

**ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВКЛАДА NO И КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ
В ДИЛАТАЦИЮ ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНЫХ СОСУДОВ У КРЫС**

© 2021 г. В. Н. Шуваева¹, *, О. П. Горшкова¹

¹Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: shuvaevavn@infran.ru

Поступила в редакцию 13.08.2021 г.

После доработки 14.09.2021 г.

Принята к публикации 14.09.2021 г.

Важную роль в передаче сигналов от продуцируемого эндотелием NO к гладкомышечным клеткам сосудов играют кальций-зависимые калиевые каналы большой проводимости (BK_{Ca}-каналы). Целью работы было изучение возрастных изменений вклада NO и BK_{Ca}-каналов в вызванную ацетилхолином (АХ) дилатацию пиальных артерий и оценка роли eNOS- и iNOS-продуцируемого NO у крыс Вистар в возрасте 4-х и 9-ти месяцев. Для этого выключали механизмы регуляции сосудистого тонуса с помощью аппликации блокаторов и методом прижизненной микрофотосъемки регистрировали изменение диаметра пиальных артерий на АХ на фоне блокады BK_{Ca}-каналов тетраэтиламмонием (ТЭА), NO – L-NAME, iNOS – аминоксантином (AG). Определяли число дилатаций и степень дилатации пиальных артерий в ответ на действие АХ. Эти данные сравнивали с данными, полученными в отсутствие блокады. Оценивали вклад механизмов, опосредованных активацией BK_{Ca}-каналов, eNOS и iNOS, в дилатацию 3-х групп пиальных артерий: мелких (диаметром менее 20 мкм), средних (20–40 мкм) и крупных (более 40 мкм). У молодых крыс NO, продуцируемый eNOS, вносит значительный вклад в регуляцию АХ-индуцированной вазодилатации средних и крупных артерий, тогда как у мелких артерий преобладает активация BK_{Ca}-каналов. С возрастом снижается вклад eNOS-опосредованных механизмов в дилатацию средних и крупных артерий, но в процесс дилатации включается iNOS, а также повышается вклад в поддержание базального тонуса и функциональной активности BK_{Ca}-каналов средних и крупных пиальных артерий, которая зависит от NO, продуцируемого iNOS.

Ключевые слова: вазодилатация, пиальные артерии, кальций-чувствительные калиевые каналы большой проводимости, индуцибельная и эндотелиальная NO-синтазы, старение

DOI: 10.31857/S0869813921110091

ВВЕДЕНИЕ

Эндотелий продуцирует большое количество вазоактивных веществ [1, 2]. При старении, когда усиливается дисфункция эндотелия и зачастую нарушается мозговое кровообращение, способность сосудов регулировать кровоснабжение мозга приобретает жизненно важное значение, а исследование механизмов регуляции сосудистого тонуса, в частности вазодилатации, становится актуальным.

Возникновение дисфункции эндотелия (ЭД) при старении связывают со снижением биодоступности оксида азота (NO) [3, 4]. Эндогенный NO генерируется син-

тазой оксида азота (NOS). В сосудистой системе существует несколько видов NOS: эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS) и индуцибельная (iNOS) [5, 6]. Первичным источником эндогенного NO является эндотелиальная eNOS [6, 7]. С возрастом снижается уровень eNOS и повышается уровень iNOS [4]. Согласно экспериментальным и клиническим данным, в то время как активация eNOS генерирует небольшое количество NO в течение коротких периодов времени, стимуляция iNOS приводит к замедленному и длительному высвобождению большого количества NO [6, 7]. Чрезмерное количество NO усугубляет окислительно/нитрозативный стресс, приводящий к снижению биодоступности NO и ухудшению вазодилаторной функции эндотелия [6–8].

Значимую роль в передаче сигналов от продуцируемых эндотелием вазоактивных веществ к гладкомышечным клеткам (ГМК) сосудов играют кальций-зависимые калиевые каналы большой проводимости (BK_{Ca}-каналы). NO в сосудах головного мозга воздействует на BK_{Ca}-каналы либо непосредственно, либо через рианодиновые PKG-зависимые механизмы [9, 10], стимулируя чувствительные к рианодину запасы Ca²⁺ в саркоплазматическом ретикулуме и вызывая дискретные токи Ca²⁺, активирующие соседние кластеры BK_{Ca}-каналов [9]. Изменение активности BK_{Ca}-каналов, в свою очередь, также может изменять NO зависимую дилатацию сосудов [11]. Особенности возрастных изменений вклада NO и BK_{Ca}-каналов в дилатацию сосудов головного мозга к настоящему времени изучены не в полной мере. Учитывая, что уровень NO, продуцируемого eNOS, с возрастом снижается, интересным представляется исследовать, как изменяется вклад iNOS-продуцированного NO в дилаторную реакцию сосудов головного мозга у стареющих особей.

Целью данной работы было изучение возрастных изменений вклада NO и кальций-зависимых калиевых каналов большой проводимости в дилатацию мозговых сосудов. Проводилось сравнительное исследование вклада BK_{Ca}-каналов и NO в дилатацию пиальных артерий на воздействие ацетилхолина (АХ), а также оценивалась роль NO, продуцируемого eNOS- и iNOS, в дилатации на АХ у крыс Вистар в возрасте 4-х и 9-ти месяцев. Для этого использовали выключение механизмов регуляции сосудистого тонуса с помощью блокаторов и регистрировали реакцию пиальных артерий на воздействие АХ на фоне блокады BK_{Ca}-каналов, eNOS и iNOS и в ее отсутствие.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использованы самцы крыс Вистар в возрасте 4-ех ($n = 18$, масса тела 240 ± 20 г) и 9-ти месяцев ($n = 18$, масса тела 450 ± 30 г) из ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН”. Работа выполнена в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” (Европейская конвенция, 19.07.2014) и требованиями Комиссии по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. Были соблюдены все применяемые в исследованиях международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных. 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).

