

ВКЛАД ВК-КАНАЛОВ В ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОЕ НАРУШЕНИЕ КРОВОТОКА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

© 2025 г. О. П. Горшкова*

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

**E-mail: o_gorshkova@inbox.ru*

Поступила в редакцию 27.09.2024 г.

После доработки 07.11.2024 г.

Принята к публикации 09. 11.2024 г.

Ишемически-реперфузионное (И/Р) повреждение церебральных сосудов – сложный динамический процесс, приводящий к гипоксическому повреждению головного мозга. Для улучшения исхода и лечения последствий И/Р требуется понимание молекулярных механизмов изменений, происходящих в мозговом сосудистом русле после восстановления кровотока, с целью выявления терапевтических внутриклеточных мишеней. В качестве таких мишеней могут быть рассмотрены кальций-зависимые калиевые каналы большой проводимости (ВК), обладающие высокой чувствительностью к гипоксии. В работе исследовано изменение вклада ВК-каналов в дилатацию пиальных артерий крыс после И/Р. С использованием метода видеомикроскопии сосудов у перенесших И/Р и ложнооперированных крыс сопоставлялись число и степень дилататорных реакций в ответ на воздействие ацетилхолин хлорида (АХ, 10^{-7} М, 8 мин) и донора экзогенного сероводорода (H_2S) – гидросульфида натрия (30 мкМ, 2 мин) до и после блокады ВК-каналов хлоридом тетраэтиламмония (2 мМ, 5 мин). Обнаружено, что И/Р угнетает дилататорную реакцию. Изменения АХ-индуцированной вазодилатации сохраняются на протяжении 21 дня после И/Р. Нарушения H_2S -опосредованных процессов отмечаются только в первые 14 дней и зависят от размера сосуда. В основе изменений вазодилатации может лежать постепенное развивающееся снижение вклада ВК-каналов, преимущественно выраженное на крупных пиальных артериях. Снижение вклада ВК каналов в дилатацию максимально выражено через 14 дней и сохраняется на протяжении 21 дня после И/Р.

Ключевые слова: ишемически-реперфузионное повреждение сосудов, пиальные артерии, ВК-каналы

DOI: 10.31857/S0869813925020068, **EDN:** UIRLJG

ВВЕДЕНИЕ

Восстановление мозгового кровотока после перенесенной ишемии очень часто сопровождается развитием ишемически-реперфузионных (И/Р) повреждений, связанных с развитием гипоксии, вызванной сосудистыми нарушениями [1]. Постишемические гипоксические процессы могут сохраняться на протяжении достаточно длительного времени. Так, в проведенном нами ранее исследовании было обнаружено, что И/Р коры головного мозга у крыс в последующий 21 день сопровождается постепенно развивающимся нарушением перфузии коры головного мозга, угнетением активных механизмов регуляции кровотока, снижением потребления кислорода тканью коры и уменьшением

насыщения крови кислородом [2]. И/Р повреждение – это динамический процесс, но взаимосвязь между первичными ишемическими нарушениями и последующими процессами, происходящими в сосудистом русле, к настоящему времени изучена недостаточно. Понимание механизмов изменений, происходящих в церебральном сосудистом русле не только во время И/Р, но и после восстановления кровотока, необходимо для выявления внутриклеточных мишеней и молекулярных путей, которые можно было бы использовать для улучшения исходов и лечения долгосрочных последствий И/Р.

Процессы, развивающиеся после перенесенной И/Р, могут приводить к нарушению вазоактивных реакций, в возникновении которых ключевая роль отводится постишемическому увеличению уровня кальция внутри клетки [3, 4]. Высокие уровни кальция могут изменять активность кальций-зависимых калиевых (K_{Ca}) каналов, тем самым влияя на выраженность сосудистых реакций [5]. В связи с этим K_{Ca} каналы могут быть рассмотрены в качестве терапевтической мишени при лечении И/Р повреждений. Семейство K_{Ca} каналов включает в себя каналы с малой (SK), средней (IK) и большой проводимостью (BK) [1]. Литературные данные [6, 7] и наши предыдущие исследования [8] свидетельствуют о том, что И/Р, а также длительная или периодически повторяющаяся гипоксия усиливают активность SK и IK каналов. Другая группа K_{Ca} каналов – BK-каналы, также подвержена ишемически-гипоксическому (ИГ) повреждению. Эти каналы в стенке сосудов преимущественно обнаруживаются в гладкомышечных клетках (ГМК) [9]. Помимо этого, они представлены в эндотелии и в митохондриальных (mitoBK) и ядерных (nBK) мембранах [9, 10]. Данные об изменении роли BK-каналов в сосудистой регуляции при гипоксии и после перенесенной И/Р, полученные на сосудах лабораторных животных и человека, весьма противоречивы. В литературе имеются указания на то, что BK-каналы очень чувствительны к изменению уровня кислорода и перенесенное И/Р воздействие приводит к их активации [10, 11]. Другими авторами показано гипоксическое ингибирование BK-каналов [5, 6, 12]. Несмотря на противоречивость полученных данных, нарушение активности этих каналов рассматривается в качестве одного из основных факторов, определяющих тяжесть И/Р повреждения [13, 14]. Механизмы, лежащие в основе изменений активности BK-каналов после И/Р, остаются не до конца изученными. Но высказывается мнение, что они зависят от локализации каналов, времени гипоксического воздействия и времени, прошедшего после И/Р, а также ткане- и видоспецифичны [6, 12, 15]. Это дает повод для более подробного изучения потенциального участия BK-каналов в И/Р нарушениях сосудистой регуляции на разных этапах постишемического периода.

