшением диаметра и количества мелких пиальных артериальных сосудов [17]. Изменение просвета мелких сосудов при старении и уменьшение их числа значительно ограничивают функциональные возможности микроциркуляторной системы и могут приводить к адаптивному возрастанию роли эндотелиальной гиперполяризации в дилатации сосудов среднего звена. При старении также может нарушаться функциональная активность эндотелия, связанная, в частности, с синтезом NO, который значительно влияет на активность Ca^{2+} -чувствительных K^{+} -каналов. NO увеличивает концентрацию гладкомышечной cGMP и активирует cGMP -зависимые киназы, которые, в свою очередь, уменьшают ток ионов Ca^{2+} через потенциал зависимые кальциевые каналы, что приводит к вазодилатации [1, 3, 18].

Для исследования особенностей возрастных изменений роли NO в опосредованной ацетилхолином дилатации пиальных артерий нами изучались реакции артериальных сосудов на AX в условиях блокады эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), а также в условиях одновременной блокады eNOS и $I\text{K}_{\text{Ca}}$ -каналов.

Блокада eNOS раствором L-NAME у молодых животных вызывала уменьшение числа расширившихся под действием AX сосудов во всех трех группах. Наибольшее уменьшение (на 92.9%) наблюдалось в группе сосудов диаметром более 40 мкм. Количество дилатированных артерий средних диаметров снизилось на 62.5%, а в группе мелких пиальных артериальных сосудов после добавления L-NAME число опосредованных ацетилхолином реакций дилатации артерий уменьшилось примерно в 2 раза (рис. 2а). У мелких и средних сосудов также достоверно уменьшалась степень дилатации под действием AX. Наибольшее уменьшение (в среднем на 34.6%) наблюдалось у сосудов диаметром менее 20 мкм (рис. 3а). Следовательно, у крыс в возрасте 4 мес NO играет значительную роль в вызванной AX дилатации пиальных артериальных сосудов. И с увеличением диаметра сосудов роль NO-опосредованной эндотелий-зависимой дилатации возрастает.

У животных в возрасте 26 месяцев, так же, как и у более молодых крыс, снижение числа расширив-

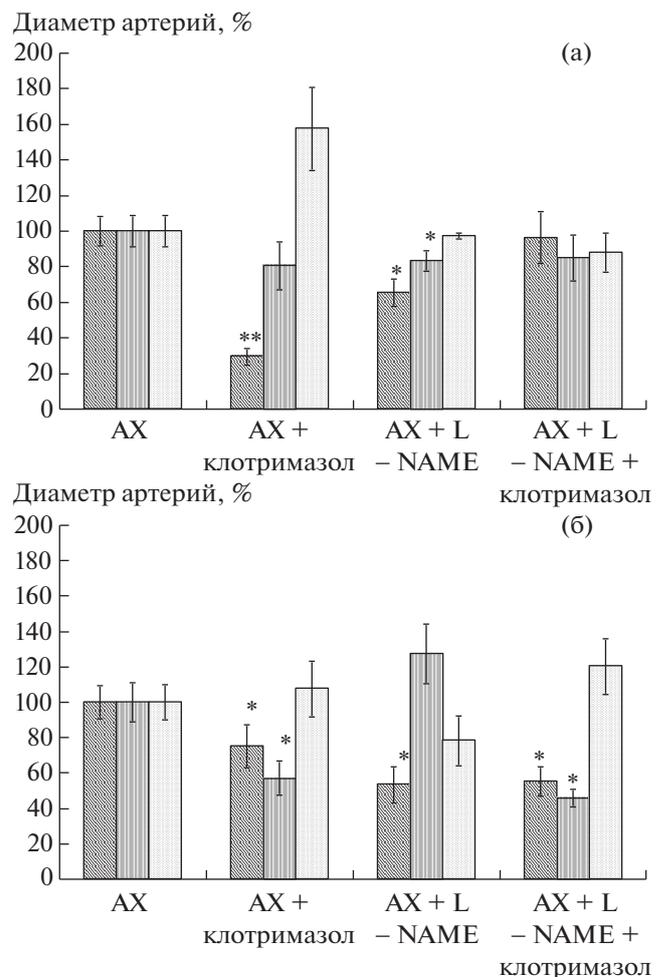


Рис. 3. Изменение диаметра артерий на воздействие ацетилхолина на фоне действия блокаторов. а – крысы в возрасте 4 мес, б – крысы в возрасте 26 месяцев. По оси ординат – диаметр артерий после AX на фоне блокаторов, % относительно их диаметра после AX в отсутствие блокады. Косая штриховка – мелкие артериальные сосуды диаметром менее 20 мкм, вертикальная – средние артерии диаметром 20–40 мкм, точечная – крупные артерии диаметром более 40 мкм. Изменения значимы по сравнению с соответствующими данными при воздействии чистого ацетилхолина (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, U -критерий Манна–Уитни).