Крыс наркотизировали хлоралгидратом (43 мг/100 г массы тела, внутривенно). Среднее артериальное давление (АД) у наркотизированных крыс измеряли инвазивным методом через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к компьютеру, работающему с оригинальной программой визуализации значений АД, разрабо-

танной в нашей лаборатории. Среднее АД составило у наркотизированных крыс в возрасте 4-х месяцев — 97 ± 4 мм рт. ст., у крыс в возрасте 9-ти месяцев — 99 ± 4 мм рт. ст. Методом прижизненной микрофотосъемки через трепанационное отверстие площадью примерно 1.6 см^2 в теменной области черепа у каждого животного фотографировали пиальные сосуды в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором (температура раствора 37°C) Кребса (фоновое изображение) и их реакцию на воздействие — аппликацию того или иного вещества. Исследовали дилатацию пиальных артерий на АХ [12], который в концентрации 10^{-7} М вызывает преимущественно дилатацию артерий, в том числе церебральных [13], стимулируя образование в эндотелиальных клетках вазодилаторов, в частности NO.

Поочередно ингибируя с помощью блокаторов механизмы вазодилатации, мы регистрировали изменение числа дилатированных пиальных артерий и степени их дилатации в ответ на аппликацию АХ. Индуцированную АХ дилатацию в отсутствие блокады считали базовой реакцией (100% дилатаций), и с ней сравнивали результаты, полученные при ингибировании механизмов вазодилатации. Экспериментальных крыс разделили на 6 групп: 3 группы крыс в возрасте 4-х мес. и 3 группы крыс в возрасте 9-ти мес., в каждой группе было по 6 особей. У 2-х групп крыс в возрасте 4-х и 9-ти мес. изучали реакции артерий на орошение поверхности головного мозга раствором хлорида ацетилхолина (АХ, Sigma, 10^{-7} М, 5 мин) в отсутствие и на фоне блокады VK_{Ca} -каналов хлоридом тетраэтиламмония [14] (ТЕА, “Вектон”, Россия, 2 мМ, предварительное орошение поверхности мозга в течение 10 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора). У 2-х других групп крыс в возрасте 4-х и 9-ти мес. изучали реакции артерий на АХ в отсутствие и на фоне последовательной блокады NO-зависимой вазодилатации раствором метилового эфира нитро-L-аргинина [15, 16] (L-NAME, ICN Biomed. Inc, 10^{-3} М, предварительное орошение поверхности мозга в течение 10 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора) и затем совместной блокады NO и VK_{Ca} -каналов (L-NAME (10^{-3} М) + ТЭА (2 мМ), предварительное орошение поверхности мозга в течение 10 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокаторов). У 2-х последних групп крыс в возрасте 4-х и 9-ти мес. изучали реакции пиальных артерий на АХ в отсутствие и на фоне блокады iNOS раствором бикарбоната аминоксидина [16] (AG, ICN Biomed. Inc, 1 мМ, предварительное орошение поверхности мозга в течение 10 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокатора) и дополнительной блокады VK_{Ca} -каналов хлоридом тетраэтиламмония (ТЕА, “Вектон”, Россия, 2 мМ, предварительное орошение поверхности мозга в течение 10 мин с последующим добавлением АХ в раствор блокаторов).

В реакциях пиальных артерий на АХ в отсутствие блокады у крыс одного возраста значимых различий между животными внутри отдельных групп в сериях с введением различных блокаторов не обнаружено (проверка по критерию Краскела–Уоллеса). Эксперимент длился примерно 90 мин, после его окончания животных усыпляли передозировкой раствора хлоралгидрата.

На изображениях участков пиальной сосудистой сети измеряли (программа Inspector Matrox) ширину потока эритроцитов, соответствующую внутреннему диаметру сосуда. Об изменении роли VK_{Ca} -каналов и NO в дилатации сосудов судили по изменению числа дилатированных сосудов и степени их дилатации в ответ на воздействие АХ до и после применения блокаторов. У каждой крысы было измерено в среднем 40 ± 2 участка пиальной артериальной сосудистой сети. Для анализа исследованные артериальные сосуды были разделены на 3 группы в соответствии с их начальными диаметрами: 1) <20 мкм (мелкие), 2) $20\text{--}40$ мкм (средние) и 3) >40 мкм (крупные).

Изменение числа сосудов, расширившихся в ответ на воздействие, выражали в процентах относительно общего числа исследованных сосудов в группе. Степень дилатации ΔD оценивали как разность между значениями диаметра после (D_2) и до (D_1) воздействия препарата, отнесенную к диаметру сосуда D_1 перед воздействием, %:

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

Считали, что реакция на воздействие отсутствует, если изменения диаметра не превышали $5.0 \pm 0.5\%$. Это значение, как мы предварительно установили, регистрируется в покое в отсутствие каких-либо воздействий.

Данные по отдельной группе сосудов усреднялись для каждого животного и использовались для статистических сравнений. Анализ данных проводили с использованием программы InStat 3.02 ("GraphPad Software Inc.", США), данные представляли в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Сравнение средних данных независимых выборок при нормальном характере распределения вариант в совокупности данных (выборке) рассчитывали при помощи дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. При распределении вариант в выборке, отличном от нормального, при сравнении нескольких групп применяли критерий Краскела–Уоллиса. При попарном сравнении 2-х групп данных применяли *U*-критерий Манна–Уитни. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У 9-месячных крыс число дилатаций на АХ было достоверно меньше чем у 4-месячных ($p < 0.05$). Число дилатированных участков у артерий разных калибров составило в среднем $35.4 \pm 1.6\%$ от количества исследованных участков у 9-месячных крыс и $41.3 \pm 2.2\%$ у 4-месячных животных. Степень дилатации на АХ артерий различных диаметров снижалась от мелких к более крупным сосудам во всех группах крыс обоих возрастов. Выключая поочередно изучаемые механизмы вазодилатации, сравнивали данные об АХ-индуцированной дилатации пиальных артерий на фоне блокады с результатами реакции на АХ в ее отсутствие (число дилатаций в отсутствие блокады принимали за 100%).