Физиологическая активность BK-каналов зависит от уровня мембранной деполаризации и концентрации цитозольного Ca^{2+} [16] и может модулироваться многочисленными эндогенными медиаторами, внутриклеточными сигнальными белками, пептидными токсинами, мембранными липидами, гормонами и др. [14]. Также BK-каналы являются мишенью для газотрансмиттеров, которые играют значительную роль в развитии сосудистых И/Р повреждений. Основным газотрансмиттером, регулирующим функционирование сосудистой системы, считается монооксид азота (NO). NO может воздействовать на BK-каналы напрямую или активируя путь растворимой гуанилатциклазы [14, 16, 17]. Ишемия и сопутствующая ей гипоксия приводят к снижению экспрессии и активности эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) [18]. При этом уменьшается синтез NO за счет увеличения количества свободных радикалов, стимулирующих работу эндотелия и активирующих работу индуцибельной NO-синтазы [19]. В совокупности описанные выше нарушения приводят к снижению биодоступности NO [18]. И/Р, снижая NO-опосредованный компонент вазорелаксации, может усиливать вклад в вазодилатацию другого газотрансмиттера – сероводорода (H_2S) [20], который также регулирует активность BK каналов [9]. Острая ишемия и гипоксия приводят к повышению выработки H_2S эндотелием сосудов [21]. Но описаны случаи, когда реперфузионные повреждения и длительная или приходящая гипоксия уменьшают выработку H_2S в эндотелии сосудов за счет снижения экспрес-

сии цистатионин γ -лиазы – фермента, вырабатывающего H_2S , или повышенного поглощения H_2S свободными радикалами вследствие развития окислительного стресса [22, 23]. В литературе [24, 25] рассматривается вопрос и о том, что NO и H_2S не всегда являются независимыми регуляторами сосудистых реакций. Они обладают перекрестными путями передачи сигналов в сосудистой стенке и влияют на биосинтез друг друга. Ишемия может усиливать взаимодействие между NO и H_2S [25]. И/Р нарушение синтеза или доступности любого из этих газотрансмиттеров может приводить к изменению вклада ВК-каналов в вазодилатацию. В задачи данной работы входила оценка изменений дилатации мозговых сосудов крыс после перенесенной И/Р коры головного мозга и вклада ВК-каналов в эти процессы. Исследовались дилататорные реакции пиальных артерий на воздействие ацетилхолин хлорида (АХ), преимущественно обусловленные NO-зависимыми процессами, и сероводород-опосредованные дилатации.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовалась модель И/Р коры головного мозга крыс, включающая пережатие двух сонных артерий в течение 12 мин с одновременным управляемым снижением артериального давления (АД) [8]. И/Р подвергались самцы крыс Sprague-Dawley массой 440–510 г из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН» ($n = 44$), которые до и после И/Р содержались в стандартных условиях вивария.

Исследование сосудистых реакций

Реакции сосудов исследовали в отдельных группах крыс, разделенные на которые производилось в зависимости от времени, прошедшего после И/Р. Накопленные литературные данные указывают на то, что после ишемического повреждения в головном мозге развивается нейровоспаление, которое может вносить вклад в патогенез постишемических повреждений: изменять интенсивность кальциевых волн и влиять на вазоактивные процессы, связанные с активацией кальций-зависимых каналов [26, 27]. Выраженность нейровоспаления со временем уменьшается, о чем свидетельствует снижение уровня провоспалительных агентов и маркеров воспаления [27] и их роли в сосудистых реакциях [28], начиная с 3-7-го дня после ишемии. С целью избежать влияния воспаления на вазоактивные реакции в нашей работе изучение изменений сосудистых реакций начиналось через 7 дней ($n = 12$) после И/Р. Для изучения долгосрочных последствий были выбраны еще 2 временных промежутка с шагом в 7 дней – 14 ($n = 16$) и 21 день ($n = 15$) после ишемии. Крысы, которым проводилось хирургическое вмешательство без ишемического воздействия (ложнооперированные (ЛО)) служили контролем. Их также разделяли на 3 отдельные группы: крысы через 7 ($n = 13$), 14 ($n = 16$) и 21 ($n = 14$) день после операции.

В каждой группе крысы наркотизировались золетилом (внутрибрюшинно, 20 мг/кг, Virbac, Франция). После этого через трепанационное окно в теменной области черепа, внутри которого удалялась твердая мозговая оболочка, изучали прижизненные реакции пиальных артерий на орошение мозговой поверхности раствором действующего вещества [8]. В опытах с ацетилхолин хлоридом исследовались сосудистые реакции на 8-минутное орошение раствором АХ в концентрации 10^{-7} М в отсутствие и после блокады ВК-каналов неспецифическим блокатором – тетраэтиламмоний хлоридом (ТЕА, «Вектон», Россия). Блокада осуществлялась путем предварительного 5-минутного орошения поверхности мозга раствором ТЕА в концентрации 2 мМ. H_2S -индуцированные реакции вызывались в ответ на воздействие донора экзогенного сероводорода – раствора гидросульфида натрия (NaHS, Sigma-Aldrich). Исследовали реакции сосудов на 2-минутное воздействие раствором NaHS в концентрации 30 мкМ до и на фоне блокады ВК каналов раствором ТЕА. После прекращения воздействия АХ или NaHS и до применения блокатора проводили отмывку поверхности головного мозга раствором Кребса в течение

20 мин до достижения исследуемыми сосудами исходных размеров. Реакции на воздействие АХ и NaHS до применения блокатора считали фоновыми. В каждой группе крыс они анализировались по всему массиву сосудов и принимались за 100%.

Во время экспериментов ректальная температура тела животных поддерживалась на уровне 38 °С, также контролировалось среднее АД [8]. Длительность эксперимента составляла около 60 мин. На протяжении этого времени показатели АД значительно не изменялись и составляли в среднем 132 ± 6 мм рт. ст. После окончания опытов проводилась эвтаназия животных передозировкой раствора зоветила.

Видеомикроскопия пиальных сосудов

Изображение пиальных сосудов, расположенных на поверхности мягкой мозговой оболочки, получали при использовании микроскопа МС-2ZOOM («Микромед», Россия) со встроенной цветной камерой-видеоокуляром для микроскопа Basler acA 4600–10с (Германия, разрешение 14 МР, 4608 x 3288 px). Изображение передавалось на экран компьютера. Действительное увеличение сосуда на экране вычислялось с помощью стандартного объект-микрометра и составило 210 крат.