шихся под действием AX артерий на фоне блокады синтеза NO отмечено во всех группах исследованных сосудов. Наибольшее снижение (на 89.5%) без достоверного изменения степени дилатации наблюдалось в группе крупных артерий диаметром более 40 мкм, что соответствовало аналогичным показателям у 4-месячных животных (рис. 2а, 2б). В группах мелких и средних артерий у 26-месячных крыс уменьшение числа дилатированных артерий в ответ на действие AX на фоне блокады NO, по сравнению с молодыми, было более значительным: на 62.6 и 79.5% соответственно (рис. 2а, 2б). Снижение числа расширившихся под действием AX

мелких сосудов у крыс в возрасте 26 мес, так же как и у молодых животных, сопровождалось достоверным уменьшением степени их дилатации (рис. 3а, 3б). Таким образом, можно утверждать, что по мере старения у крыс усиливается роль NO в вызванной ацетилхолином эндотелий-зависимой дилатации мелких и средних пиальных артериальных сосудов.

Совместное применение L-NAME и клотримазола у крыс в возрасте 4 месяцев приводило к снижению числа расширившихся под действием АХ артерий без достоверного уменьшения степени дилатации во всех группах исследованных сосудов (рис. 2а, 3а). Наибольшее снижение числа дилатированных артерий (на 86.4%) отмечено в группе крупных артерий диаметром более 40 мкм (рис. 2а). Число расширившихся под действием АХ сосудов диаметром от 20 до 40 мкм уменьшилось на 66.7%. Количество расширившихся под действием АХ средних и крупных артерий на фоне одновременного действия L-NAME и клотримазола было примерно таким же, как и в случае применения только одного блокатора eNOS (рис. 2а). Это обстоятельство указывает на ведущую роль NO-зависимых механизмов в вызванной АХ дилатации крупных и средних пиальных артериальных сосудов. Снижение числа расширившихся под действием АХ сосудов диаметром менее 20 мкм при одновременном применении L-NAME и клотримазола достоверно превышало показатели при действии каждого из блокаторов в отдельности (для клотримазола $\chi^2 = 18.2$, $f = 1$, $p < 0.001$, для L-NAME $\chi^2 = 17.1$, $f = 1$, $p < 0.0001$, критерий Пирсона) (рис. 2а). Это может свидетельствовать о том, что процессы эндотелиальной гиперполяризации, индуцируемой активацией IK_{Ca} -каналов, наряду с NO-зависимыми механизмами, играют значительную роль в вазодилаторных ответах мелких пиальных сосудов на АХ.

У крыс в возрасте 26 мес одновременное применение L-NAME и клотримазола, так же как и у молодых животных, приводило к уменьшению числа расширившихся под действием АХ средних и крупных артерий. Число расширившихся под действием АХ артерий диаметром 20–40 мкм достоверно не отличалось от аналогичного показателя при действии только одного L-NAME, но сопровождалось меньшей степенью дилатации. В то же время в группе крупных сосудов одновременное применение L-NAME и клотримазола, по сравнению с действием одного блокатора eNOS, снижало число расширившихся сосудов в меньшей степени ($\chi^2 = 11.5$, $f = 1$, $p < 0.001$, критерий Пирсона) (рис. 2б). В группе мелких артериальных сосудов одновременная блокада eNOS и IK_{Ca} -каналов привела к уменьшению числа расширившихся под действием АХ артерий в среднем на 30%, что примерно соответствовало данной величине в случае применения только одного клотримазола (рис. 2б). Полученные данные могут указывать на изменение при старе-

нии роли эндотелий-зависимых механизмов, связанных с активацией eNOS, в реакциях дилатации под действием ацетилхолина, обусловленных IK_{Ca} -индуцируемыми процессами эндотелиальной гиперполяризации у сосудов мелких и средних диаметров.