Аппликация ТЕА у крыс в возрасте 4-ех месяцев вызывала констрикцию 65% мелких сосудов и в среднем около 40% средних и крупных артерий. Число дилаторных реакций на воздействие АХ на фоне предварительного введения ТЕА снижалось на 42, 34 и 23% у мелких, средних и крупных артерий соответственно (рис. 1а).

На фоне блокады NOS посредством L-NAME число АХ-индуцированных дилатаций у 4-месячных крыс снижалось значительно: у мелких и средних артерий примерно в равной степени на 54 и 51% соответственно. Сильнее всего, на 86%, была подавлена АХ-индуцированная дилатация крупных артерий (рис. 1а). Одновременная блокада VK_{Ca} -каналов и NO у молодых крыс приводила к подавлению АХ-индуцированной дилатации во всех группах сосудов. (рис. 1а). Наиболее выраженные изменения отмечены в группе крупных сосудов (на 78%). С уменьшением диаметра различия в реакциях на АХ до и после одновременной блокады VK_{Ca} -каналов и NO достоверно снижались ($p < 0.05$, KW = 12.1, критерий Краскела–Уоллиса), и в группе мелких сосудов снижение числа дилатаций составляло 39%. При этом уменьшение дилатации у мелких артерий было примерно таким же, как при блокаде только VK_{Ca} -каналов, а у средних и крупных соответствовало значениям, полученным при блокаде только eNOS (*U*-критерий Манна–Уитни).

На фоне блокады iNOS у молодых крыс в возрасте 4-ех месяцев число АХ-индуцированных дилатаций во всех группах артерий не изменялось по сравнению с реакцией на АХ в отсутствие блокады. Совместная блокада VK_{Ca} -каналов и iNOS

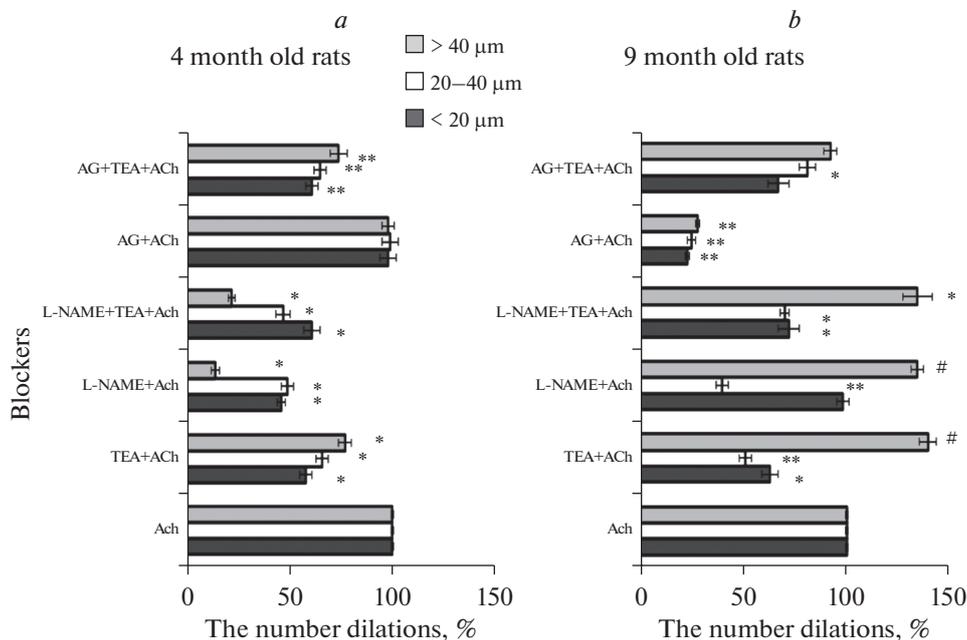


Рис. 1. Изменение числа индуцированных АХ дилатаций пиальных артерий разных калибров на фоне блокады BK_{Ca} -каналов (TEA + ACh), либо eNOS (L-NAME + ACh), либо одновременной блокады eNOS и BK_{Ca} -каналов (L-NAME + TEA + ACh), либо iNOS (AG + ACh), либо одновременной блокады iNOS и BK_{Ca} -каналов (AG + TEA + ACh) относительно дилатации на ACh в отсутствие блокады (100%) у крыс в возрасте 4-ех (a) и 9-ти месяцев (b). По оси ординат: примененные блокаторы, по оси абсцисс: число ACh-индуцированных дилатаций при блокаде (%) относительно числа дилатаций в отсутствие блокады (100%). Число дилатированных участков у мелких сосудов, <20 мкм – темная заливка, у средних сосудов, 20–40 мкм – белая заливка, у крупных сосудов, >40 мкм – серая заливка. # – $p < 0.05$, * – $p < 0.01$, ** – $p < 0.001$.

приводила к снижению АХ-индуцированной дилатации мелких и средних артерий в среднем на 35%, а крупных пиальных артерий на 26% (рис. 1a). Это снижение соответствовало уменьшению числа дилатаций на фоне блокады только BK_{Ca} -каналов (U-критерий Манна–Уитни, рис. 1a).

Степень дилатации на АХ при блокировании BK_{Ca} -каналов у 4-месячных крыс снижалась на 28.7 ± 4.0 , 25.6 ± 3.4 и $40.2 \pm 2.2\%$ соответственно у мелких, средних и крупных артерий (рис. 2a). Применение L-NAME в качестве блокатора не вызывало достоверного изменения степени дилатации во всех группах артерий по сравнению с АХ-индуцированной дилатацией в отсутствие блокады. Совместная блокада BK_{Ca} -каналов и eNOS у молодых крыс приводила к снижению степени дилатации мелких артерий на $13.0 \pm 3.3\%$, средних – на $23.2 \pm 3.8\%$ и крупных – на $27.3 \pm 2.5\%$, тогда как блокада iNOS не изменяла степень дилатации у сосудов всех калибров. На фоне совместной блокады BK_{Ca} -каналов и iNOS снижение степени дилатации было примерно таким же, как на фоне блокады только BK_{Ca} -каналов: на 23.9 ± 4.4 , 26.4 ± 3.2 и $39.6 \pm 4.2\%$ у мелких, средних и крупных пиальных артерий соответственно (рис. 2a).