После получения изображения на статичных картинках визуально производился выбор артериальных участков сосудистой сети для измерения их диаметра с использованием компьютерной программы Blood Vessel Media Analyzer (© Denis Chouvaev, Швеция). Программа предусматривает улучшение резкости изображения, измерение диаметра сосуда в пикселях и калибровку для пересчета результатов измерений в микрометры (рис. 1). Измерение диаметра производится путем установки метки на изображение участка сосуда, в пределах которой автоматически определяются границы потока эритроцитов, соответствующие внутреннему диаметру сосуда. Алгоритм работы программы основан на выделении объекта путем анализа различных оттенков серого. Метки устанавливаются оператором вручную по всей длине сосудистого участка на одинаковом расстоянии друг от друга с шагом 40–50 мкм.

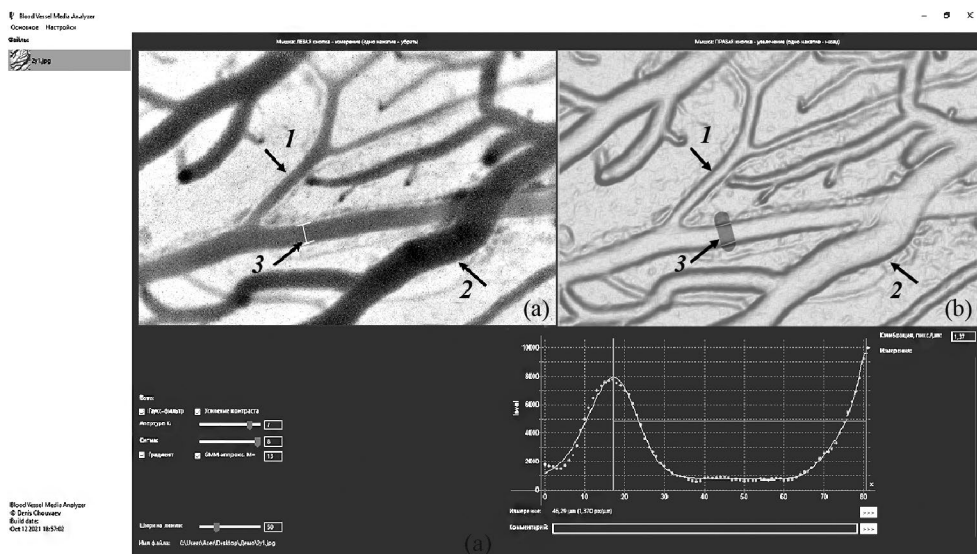


Рис. 1. Изображение участка пиальной сосудистой сети в программе для измерения диаметра сосудов: (а) – оригинальное изображение; (б) – изображение после обработки в программе. Стрелками обозначено: 1 – пиальная артерия; 2 – пиальная вена; 3 – метка для измерения диаметра.

У каждой крысы было измерено от 30 до 60 участков сосудов. При анализе реакций измеренные участки артерий делились на группы в зависимости от их диаметра: мелкие (диаметром от 9 до 20 мкм), средние (от 20 до 40 мкм) и крупные (более 40 мкм). Такой подход позволил выявить зависимость реакций сосудов от их диаметра. Для статистических сравнений данные по отдельной группе сосудов усредняли для каждого животного. Число расширившихся и сузившихся на воздействие сосудов выражали в процентах относительно общего числа исследованных артерий в группе [8]. Изменение вклада ВК-каналов в тонус сосудов оценивали по изменению числа сосудов, сузившихся в ответ на воздействие ТЕА и степени их констрикции. Сравнение числа дилатированных сосудов и степени их дилатации в ответ на воздействие АХ или NaHS до и после применения ТЕА позволяло определять вклад ВК каналов в дилатацию.

Статистика

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2019 и программы InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США). Нормальность распределения выборки определялась в тесте Колмогорова–Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок при сравнении двух групп проводилось с использованием непарного *t*-теста. Сравнение большего числа групп осуществлялось с применением двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. Результаты исследований приведены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У крыс после И/Р по сравнению с ЛО было отмечено уменьшение числа дилатаций сосудов в ответ на воздействие АХ и NaHS без изменения степени их расширения (амплитуды дилатации). Число АХ-индуцированных дилатаций сосудов всех исследованных диаметров через 7 дней после И/Р уменьшилось в среднем на 25–30% (рис. 2). К 14-му дню уменьшение составило 40–60%, а спустя 21 день – 20–30% (рис. 2). Из-

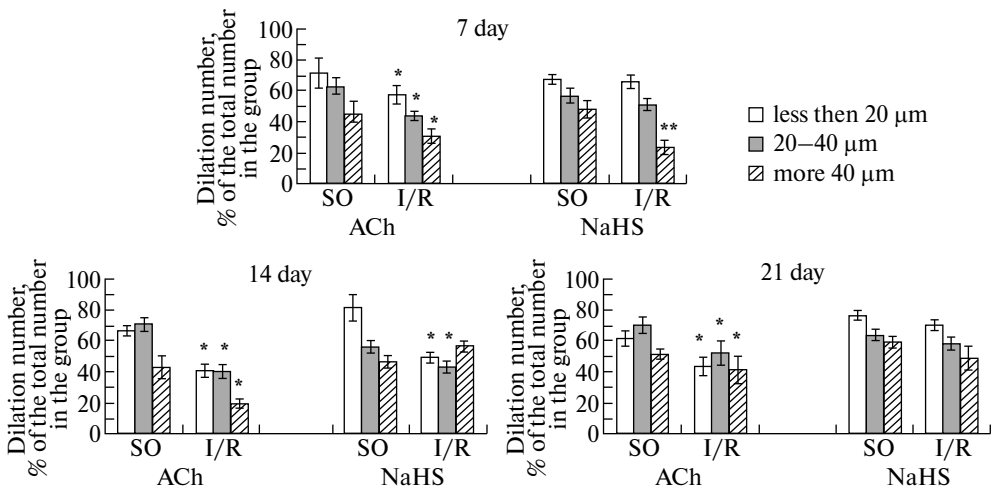


Рис. 2. Число дилатаций артерий у крыс, перенесших ишемию, (I/R) в разные отрезки постинфарктного периода. Сравнение с показателями у ложнооперированных крыс (SO); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

менение H_2S -опосредованных вазодилатаций (уменьшение) происходило только в первые 14 дней после И/Р. Через 7 дней на $48.96 \pm 4.2\%$ ($p = 0.003$) уменьшилось число дилатаций крупных сосудов. К 14-му дню – мелких и средних артерий на $35.57 \pm 1.51\%$ ($p = 0.014$) и $23.75 \pm 3.22\%$ ($p = 0.017$) соответственно (рис. 2).