Таким образом, нашими исследованиями установлено, что с возрастом у крыс снижается вклад эндотелиальной гиперполяризации, индуцируемой активацией IK_{Ca} -каналов, в дилататорные реакции на ацетилхолин мелких пиальных артериальных сосудов с одновременным усилением роли этого механизма у артерий среднего калибра. Изменение механизмов вазодилатации в процессе старения, вероятно, связано с изменением функциональной активности эндотелия и усилением роли NO-опосредованных механизмов в эндотелий-зависимой вазодилатации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Источник финансирования – госбюджет. Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 гг. (ГП-14, раздел 64).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа выполнена на животных из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН” в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”, принятые Европейской конвенцией 19.07.2014 г. и требованиями Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.* 169 (7): 1486–1499. 2013.
2. Полонецкий О.Л., Полонецкий Л.З. Дисфункция эндотелия и атеросклероз. *Медицинские новости.* 6: 6–11. 2012. <http://www.mednovosti.by/Journal.aspx?id=266> [Polonetsky O.L., Polonetsky L.Z. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Medical News.* 6: 6–11. 2012. (In Russ.)]
3. Feletou M., Kohler R., Vanhoutte P.M. Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. *Annals of Medicine.* 44: 694–716. 2012.

4. *Brunt V.E., Minson C.T.* KCa channels and epoxyeicosatrienoic acids: major contributors to thermal hypereamia in human skin. *J. Physiol.* 590 (15): 3523–3534. 2012.
5. *Liang G.H., Xi Q., Leffler C.W. et al.* Hydrogen sulfide activates Ca²⁺ sparks to induce cerebral arteriole dilatation. *J. Physiol.* 590 (11): 2709–2720. 2012.
6. *Han J., Chen Z.W., He G.W.* Acetylcholine- and sodium hydrosulfide-induced endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in cerebral vessels of global cerebral ischemia-reperfusion rat. *J. Pharmacol. Sci.* 121: 318–326. 2013.
7. *Tang G., Yang G., Jiang B., Ju Y., Wu L., Wang R.* H₂S is an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Antioxidants and Redox Signaling.* 19: 1634–1646. 2013.
8. *Смаглий Л.В., Бирулина Ю.Г., Гусакова С.В., Ковалев И.В., Орлов С.Н.* Роль калиевой проводимости мембраны в механизмах действия сероводорода на сосудистые гладкие мышцы, предсокращенные активацией А1-адренорецепторов. *Вестник науки Сибири.* 15: 385–389. 2015. [*Smagly L.V., Birulina Yu.G., Guskova S.V., Kovalev I.V., Orlov S.N.* The role of potassium conductivity of the membrane in the mechanisms of the action of hydrogen sulfide on vascular smooth muscles, pre-shortened by the activation of A1-adrenergic receptors. *Bulletin of Siberian Science.* 15: 385–389. 2015. (In Russ.)]
9. *Bernatova I.* Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: Cause or consequence?. *BioMed. Res. Int.* V. Article ID 598271. 14 p. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/598271>
10. *Wang R.* Signaling pathways for the vascular effects of hydrogen sulfide. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 20 (2): 107–112. 2011.
11. *Garland C.J., Bagher P., Powell C., Ye X., Lemmey H.A.L., Borysova L., Dora K.A.* Voltage-dependent Ca²⁺ entry into smooth muscle during contraction promotes endothelium-mediated feedback vasodilation in arterioles. *Sci. Signal.* 10: eall3806. 2017.
12. *Стражеско И.Д., Акашева Д.У., Дудинская Е.Н., Ткачева О.Н.* Старение сосудов: основные признаки и механизмы. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика.* 11 (4): 93–100. 2012. [*Strazhesko I.D., Akasheva D.U., Dudinskaya E.N., Tkacheva O.N.* Vascular aging: main features and mechanisms. *Cardiovascular Therapy and Prevention.* 11 (4): 93–100. 2012. (In Russ.)].
13. *Дворецкий Д.П., Рыжикова О.П., Шуваева В.Н.* Сравнительная характеристика адренореактивности пиллярных артериальных сосудов у нормотензивных и спонтанно гипертензивных крыс. *Регионарн. кровообор. и микроциркуляция.* 1 (1): 75–81. 2002. [*Dvoretzky D.P., Ryzhikova O.P., Shuvaeva V.N.* Comparative characteristics of the adrenoactivity of pial arterial vessels in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Regional. Blood Circulation and Microcirculation.* 1 (1): 75–81. 2002. (In Russ.)].
14. *Lopez-Canales J.S., Lozano-Cuenca J., Munoz-Islas E., Aguilar-Carrasco J.C., Lopez-Canales O.A., Lopez-Mayorga R.M., Castillo-Henkel E.F., Valencia-Hernandez I., Castillo-Henkel C.* Mechanisms involved in the vasorelaxant effects produced by the acute application of amfepramone in vitro to rat aortic rings. *Brazilian J. Med. and Biol. Res.* 48 (6): 537–544. 2015.
15. *Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Горохов А.Г., Сергеева А.С., Курильская Т.Е., Пивоваров Ю.И., Рунович А.А.* Микросомальное окисление в физиологических и патологических процессах. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.* 4 (56): 170–180. 2007. [*Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G., Gorokhov A.G., Sergeeva A.S., Kuril'skaya T.E., Pivovarov Yu.I., Runovich A.A.* Microsomal oxidation in physiological and pathological processes. *Bulletin of the East-Siberian Scientific Center of the Russian Academy of Medical Sciences.* 4 (56): 170–180. 2007. (In Russ.)].
16. *Кржечковская В.В., Небольсин В.Е., Желтухина Г.А., Евстигнеева Р.П., Рубцова Е.Р.* Влияние цитохром Р450-зависимых метаболитов арахидоновой кислоты на функциональное состояние сосудов. *Вопросы медицинской химии.* 44 (5): С. 417–422. 1998. [*Krzhechkovskaya V.V., Nebolsin V.E., Zheltukhina G.A., Evstigneeva R.P., Rubtsova E.R.* Influence of cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolites on the functional state of the vessels. *Questions of Med. Chem.* 44 (5): 417–422. 1998. (In Russ.)].
17. *Соколова И.Б., Сергеев И.В., Федотова О.Р., Мельникова Н.Н., Дворецкий Д.П.* Возрастные изменения микроциркуляции в коре головного мозга у крыс-гипертоников. *Успехи геронтологии.* 29 (4): 567–572. 2016. [*Sokolova I.B., Sergeev I.V., Fedotova O.R., Melnikova N.N., Dvoretzky D.P.* Age-related changes in the microcirculation in the cerebral cortex in hypertensive rats. *Advances in Gerontology.* 29 (4): 567–572. 2016. (In Russ.)].
18. *Rosenfeld C.R., White R.E., Roy T. et al.* Calcium-activated potassium channels and nitric oxide coregulate estrogen-induced vasodilation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279 (1): 319–328. 2000.