Аппликация ТЕА у крыс в возрасте 9-ти месяцев вызывала констрикцию 52% мелких и средних артерий и 60% крупных. В группе средних и крупных артерий

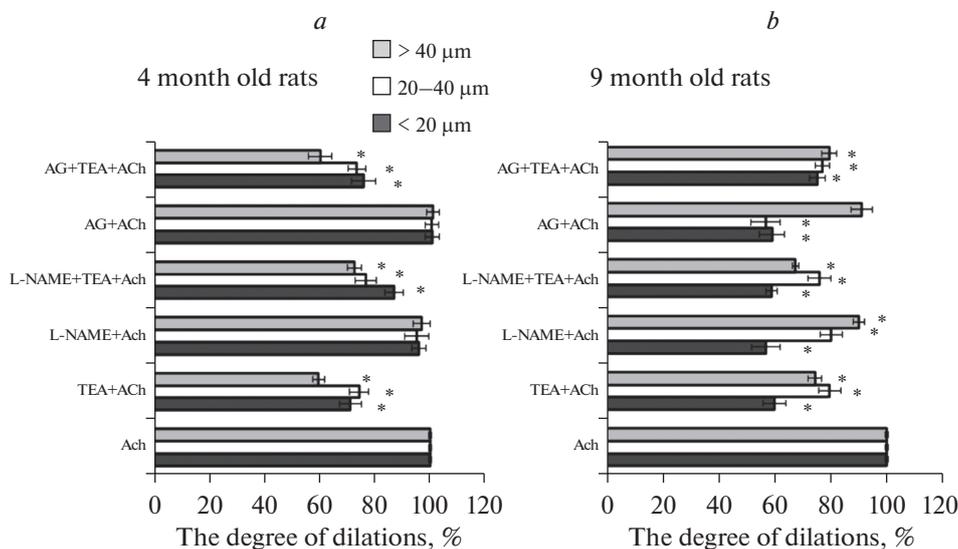


Рис. 2. Изменение степени индуцированных АХ дилатаций пиальных артерий разных калибров на фоне блокады BK_{Ca} -каналов (TEA + ACh), либо eNOS (L-NAME + ACh), либо одновременной блокады eNOS и BK_{Ca} -каналов (L-NAME + TEA + ACh), либо iNOS (AG + ACh), либо одновременной блокады iNOS и BK_{Ca} -каналов (AG + TEA + ACh) относительно дилатации на ACh в отсутствие блокады (100%) у крыс в возрасте 4-ех (a) и 9 месяцев (b). По оси ординат: примененные блокаторы, по оси абсцисс: степень АХ-индуцированных дилатаций при блокаде (%) относительно степени дилатации в отсутствие блокады (100%). Степень дилатации мелких сосудов, <20 мкм – темная заливка, средних сосудов, 20–40 мкм – белая заливка, крупных сосудов, >40 мкм – серая заливка. * – $p < 0.01$.

число констрикций достоверно превышало значения (43 и 46%), полученные на более молодых крысах ($p < 0.01$, $U = 45.1$, U-критерий Манна–Уитни). Число дилатаций на воздействие АХ на фоне предварительного введения ТЕА у крыс в возрасте 9-ти месяцев в группах мелких и средних артерий уменьшилось по сравнению с базовой дилатацией на АХ (на 37 и 49% соответственно). Число дилатированных участков крупных артерий на фоне блокады BK_{Ca} -каналов увеличилось до 139% (рис. 1b). Уменьшение числа и степени дилатаций в среднем на 40% на фоне блокады BK_{Ca} -каналов в группе мелких артерий у 9-месячных крыс соответствовало значениям аналогичных показателей у 4-месячных животных (U-критерий Манна–Уитни), а в группе средних артерий – уменьшение числа дилатаций (в среднем на 49%) было достоверно более значительным, чем у молодых крыс (на 34%, $p < 0.01$, $U = 1$, U-критерий Манна–Уитни). Степени дилатации средних и крупных артерий у 9- и 4-месячных крыс достоверно не различались (U-критерий Манна–Уитни).

На фоне блокады eNOS у 9-месячных крыс число АХ-индуцированных дилатаций мелких артерий не менялось по сравнению с реакцией в отсутствие блокады, у средних уменьшалось на 60% и существенно увеличивалось до 134% у крупных пиальных артерий (рис. 1b). Снижение числа дилатаций средних артерий до $40 \pm 3\%$ у 9-месячных крыс соответствовало аналогичному значению у 4-месячных животных. Число дилатаций крупных артерий у 9-месячных крыс было достоверно больше ($134 \pm 3\%$, $p < 0.01$, $U = 18$, U-критерий Манна–Уитни), степень дилатации средних и крупных артерий не отличалась от аналогичных значений у 4-месячных крыс (U-критерий Манна–Уитни).

Совместная блокада VK_{Ca} -каналов и eNOS у 9-месячных крыс приводила к подавлению АХ-индуцированной дилатации в группах мелких и средних артерий: соответственно на 28 и 30%, а в группе крупных артерий – к увеличению количества дилатаций на 34% (рис. 1*b*). При этом число дилатаций мелких артерий ($72 \pm 5\%$) было примерно таким же, как при блокаде только VK_{Ca} -каналов ($63 \pm 4\%$, U -критерий Манна–Уитни) (рис. 1*b*), но много меньше, чем при блокаде только eNOS ($98.0 \pm 1.1\%$, $p < 0.01$, $U = 11.22$, U -критерий Манна–Уитни). А в группе средних артерий уменьшение числа АХ-индуцированных дилататорных ответов на фоне совместной блокады eNOS и VK_{Ca} -каналов было достоверно меньше (на $30 \pm 1\%$), чем при применении каждого из блокаторов в отдельности (L-NAME на $60.0 \pm 1.1\%$, $p < 0.01$, $U = 27.54$, U -критерий Манна–Уитни, ТЭА на $49.0 \pm 1.1\%$, $p < 0.01$, $U = 19.2$, U -критерий Манна–Уитни). Число дилатаций крупных артерий при совместной блокаде eNOS и VK_{Ca} -каналов ($134 \pm 2.6\%$) соответствовало значениям, полученным при применении каждого из блокаторов в отдельности (ТЭА: 139.0 ± 1.5 , $p > 0.05$, $U = 8$, U -критерий Манна–Уитни; L-NAME: $134.0 \pm 1.1\%$, $p > 0.05$, $U = 18$, U -критерий Манна–Уитни).