Орошение поверхности головного мозга раствором ТЕА у ЛО крыс вызывало констрикцию 25–35 % сосудов (рис. 3) всех исследованных диаметров в среднем на 15–20%. И/Р увеличила число констрикций мелких сосудов на воздействие блокатора ВК-каналов в среднем на 30–40% без изменения амплитуды реакции. Эти изменения наблюдались во все исследованные временные отрезки после ишемии (рис. 3). Достоверных изменений констрикторной реакции сосудов средних диаметров у И/Р крыс по сравнению с ЛО отмечено не было. Число и амплитуда констрикций крупных сосудов снижались (в среднем на 35% и 13% соответственно) в период с 14-го до 21-го дня после И/Р (рис. 3а, б).

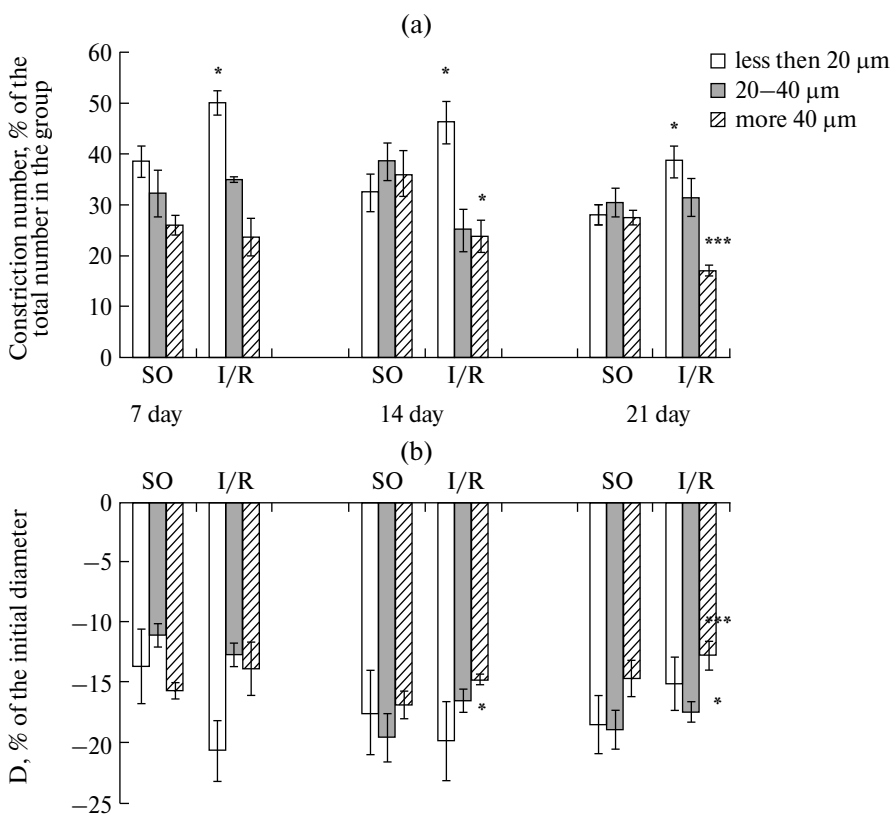


Рис. 3. Изменение констрикторной реакции на воздействие ТЕА после И/Р: (а) – число констрикций (% от общего числа исследованных артерий); (б) – амплитуда констрикции (% относительно диаметра артерии до воздействия АХ или NaHS). Различия значимы по отношению к соответствующим значениям у ложнопериоперированных крыс (SO); * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$.

Блокада ВК-каналов у ЛО крыс уменьшала АХ-опосредованную дилатацию сосудов всех исследованных диаметров (рис. 4а, с). Через 7 и 14 дней после И/Р изменения реакции мелких и средних артерий после блокады не отличались от изменений у ЛО крыс (рис. 4а, с). Дилатация крупных артерий увеличивалась. Число дилатаций возра-

стало в 1.5–2 раза, амплитуда реакции – в среднем на 15% (рис. 4а, с). Спустя 21 день после И/Р число дилатаций мелких и средних сосудов в ответ на воздействие АХ при блокаде ВК-каналов уменьшалось, но в достоверно меньшей степени, чем у ЛО животных (разница составила около 50%, рис.4а). При этом ТЕА не изменял дилатацию крупных сосудов (рис. 4а, с).