Age-Related Changes in the Role of Calcium-Activated Potassium Channels in Acetylcholine Mediated Dilatation of Pial Arterial Vessels in Rats

O. P. Gorshkova^{a,#} and V. N. Shuvaeva^a

^a Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

[#]e-mail: o_gorshkova@inbox.ru

Age-related changes in the contribution of endothelial hyperpolarization induced by the activation of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (IK_{Ca}) channels and NO to acetylcholine-mediated dilatation of pial arterial vessels in rats were studied. Using intravital microphotography (×470), a comparative evaluation of pial arterial responses to acetylcholine chloride (ACh, 10⁻⁷ M, 5 min) with and without inhibition of IK_{Ca} channels (clotri-

mazole, 10^{-5} M) and NO (L-NAME, 10^{-3} M) was carried out in Wistar rats aged 4 and 26 months. The contribution of endothelial hyperpolarization and NO to vascular dilatation was evaluated by changes in the number of dilated arteries and the degree of their response to ACh after application of inhibitors. For the latter purpose, the erythrocyte flow width was measured in three individual groups of arteries: small- (<20 μm), medium- (20–40 μm) and large- (>40 μm) caliber. The obtained data indicate an age-related decrease in the contribution of endothelial hyperpolarization induced by activation of IK_{Ca} channels to ACh-induced dilatation of small-caliber pial arteries in rats. At the same time, the role of this mechanism in medium-caliber arteries increases. Apparently, the changes in the vasodilatation mechanisms that occur during aging are due to an increasing role of NO-mediated regulation of endothelium-dependent dilatation responses.

Keywords: endothelial hyperpolarization, pial vessels, endothelial NO-synthase