У крыс в возрасте 9-ти месяцев на фоне блокады iNOS число дилатированных участков артерий всех калибров значительно снизилось во всех группах сосудов в среднем на 75% (рис. 1*b*). Совместная блокада iNOS и VK_{Ca} -каналов достоверно снижала число дилатаций мелких артерий на 33% ($p < 0.001$, $U = 16$, U -критерий Манна–Уитни) и средних артерий на 19% ($p < 0.001$, $U = 25$, U -критерий Манна–Уитни), достоверного снижения числа дилатаций крупных артерий не зарегистрировано (рис. 1*b*). В группе мелких сосудов это снижение (на $33.0 \pm 1.8\%$) соответствовало значениям, полученным при применении только блокатора VK_{Ca} -каналов (на $42.0 \pm 1.1\%$, $p < 0.01$, $U = 0$, U -критерий Манна–Уитни).

Степень АХ-индуцированной дилатации у 9-месячных крыс на фоне блокады VK_{Ca} -каналов снижалась у мелких артерий на $39.8 \pm 4.0\%$, средних – на $20.2 \pm 4.0\%$ и крупных – на $25.5 \pm 2.4\%$. Блокада eNOS приводила к снижению степени дилатации мелких артерий на $42.9 \pm 5.0\%$, средних – на $19.7 \pm 4.0\%$ и крупных – на $9.8 \pm 2.0\%$ (рис. 2*b*). На фоне совместной блокады VK_{Ca} -каналов и eNOS степень дилатации уменьшалась на $40.9 \pm 2.0\%$ у мелких, на $23.8 \pm 4.0\%$ – у средних и на $32.4 \pm 1.2\%$ – у крупных артерий. Степень АХ-индуцированной дилатации у 9-месячных крыс на фоне блокады iNOS у мелких и средних артерий снижалась в среднем на 40%, тогда как у крупных артерий снижение степени дилатации составило только $8.9 \pm 3.8\%$ (рис. 1*b*, 2*b*). Совместная блокада VK_{Ca} -каналов и iNOS приводила к снижению степени дилатации сосудов всех исследованных диаметров в среднем на 20% (рис. 2*b*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большое количество экспериментов на животных и клинических исследований показали, что старение вызывает дисфункцию эндотелия (ЭД), приводящую к снижению вазодилатации. Наше исследование подтвердило предыдущие сообщения. У крыс в возрасте 9-ти месяцев число пилальных артерий, расширившихся в ответ на воздействие АХ, было достоверно меньше, чем у более молодых животных.

Известно, что воздействуя на сосудистую стенку, АХ вызывает активацию мускариновых рецепторов. Стимуляция последних приводит к увеличению цитозольного кальция, что является необходимым условием для высвобождения из эндотелия вазодилататоров, таких как NO, простагландины, эндотелиальный гиперполярирующий фактор и др. [17]. В качестве ключевого фактора развития ЭД при старении в настоящее время рассматривается уменьшение генерации NO эндотелием и нарушение его диффузии от эндотелия к ГМК, т.е. изменение уровня и

биодоступности NO [4]. В наших экспериментах у 4-месячных крыс на фоне блокады eNOS значительно снижалось число дилатаций во всех группах артерий без изменения степени дилатации (рис. 1a, 2a). Число АХ-индуцированных дилатаций мелких и средних артерий снизилось примерно вдвое по сравнению с реакцией в отсутствие блокады, наибольшее снижение числа дилатаций (на 86%) отмечено у крупных артерий. По сравнению с 4-месячными крысами у 9-месячных животных на фоне применения L-NAME в группе мелких сосудов уменьшалась только степень дилатации, без изменения числа дилатированных сосудов (рис. 1b, 2b). Снижение числа и степени дилатации средних артерий у 9-месячных крыс соответствовало аналогичным значениям у более молодых животных, тогда как число дилатаций крупных артерий на фоне блокады NO увеличивалось. Таким образом, нами были обнаружены возрастные изменения NO-опосредованной дилатации мелких и крупных пиальных артерий. Увеличение количества дилатаций крупных сосудов на фоне блокады eNOS у стареющих животных может быть связано с дисбалансом активных форм кислорода и оксида азота, характерном для стареющих особей [18]. Было показано, что дисбаланс в соотношении NO и супероксид-анионов из-за преобладания супероксид-анионов приводит к изменению реакционной способности сосудов [5]. Также, несмотря на то, что одной из основных причин нарушения эндотелий-зависимой вазодилатации считается снижение активности eNOS, в последнее время было установлено, что с возрастом в сосудистой ткани повышается экспрессия другого типа NO-синтаз – индуцибельной NO-синтазы [5]. Это предполагает, что iNOS может вносить вклад в вызванную старением эндотелиальную дисфункцию [5, 6, 18, 19].

В наших экспериментах применение селективного блокатора iNOS – аминогуанидина достоверно уменьшало число и степень АХ-индуцированной дилататорной реакции исследованных артериальных сосудов у 9-месячных крыс, тогда как у молодых крыс число и степень дилатаций сосудов достоверно не изменялись. Следовательно, можно утверждать, что у крыс в возрасте 4-ех месяцев индуцибельная NO-синтаза либо не образуется, либо ее активность крайне невысока, старение же сопровождается включением iNOS в процесс дилатации пиальных артерий всех калибров. Ингибирование iNOS уменьшает уровень вазоактивного NO в клетках, тем самым повышая сосудистый тонус и уменьшая эндотелий-зависимую дилатацию [20].