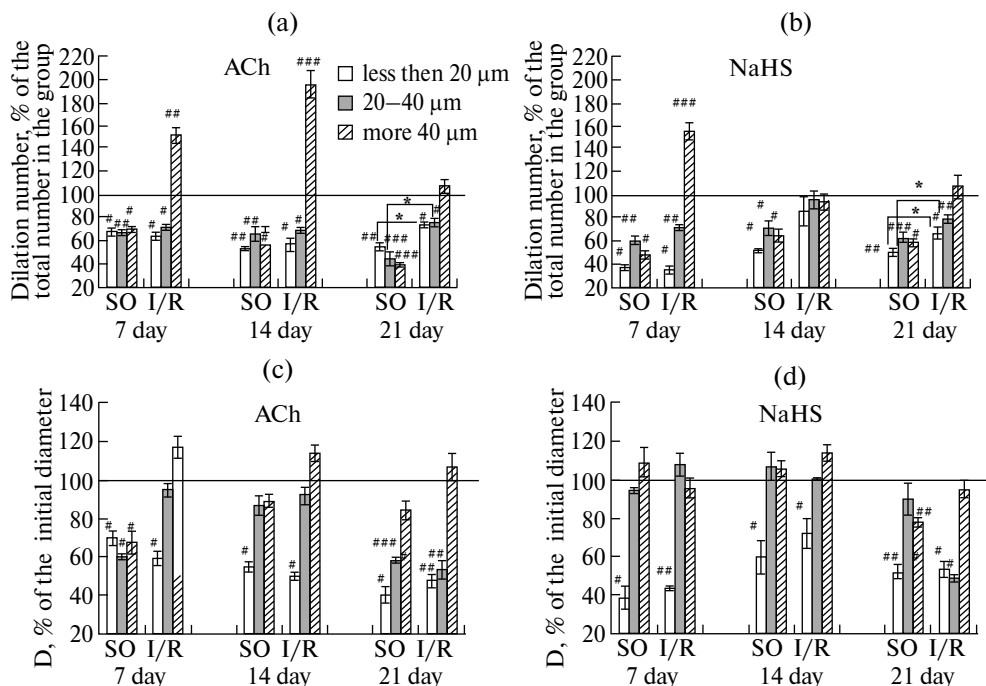


Рис. 4. Влияние блокады ВК каналов на дилататорную реакцию в ответ на воздействие АХ и NaHS у ЛО крыс (SO) и крыс, перенесших ишемию (I/R): (а, б) — число дилатаций (% от общего числа исследованных артерий); (с, д) — амплитуда дилатации (% относительно диаметра артерии до воздействия АХ или NaHS). *Линия* — реакция на введение АХ или NaHS без применения ТЕА, принятая за 100%. * — различия статистически значимы по сравнению с ложнооперированными крысами (SO); # — различия значимы по отношению к значениям, полученным без применения ТЕА; ## $p < 0.05$, #* $p < 0.01$, ### $p < 0.0001$.

Блокада ВК-каналов также влияла на дилататорную реакцию в ответ на воздействие NaHS. У ЛО крыс число дилатаций сосудов всех исследованных диаметров уменьшалось в среднем на 30% (рис. 3б), амплитуда изменялась только на мелких сосудах (снижалась в среднем на 30–55%) (рис. 4д). У крыс, перенесших ишемию, через 7 дней после И/Р изменения H_2S -опосредованных дилатаций мелких и средних сосудов на фоне блокады ВК-каналов соответствовали изменениям у ЛО крыс. Число дилатаций крупных сосудов на фоне блокады увеличивалось на $55.17 \pm 2.39\%$ ($p < 0.0001$) без изменения амплитуды реакции (рис. 4б, д). Через 14 дней ТЕА не изменял H_2S -опосредованную реакцию сосудов всех диаметров (рис. 4б, д). На 21-й день у И/Р крыс число дилатаций мелких и средних сосудов на фоне блокады ВК уменьшалось, но в меньшей степени, чем у ЛО крыс. На мелких артериях уменьшение составило $32.49 \pm 4.85\%$ ($p = 0.015$) по сравнению с $48.54 \pm 2.72\%$ ($p = 0.029$) у ЛО (рис. 4б). Число средних артерий уменьшилось на $20.05 \pm 3.09\%$ ($p = 0.012$) по сравнению с $40.23 \pm 4.19\%$ ($p = 0.036$) у ЛО (рис. 4б). Дилататорная реакция крупных сосудов достоверно не изменялась (рис. 4б, д).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

И/Р изменяет дилататорную реакцию пиальных артерий крыс на воздействие АХ. Уменьшение числа дилатаций без изменения амплитуды реакции, наиболее выраженное через 14 дней (на 40–60%), отмечается на протяжении 21 дня после И/Р (рис. 2). АХ-опосредованные эндотелий-зависимые вазодилататорные реакции преимущественно связаны с активацией eNOS и образованием NO [29]. Так, в проведенных нами ранее экспериментах было показано, что блокада NO с использованием неселективного ингибитора NO-синтаз L-NAME уменьшает число дилатаций пиальных артерий на 50–70% [30]. В основе И/Р нарушений вазодилататорной реакции на АХ может лежать снижение активности eNOS [3, 18]. В этих условиях возможна активация других регуляторных механизмов. Параллельным компенсаторным сосудорасширяющим путем может служить H₂S-опосредованная вазодилатация [20]. В эндотелии сосудистой стенки H₂S продуцируется преимущественно ферментом цистатионин γ -лиазой (CSE) [7]. АХ вызывает вазодилатацию, непосредственно воздействуя на CSE по пути АХ \rightarrow CSE \rightarrow H₂S \rightarrow калиевые каналы (K_v, K_{ATP}, BK каналы) [31]. Но возможен также путь, когда H₂S может стимулировать активность eNOS и вызывать дилатацию по пути АХ \rightarrow CSE \rightarrow H₂S \rightarrow eNOS \rightarrow NO \rightarrow растворимая гуанилатциклаза (sGC) \rightarrow циклический гуанозин монофосфат (cGMP) \rightarrow протеинкиназа G (PKG), или непосредственно воздействовать на sGMF или PKG [31]. Проведенное нами в отдельной серии экспериментов сопоставление дилататорных реакций артерий в ответ на воздействие донора экзогенного сероводорода NaHS у ЛО крыс и крыс, перенесших И/Р, показало, что H₂S-опосредованная дилатация после И/Р снижается. Но эти изменения отмечаются только в первые 14 дней после И/Р и по-разному выражены у артерий различных диаметров. Через 7 дней примерно в 2 раза уменьшается число дилатаций крупных сосудов. К 14-му дню уменьшается число дилатаций мелких и средних артерий в среднем на 25–35% (рис. 2).