Значимую роль в передаче сигналов от продуцируемых эндотелием вазоактивных веществ к ГМК сосудов играют VK_{Ca} -каналы [21]. Применение ТЭА, являющегося блокатором калиевых каналов, преимущественно ингибирующим VK_{Ca} -каналы, у крыс в возрасте 4-ех месяцев в наших экспериментах приводило к констрикции в среднем 65% мелких и 45% средних и крупных пиальных артериальных сосудов. Число и амплитуда АХ-опосредованных дилататорных реакций сосудов, предварительно подвергнутых воздействию ТЕА, у 4-месячных крыс снижались во всех группах исследованных сосудов (рис. 1a, 2a). Эти данные показывают, что в физиологических условиях VK_{Ca} -каналы участвуют в поддержании базального тонуса и обеспечении вазодилататорных реакций пиальных артериальных сосудов на воздействие АХ. У 9-месячных крыс, по сравнению с более молодыми животными, число констрикций в ответ на применение блокатора VK_{Ca} -каналов увеличивалось в среднем на 50–60% только в группах средних и крупных пиальных артериальных сосудов. Число АХ-опосредованных дилатаций мелких и средних артерий на фоне блокады VK_{Ca} -каналов у крыс в возрасте 9-ти месяцев уменьшалось в среднем на 44% (рис. 1b). Уменьшение числа дилатаций в группе мелких артерий у 9-месячных крыс соответствовало значениям у 4-месячных животных, а в группе средних артерий было выражено сильнее, чем у молодых крыс. Следовательно, можно предпо-

ложить, что с возрастом вклад VK_{Ca} -каналов в АХ-индуцированный дилататорный ответ увеличивается только в группе средних пиальных артериальных сосудов.

Число расширившихся на воздействие АХ крупных артерий на фоне блокады VK_{Ca} -каналов возрастало (рис. 1*b*). Известно, что в АХ-индуцированной эндотелий-зависимой вазодилатации наряду с другими факторами немаловажную роль играет механизм эндотелиальной гиперполяризации. Гиперполяризация распространяется по щелевым контактам вдоль эндотелия и радиально по миоэндотелиальным соединениям, вызывая расслабление ГМК [22–24]. Для распространения гиперполяризации важно наличие активированных ионных каналов. Ведущую роль в этом процессе отводят чувствительным к электрическому напряжению K^+ -каналам (K_v) и VK_{Ca} -каналам [22, 25, 26]. Роль и функции VK_{Ca} -каналов весьма разнообразны [27]. Активация VK_{Ca} -каналов внутриклеточными, локальными и временными токами (“искрами”) Ca^{2+} оказывает гиперполяризующее влияние на мембранный потенциал ГМК, снижая активность потенциал-зависимых кальциевых каналов и ограничивая приток Ca^{2+} , тем самым способствуя релаксации ГМК и расширению сосудов. VK_{Ca} -каналы регулируются различными факторами, которые могут изменять условия их открытия, чувствительность к Ca^{2+} и экспрессию субъединиц. Вероятность открытия VK_{Ca} -каналов определяется как мембранным напряжением, так и внутриклеточной концентрацией Ca^{2+} и Mg^{2+} [28]. При старении пути передачи сигналов между эндотелиальными и ГМ клетками могут меняться. Экспериментально было показано, что с возрастом изменяются экспрессия и функции VK_{Ca} -каналов [28], и активация VK_{Ca} -каналов может снижать эффективность дилатации [22]. В литературе имеются сведения о том, что в покое у старых животных, по сравнению с молодыми особями, открыто больше калиевых каналов [25]. Это приводит к тому, что радиальные миоэндотелиальные переходы сохраняются [23] и местная дилатация осуществляется локальными токами Ca^{2+} [29], но продольное проведение электрических сигналов по эндотелию для координации расслабления ГМК, необходимого для дилатации сосуда, с возрастом нарушается [22, 24, 25, 30]. Электрические сигналы, проходя вдоль эндотелия, рассеиваются, область передачи сигнала уменьшается [25]. У старых особей происходит большая утечка и рассеяние сигнала в силу того, что у них открыто больше K^+ -каналов. Блокада K^+ -каналов у старых животных, предотвращая диссипацию электрического сигнала, может приводить к восстановлению и даже увеличению продольной электропроводности, и, следовательно, к увеличению дилатации [22, 25, 31]. Полученные нами данные указывают на нарушение способности эндотелия проводить электрические сигналы, связанное с изменением активности калиевых каналов, в частности VK_{Ca} -каналов, опосредующих дилатацию крупных пиальных артерий у 9-месячных крыс.

При совместной блокаде eNOS и VK_{Ca} -каналов у крыс в возрасте 4-х месяцев число АХ-индуцированных дилатаций и степень дилататорной реакции во всех группах артерий существенно снижались относительно реакции на АХ в отсутствие блокады (рис. 1*a*, 2*a*). При этом уменьшение дилатации у мелких артерий было примерно таким же, как при блокаде только VK_{Ca} -каналов, а у средних и крупных соответствовало значениям, полученным при блокаде только eNOS. Эти данные указывают на преимущественный вклад механизма активации NO в регуляцию АХ-индуцированной дилатации средних и крупных артерий у молодых крыс [6] и преобладание механизма активации VK_{Ca} -каналов в дилатации мелких артерий [32].

У 9-месячных крыс при совместной блокаде eNOS и VK_{Ca} -каналов зафиксировано снижение АХ-индуцированной дилатации в группах мелких и средних арте-

рий. При этом число дилатаций мелких артерий было примерно таким же, как при блокаде только VK_{Ca} -каналов (рис. 1*b*, 2*b*), но много меньше, чем при блокаде только eNOS, что указывает на существенный вклад VK_{Ca} -каналов в дилатацию мелких пиальных артерий у этих животных. А в группе средних артерий уменьшение числа АХ-индуцированных дилататорных ответов на фоне совместной блокады eNOS и VK_{Ca} -каналов было достоверно меньше, чем при применении каждого из блокаторов в отдельности. Число дилатаций крупных артерий при совместной блокаде eNOS и VK_{Ca} -каналов увеличивалось и соответствовало значениям, полученным при применении каждого из блокаторов в отдельности, что может свидетельствовать о равном участии обоих исследованных механизмов в АХ-индуцированной дилатации крупных пиальных артерий. Следовательно, на основании полученных данных можно утверждать, что старение сопровождается снижением роли NO-опосредованных механизмов в дилатации средних и крупных пиальных артерий.

На фоне одновременной блокады VK_{Ca} -каналов и iNOS у 4-месячных крыс число АХ-индуцированных дилатаций и их степень во всех группах пиальных артерий снижались примерно до значений, полученных на фоне блокады только VK_{Ca} -каналов (рис. 1*a*, 2*a*). У крыс в возрасте 9-ти месяцев совместная блокада iNOS и VK_{Ca} -каналов приводила к уменьшению числа АХ-индуцированных дилатаций только в группе мелких артерий (рис. 1*b*, 2*b*). Это снижение соответствовало значениям, полученным при применении только блокаторов VK_{Ca} -каналов. Уменьшение числа и степени дилатации средних сосудов проявлялось в меньшей степени, чем в случае применения каждого из блокаторов в отдельности. А в группе крупных сосудов совместное применение блокаторов iNOS и VK_{Ca} -каналов позволило исключить увеличение числа АХ-опосредованных дилатаций, наблюдаемое на фоне применения только блокатора VK_{Ca} -каналов. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при старении NO, продуцируемый iNOS, наряду с NO, синтезируемым eNOS, играет роль в регуляции активности VK_{Ca} -каналов и в индуцированной АХ дилатации пиальных артериальных сосудов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное исследование вклада NO и VK_{Ca} -каналов в дилатацию пиальных артериальных сосудов показало, что у молодых крыс механизм, опосредованный NO, продуцируемым eNOS, играет значительную роль в регуляции АХ-индуцированной вазодилатации средних и крупных артерий. С уменьшением диаметра сосудов возрастает роль регуляторных процессов, связанных с активацией VK_{Ca} -каналов.

С возрастом снижается вклад eNOS-опосредованных механизмов в дилатацию средних и крупных артерий, но в процесс дилатации включается iNOS. Старение также сопровождается повышением вклада в поддержание базального тонуса и функциональной активности VK_{Ca} -каналов средних и крупных пиальных артерий, которая зависит от NO, продуцируемого iNOS.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы “Фундаментальные научные исследования для долгосрочного развития и обеспечения конкурентоспособности общества и государства” (47_110_ДРиОК, раздел 64.1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование экспериментов – О.П.Г.; проведение экспериментов, получение данных – В.Н.Ш., О.П.Г.; обработка результатов экспериментов – В.Н.Ш.; написание и редактирование статьи – В.Н.Ш., О.П.Г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang DX, Gutterman DD (2011) Transient receptor potential channel activation and endothelium-dependent dilation in the systemic circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 57(2): 133–139. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181fd35d1>
2. Thakore P, Earley S (2019) Transient Receptor Potential Channels and Endothelial Cell Calcium Signaling. *Compr Physiol* 9(3): 1249–1277. <https://doi.org/10.1002/cphy.c180034>
3. Puzserova A, Ilovska V, Balis P, Slezak P, Bernatova I (2014) Age-related alterations in endothelial function of femoral artery in young SHR and WKY rats. *Biomed Res Int* 2014(1): 658479. <https://doi.org/10.1155/2014/658479>
4. Sertedaki E, Veroutis D, Zagouri F, Galyfos G, Filis K, Papalambros A, Aggeli K, Tsioli P, Charalambous G, Zografos G, Sigala F (2020) Carotid Disease and Ageing: A Literature Review on the Pathogenesis of Vascular Senescence in Older Subjects. *Curr Gerontol Geriatr Res* 13; 2020: 8601762. <https://doi.org/10.1155/2020/8601762>
5. Tian J, Yan Z, Wu Y, Zhang SL, Wang K, Ma XR, Guo L, Wang J, Zuo L, Liu J, Quan L, Liu HR (2010) Inhibition of iNOS protects endothelial-dependent vasodilation in aged rats. *Acta Pharmacol Sin* 31(10): 1324–1328. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.111>
6. Cau SB, Carneiro FS, Tostes RC (2012) Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. *Front Physiol* 3: 218. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00218>
7. Tejero J, Shiva S, Gladwin MT (2019) Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol Rev* 1: 99(1): 311–379. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2017>
8. Feletou M, Kohler R, Vanhoutte PM (2012) Nitric oxide: Orchestrator of endothelium-dependent responses. *Ann Med* 44: 694–716. <https://doi.org/10.3109/07853890.2011.585658>
9. Yuill KH, McNeish AJ, Kansui Y, Garland CJ, Dora KA (2010) Nitric oxide suppresses cerebral vasomotion by sGC-independent effects on ryanodine receptors and voltage-gated calcium channels. *J Vasc Res* 47(2): 93–107. <https://doi.org/10.1159/000235964>
10. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF (2017) Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr Physiol* 7(2): 485–581. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
11. Schmid J, Müller B, Heppeler D, Gaynullina D, Kassmann M, Gagov H, Mladenov M, Gollasch M, Schubert R (2018) The unexpected role of calcium-activated potassium channels: limitation of NO-induced arterial relaxation. *J Am Heart Assoc* 7(7): e007808. <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007808>
12. Sandow SL, Senadheera S, Grayson TH, Welsh DG, Murphy TV (2012) Calcium and endothelium-mediated vasodilator signaling. *Adv Exp Med Biol* 740: 811–831.
13. Шуваева ВН, Горшкова ОП (2018) Модуляция тонуса церебральных артерий ацетилхолином у крыс разных линий. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 104(7): 807–816. [Shuvaeva VN, Gorshkova OP (2018) Modulation of cerebral artery tone by acetylcholine in rats of different strains. *Russ J Physiol* 104(7): 807–816. (In Russ)].
14. Wang J, Kim D (2018) Activation of voltage-dependent K⁺ channels strongly limits hypoxia-induced elevation of [Ca²⁺]_i in rat carotid body glomus cells. *J Physiol* 596(15): 3119–3136. <https://doi.org/10.1113/JP275275>
15. Kaneguchi A, Ozawa J, Minamoto K, Yamaoka K (2020) Nitric oxide synthase inhibitor L-NG-nitroarginine methyl ester (L-NAME) attenuates remobilization-induced joint inflammation. *Nitric Oxide* 96: 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.01.003>
16. Gericke A, Goloborodko E, Sniatecki JJ, Steege A, Wojnowski L, Pfeiffer N (2013) Contribution of nitric oxide synthase isoforms to cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles. *Exp Eye Res* 109: 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.01.012>