И/Р повреждение во многом связано с повышением уровня цитозольного кальция [3, 4], что может изменять вклад K_{Ca} каналов в реакции сосудов [5]. В наших экспериментах орошение пиальных сосудов блокатором K_{Ca} каналов большой проводимости у ЛО крыс вызывало констрикцию 30–40% сосудов (рис. 3). И/Р изменяла констрикторную реакцию на воздействие ТЕА только на мелких и крупных сосудах. Число констрикций мелких сосудов на протяжении 21 дня после ишемии было на 30–40% больше, чем у ЛО крыс (рис. 3), что может указывать на усиление вклада BK-каналов в поддержание базального тонуса пиальных сосудов. Но в то же время число и амплитуда крупных сосудов в период с 14-го до 21-й день после И/Р уменьшились (рис. 3). Следовательно, можно утверждать, что И/Р изменения вклада BK-каналов в поддержание базального тонуса пиальных артерий зависят от диаметра сосудов.

И АХ-индуцированная вазодилатация, и дилатация в ответ на воздействие H₂S во многом обусловлена активностью BK-каналов. Известно, что АХ-индуцированная активация BK-каналов гладкомышечных клеток сосудов может осуществляться с участием NO, в основном по пути NO \rightarrow sGC \rightarrow cGMP \rightarrow PKG \rightarrow BK. Кроме того, NO может непосредственно активировать BK-каналы путем прямого фосфорилирования его α -субъединицы [14, 16, 17]. H₂S активирует BK-каналы, увеличивая кальциевый ток в каналах, а также за счет сульфгидратации транзиторных рецепторных каналов ванилоидного типа (TRPV4) [9]. В проведенных нами экспериментах блокада BK-каналов у ЛО крыс приводила к уменьшению числа и амплитуды дилатаций пиальных артерий на воздействие АХ и NaHS в среднем на 30–40% (рис. 4). Через 7 дней после И/Р отличия в изменении дилатации на фоне блокады у И/Р крыс по сравнению с ЛО были обнаружены только на крупных артериях. Число дилатаций этих сосудов в среднем в 2 раза увеличивалось (рис. 4). Ранее нами было показано [2], что И/Р приводит к развитию микроциркуляторных нарушений, способствующих развитию гипоксических процес-

сов в ткани коры головного мозга, сохраняющихся на протяжении последующих трех недель. ВК-каналы преимущественно экспрессируются в сосудистых ГМК клетках, но также описаны и в эндотелии [7]. В условиях нормоксии и после кратковременного гипоксического воздействия активность эндотелиальных ВК-каналов минимальна. Но при длительно сохраняющейся гипоксии происходит их активация [11], связанная с усилением активности TRPV4 каналов в сосудистом эндотелии и приводящая к значительному увеличению кальциевого тока [32]. Блокада ВК-каналов в данных условиях (без изменения концентрации блокатора) может лишь частично снижать кальциевый ток и восстанавливать вазореактивность до уровня, наблюдаемого у животных, которые не были подвергнуты гипоксическому воздействию [33]. Действительно, проведенное нами сравнение показало, что у крыс, перенесших И/Р, через 7 дней после воздействия число АХ- и H_2S -опосредованных дилатаций крупных пиальных артерий на фоне применения ТЕА соответствует значениям числа дилатаций без применения ВК-блокатора у ЛО животных. Обнаруженная нами постишемическая гиперактивация ВК-каналов на крупных пиальных сосудах может снижать проведение электрического сигнала в эндотелии [34] и служить причиной нарушения дилатации сосудов этой группы, а также лежать в основе снижения вклада ВК-каналов в поддержание базального тонуса.

Через 14 дней после И/Р опосредованная АХ дилататорная реакция сосудов мелких и средних диаметров на фоне ВК-блокады не отличалась от реакции у ЛО. Число и степень дилатации крупных сосудов увеличивались. Но воздействие ТЕА практически влияло на дилатацию индуцированную H_2S (рис. 4). H_2S не воздействует на субъединицы ВК-каналов напрямую. Одним из основных механизмов H_2S -опосредованной активации ВК-каналов в мозговых сосудах является усиление кальциевого тока путем активации так называемых «кальциевых искр» – высвобождения ионов кальция из саркоплазматического ретикулаума, опосредованное рианодиновыми рецепторами [35]. Длительная гипоксия может снижать H_2S -индуцированную активацию кальциевых искр и, соответственно, ингибировать активность ВК-каналов [36]. Такое ингибирование было описано при исследовании брыжеечных артерий крыс, которые в течение двух недель подвергались гипоксии [36]. Отсутствие изменения дилатации на воздействии NaHS на фоне ВК блокады через 14 дней после И/Р в нашем исследовании может быть обусловлено этими процессами.

Спустя 21 день после И/Р число дилатаций мелких и средних сосудов в ответ на воздействие АХ и NaHS при блокаде ВК-каналов уменьшалось, но в меньшей степени, чем у ЛО животных (разница составила в среднем около 40–50%). Амплитуда реакции соответствовала аналогичным показателям у животных, не подвергавшихся ишемическому воздействию. Дилататорная реакция (число и амплитуда) крупных сосудов у И/Р крыс в этот отрезок постишемического периода на фоне воздействия ТЕА достоверно не изменялась (рис. 4). Все это свидетельствует о снижении вклада ВК-каналов в дилатацию пиальных артерий. ВК-каналы сосудов состоят из порообразующих α - и вспомогательных β_{1-4} -субъединиц [6, 12]. Изменения в стехиометрии этих субъединиц могут оказывать большое влияние на функцию канала. Длительная гипоксия подавляет экспрессию β_1 -субъединиц и тем самым снижает активность каналов в гладкой мускулатуре артерий [6]. Кроме того, уменьшение вклада ВК-каналов в дилатацию может быть связано со снижением их чувствительности к ионам Ca^{2+} [6] и нарушениями в механизме NO/цГМФ-опосредованного фосфорилирования каналов [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

И/Р повреждение приводит к угнетению дилататорной реакции пиальных артериальных сосудов крыс. Изменения АХ-индуцированной вазодилатации сохраняются на протяжении 21 дня после И/Р. Нарушения H_2S -опосредованных процессов отмеча-

ются только в первые 14 дней и зависят от размера сосуда. В основе этих изменений может лежать постепенно развивающееся снижение вклада ВК-каналов в вазодилатацию, преимущественно выраженное на крупных пиальных сосудах. Снижение вклада ВК-каналов в дилатацию, максимально выраженное через 14 дней после И/Р, сохраняется на протяжении 21 дня. Коррекция этих нарушений может быть включена в разработку новых методов лечения отдаленных последствий И/Р повреждений сосудов головного мозга, основанных на использовании ВК-каналов в качестве мишени постисшемического ремоделирования сосудистой дисфункции.

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента, сбор и обработка данных, написание и редактирование статьи выполнены автором лично.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1021062411784-3-3.1.8).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 09/05 от 05.09.2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор настоящей работы заявляет, что у нее нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hong WM, Xie YW, Zhao MY, Yu TH, Wang LN, Xu WY, Gao S, Cai HB, Guo Y, Zhang F* (2023) Vasoprotective effects of hyperoside against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats: Activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ Channels. *Neural Plast* 2023: 5545205. <https://doi.org/10.1155/2023/5545205>
2. *Gorshkova OP, Shuvaeva VN* (2019) Dynamics of postischemic changes in the microcirculation in the rat cerebral cortex. *Neurosci Behav Physiol* 49(5): 569–572. <https://doi.org/10.1007/s11055-019-00771-7>
3. *Soares ROS, Losada DM, Jordani MC, Évora P, Castro-E-Silva O* (2019) Ischemia/reperfusion injury revisited: An overview of the latest pharmacological strategies. *Int J Mol Sci* 20(20): 5034. <https://doi.org/10.3390/ijms20205034>
4. *Zhang ML, Peng W, Ni JQ, Chen G* (2021) Recent advances in the protective role of hydrogen sulfide in myocardial ischemia/reperfusion injury: A narrative review. *Med Gas Res* 11(2): 83–87. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.311499>
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. *Hu XQ, Zhang L* (2012) Function and regulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov Today* 17(17-18): 974–987. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.04.002>
7. *Si R, Zhang Q, Cabrera JTO, Zheng Q, Tsuji-Hosokawa A, Watanabe M, Hosokawa S, Xiong M, Jain PP, Ashton AW, Yuan JX, Wang J, Makino A* (2020) Chronic hypoxia decreases endothelial connexin 40, attenuates endothelium-dependent hyperpolarization-mediated relaxation in small distal pulmonary arteries, and leads to pulmonary hypertension. *J Am Heart Assoc* 9(24): e018327. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.018327>

8. *Shuvaeva VN, Gorshkova OP* (2022) Contribution of IK_{Ca} channels to dilation of pial arteries in young rats after ischemia/reperfusion. *J Evol Biochem Physiol* 58(6): 1926–1936.
<https://doi.org/10.1134/S0022093022060217>
9. *Liu XY, Qian LL, Wang RX* (2022) Hydrogen sulfide-induced vasodilation: The involvement of vascular potassium channels. *Front Pharmacol* 13: 911704.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.911704>
10. *Echeverria F, Gonzalez-Sanabria N, Alvarado-Sanchez R, Fernández M, Castillo K, Latorre R* (2024) Large conductance voltage- and calcium-activated K^+ (BK) channel in health and disease. *Front Pharmacol* 15: 1373507.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1373507>
11. *Michelucci A, Sforza L, Franciolini F, Catacuzzeno L* (2023) Hypoxia, ion channels and glioblastoma malignancy. *Biomolecules* 13(12): 1742.
<https://doi.org/10.3390/biom13121742>
12. *Ochoa SV, Otero L, Aristizabal-Pachon AF, Hinojosa F, Carvacho I, Torres YP* (2021) Hypoxic regulation of the large-conductance, calcium and voltage-activated potassium channel, BK. *Front Physiol* 12: 780206.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.780206>
13. *Frankenreiter S, Bednarczyk P, Knies A, Bork NI, Straubinger J, Koprowski P, Wrzosek A, Mohr E, Logan A, Murphy MP, Gawaz M, Krieg T, Szewczyk A, Nikolaev VO, Ruth P, Lukowski R* (2017) cGMP-Elevating compounds and ischemic conditioning provide cardioprotection against ischemia and reperfusion injury via cardiomyocyte-specific BK channels. *Circulation* 136(24): 2337–2355.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028723>
14. *Sancho M, Kyle BD* (2021) The large-conductance, calcium-activated potassium channel: A big key regulator of cell physiology. *Front Physiol* 12: 750615.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.750615>
15. *Riddle MA, Walker BR* (2011) Regulation of endothelial BK channels by heme oxygenase-derived carbon monoxide and caveolin-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 303(1): C92–C101.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00356.2011>
16. *Kyle BD, Mishra RC, Braun AP* (2017) The augmentation of BK channel activity by nitric oxide signaling in rat cerebral arteries involves co-localized regulatory elements. *J Cereb Blood Flow Metab* 37(12): 3759–3773.
<https://doi.org/10.1177/0271678X17691291>
17. *Gagov H, Gribkova IV, Serebryakov VN, Schubert R* (2022) Sodium nitroprusside-induced activation of vascular smooth muscle BK channels is mediated by PKG rather than by a direct interaction with NO. *Int J Mol Sci* 23(5): 2798.
<https://doi.org/10.3390/ijms23052798>
18. *Janaszak-Jasiecka A, Siekierzycka A, Płoska A, Dobrucki IT, Kalinowski L* (2021) Endothelial dysfunction driven by hypoxia—the influence of oxygen deficiency on NO bioavailability. *Biomolecules* 11(7): 982.
<https://doi.org/10.3390/biom11070982>
19. *Zheng L, Ding J, Wang J, Zhou C, Zhang W* (2016) Effects and mechanism of action of inducible nitric oxide synthase on apoptosis in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury. *Anat Rec (Hoboken)* 299(2): 246–255.
<https://doi.org/10.1002/ar.23295>
20. *Beltowski J, Jamroz-Wisniewska A* (2014) Hydrogen sulfide and endothelium-dependent vasorelaxation. *Molecules* 19(12): 21183–21199.
<https://doi.org/10.3390/molecules191221183>
21. *Olson KR* (2021) A case for hydrogen sulfide metabolism as an oxygen sensing mechanism. *Antioxidants (Basel)* 10(11): 1650.
<https://doi.org/10.3390/antiox10111650>
22. *Islam KN, Polhemus DJ, Donnarumma E, Brewster LP, Lefer DJ* (2015) Hydrogen sulfide levels and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (NRF2) activity are attenuated in the setting of critical limb ischemia (CLI). *J Am Heart Assoc* 4: e001986.
<https://doi.org/10.1161/JAHA.115.001986>
23. *Shen Y, Shen Z, Luo S, Guo W, Zhu YZ* (2015) The cardioprotective effects of hydrogen sulfide in heart diseases: from molecular mechanisms to therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev* 2015: 925167.
<https://doi.org/10.1155/2015/925167>
24. *Kolluru GK, Shackelford RE, Shen X, Dominic P, Kevil CG* (2023) Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease. *Nat Rev Cardiol* 20(2): 109–125.
<https://doi.org/10.1038/s41569-022-00741-6>