17. Matz RL, Schott C, Stoclet JC, Andriantsitohaina R (2000) Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol Res* 49(1): 11–18.
18. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L (2018) Oxidative stress, aging and diseases. *Clin Interv Aging* 13: 757–772. .
<https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
19. Васина ЛВ, Петрищев НН, Власов ТД (2017) Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры. Регионарное кровообращение и микроциркуляция 16(1): 4–15. [Vasina LV, Petrishchev NN, Vlasov TD (2017) Endothelial dysfunction and its main markers. *Regional blood circul and microcircul* 16(1): 4–15. (In Russ)].
<https://doi.org/10.24884/1682-6655-2017-16-1-4-15>
20. Солодков АР, Ятковская НМ (2013) Изменения эндотелий-зависимой дилатации и альфа-1 адренореактивности аорты крыс, вызванные ингибированием индуцибельной NO-синтазы после ограничения двигательной активности. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 99(7): 859–868. [Solodkov AP, Iatskovskaia NM (2013) Changes in endothelium-dependent dilation and alpha1-adrenoreactivity of rat aorta caused by inducible NO-synthase inhibition after motor activity restrictions. *Russ J Physiol* 99(7): 859–868. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1038/nn.4533>
21. Earley S (2011) Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by transient receptor potential and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 57(2): 148–153.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3181f580d9>
22. Beleznaï TZ, Yarova PL, Yuill KH, Dora KA (2011) Smooth muscle Ca²⁺-activated and voltage-gated K⁺ channels modulate conducted dilation in rat isolated small mesenteric arteries. *Microcircul* 18: 487–500.
<https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2011.00109.x>
23. de Wit C, Griffith TM (2010) Connexins and gap junctions in the EDHF phenomenon and conducted vasomotor responses. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 459: 897–914.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00424-010-0830-4>
24. Feher A, Broskova Z, Bagi Z (2014) Age-related impairment of conducted dilation in human coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306: H1595–H1601.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00179.2014>
25. Behringer EJ, Shaw RL, Westcott EB, Socha MJ, Segal SS (2013) Aging impairs electrical conduction along endothelium of resistance arteries through enhanced Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(8): 1892–1901.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301514>
26. Longden TA, Dabertrand F, Koide M, Gonzales A, Tykocki NR, Brayden JE, Hill-Eubanks D, Nelson MT (2017) Capillary K⁺-sensing initiates retrograde hyperpolarization to locally increase cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 20(5): 717–726.
<https://doi.org/10.1038/nn.4533>
27. Krishnamoorthy-Natarajan G, Koide M (2016) BK Channels in the Vascular System. *Int Rev Neurobiol* 128: 401–438.
<https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.03.017>
28. Carvalho-de-Souza JL, Varanda WA, Tostes RC, Chignalia AZ (2013) BK Channels in Cardiovascular Diseases and Aging. *Aging Dis* 4(1): 38–49.
29. 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>
30. Behringer EJ, Hakim MA (2019) Functional interaction among KCa 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>
31. Behringer EJ, Segal SS (2012) Tuning electrical conduction along endothelial tubes of resistance arteries through Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Circ Res* 110: 1311–1321.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.262592>
32. Ye Y, Gao M, Feng L, Feng B, Ma X (2019) Isoliquiritigenin-induced vasodilation by activating large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in mouse mesenteric arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 46(11): 1044–1052.
<https://doi.org/10.1111/1440-1681.13156>

Age Changes in the Contribution of NO and Potassium Channels to the Dilatation of the Pial Arterial Vessels in Rats**V. N. Shuvaeva^a, * and O. P. Gorshkova^a**^a *Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia***e-mail: shuvaevavn@infran.ru*

Calcium-dependent high-conductance potassium channels (BK_{Ca}-channels) play an important role in signaling from NO produced by endothelium to vascular smooth muscle cells. The aim of this work was to study age-related changes in the contribution of NO and BK_{Ca}-channels to acetylcholine (ACh)-induced dilatation of pial arteries and to assess the role of eNOS- and iNOS-produced NO in Wistar rats at the age of 4 and 9 months. For this, the mechanisms of regulation of vascular tone were turned off using blockers, and the change in the diameter of the pial arteries to acetylcholine (ACh) against the background of blockade of BK_{Ca}-channels with tetraethylammonium (TEA), NO – L-NAME, iNOS – aminoguanidine (AG) was recorded by the method of intravital microphotography. The number of dilatations and the degree of dilatation of the pial arteries in response to ACh were determined. These data were compared with data obtained in the absence of blockade. The contribution of the mechanisms mediated by the activation of BK_{Ca}-channels, eNOS and iNOS, to the dilatation of 3 groups of pial arteries: small (less than 20 μm in diameter), medium (20–40 μm), and large (more than 40 μm) was evaluated. In young rats, NO produced by eNOS makes a significant contribution to the regulation of AX-induced vasodilation of medium and large arteries, while in small arteries, activation of BK_{Ca}-channels predominates. With age, the contribution of eNOS-mediated mechanisms to the dilatation of the middle and large arteries decreases, but iNOS is included in the dilatation process, and the contribution to the maintenance of the basal tone and functional activity of the BK_{Ca}-channels of the middle and large pial arteries increases, which is dependent of NO produced iNOS.

Keywords: inducible and endothelial NO-synthase, calcium-sensitive high conductance potassium channels, vasodilation, pial arteries, aging