25. *Wu D, Hu Q, Zhu D* (2018) An update on hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in the cardiovascular system. *Oxid Med Cell Longev* 2018: 4579140.
<https://doi.org/10.1155/2018/4579140>
26. *Koukalova L, Chmelova M, Amlerova Z, Vargova L* (2024) Out of the core: The impact of focal ischemia in regions beyond the penumbra. *Front Cell Neurosci* 18: 1336886.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1336886>
27. *Pluta R, Januszewski S, Czuczwar SJ* (2021) Neuroinflammation in post-ischemic neurodegeneration of the brain: friend, foe, or both? *Int J Mol Sci* 22(9): 4405.
<https://doi.org/10.3390/ijms22094405>
28. *Соколова ИБ, Горшкова ОП, Лобов ГИ* (2019) Роль индуцибельной NO-синтазы в развитии церебральной гиперемии после ишемии/реперфузии. *Рос физиол журн им ИМ Сеченова* 105(12): 1–9. [*Sokolova IB, Gorshkova OP, Lobov GI* (2019) The role of inducible NO synthase in the development of cerebral hyperemia after ischemia/reperfusion. *Russ J Physiol* 105(12): 1–9. (In Russ)].
<https://doi.org/10.1134/S0869813919120100>
29. *Nizari S, Wells JA, Carare RO, Romero IA, Hawkes CA* (2021) Loss of cholinergic innervation differentially affects eNOS-mediated blood flow, drainage of A β and cerebral amyloid angiopathy in the cortex and hippocampus of adult mice. *Acta Neuropathol Commun* 9(1): 12.
<https://doi.org/10.1186/s40478-020-01108-z>
30. *Gorshkova OP* (2021) Age-Related changes in the role of potassium channels in acetylcholine-induced dilation of pial arteries in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Evol Biochem Phys* 57(1): 55–65.
<https://doi.org/10.1134/S0022093021010051>
31. *Yuan S, Shen X, Kevil CG* (2017) Beyond a gasotransmitter: hydrogen sulfide and polysulfide in cardiovascular health and immune response. *Antioxid Redox Signal* 27(10): 634–653.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7096>
32. *Naik JS, Walker BR* (2018) Endothelial-dependent dilation following chronic hypoxia involves TRPV4-mediated activation of endothelial BK channels. *Pflugers Arch* 470(4): 633–648.
<https://doi.org/10.1007/s00424-018-2112-5>
33. *Hughes JM, Riddle MA, Paffett ML, Gonzalez Bosc LV, Walker BR* (2010) Novel role of endothelial BKCa channels in altered vasoreactivity following hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299(5): H1439–H1450.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00124.2010>
34. *Behringer EJ, Hakim MA* (2019) Functional interaction among K_{Ca} 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>
35. *Lv B, Chen S, Tang C, Jin H, Du J, Huang Y* (2020) Hydrogen sulfide and vascular regulation – an update. *J Adv Res* 27: 85–97.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.05.007>
36. *Jackson-Weaver O, Osmond JM, Naik JS, Gonzalez Bosc LV, Walker BR, Kanagy NL* (2015) Intermittent hypoxia in rats reduces activation of Ca²⁺ sparks in mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309(11): H1915–H1922.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00179.2015>
37. *Peng W, Hoidal JR, Karwande SV, Farrukh IS* (1997) Effect of chronic hypoxia on K⁺ channels: regulation in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 272(4 Pt 1): C1271–C1278.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.4.C1271>

The Contribution of BK-Channels to Ischemic-Reperfusion Changes in Cerebral Blood Flow

O. P. Gorshkova*

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

**E-mail: o_gorshkova@inbox.ru*

Ischemic/reperfusion (I/R) damage of cerebral vessels is a complex dynamic process leading to hypoxic brain damage. To improve the outcome and treatment of the effects of I/R, an understanding of the molecular mechanisms of changes occurring in the cerebral vascular bed after recovery of blood flow is required in order to identify therapeutic intracellular targets. High-conductivity calcium-dependent potassium channels (BK) involved in the vasodilator reaction of cerebral vessels and highly sensitive to changes in oxygen levels can be considered as such targets. The work investigated the change in the contribution of BK channels to the rats pial arteries dilation after I/R. Using the method of in vivo vascular imaging in I/R and sham-operated rats, the number and degree of dilatation reactions in response to acetylcholine chloride (ACh, 10^{-7} M, 8 min) and exogenous hydrogen sulfide (H_2S) donor sodium hydrosulfide (30 μ M, 2 min) were compared before and after the use of the BK channel blocker tetraethylammonium chloride (2 mM, 5 min). It was found that I/R inhibit the dilatatory reaction. Changes in ACh-induced vasodilation persist for 21 days after I/R. Changes of H_2S -mediated processes are noted only in the first 14 days and depend on the vessel size. These changes may be based on a gradually developing decrease in the contribution of BK channels to vasodilation, mainly expressed in large pial arteries. The decrease in the contribution of BK channels to dilation is most pronounced after 14 days and persists for 21 days after I/R.

Keywords: ischemic/reperfusion vascular injury, pial arteries, BK channels