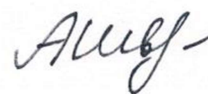


МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*



**Швецова Анастасия Алексеевна**

**КАЛИЕВЫЕ КАНАЛЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК  
АРТЕРИЙ КРЫС В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

Специальность 03.03.01 – Физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель:**

*Тарасова Ольга Сергеевна – доктор биологических наук, доцент*

**Официальные оппоненты:**

*Авдонин Павел Владимирович – доктор биологических наук, профессор, ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, заведующий лабораторией физиологии рецепторов и сигнальных систем*

*Ситдикова Гузель Фаритовна – доктор биологических наук, профессор, ФГАОУ ВО ИФМиБ Казанский федеральный университет, заведующий кафедрой физиологии человека и животных*

*Кожевникова Любовь Михайловна – доктор медицинских наук, ФГБНУ НИИ Общей патологии и патофизиологии, главный научный сотрудник лаборатории хронического воспаления и микроциркуляции*

Защита диссертации состоится «21» октября 2019 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские годы, д.1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

Email: [bellaum@mail.ru](mailto:bellaum@mail.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/232188757/>

Автореферат разослан «19» сентября 2019 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета МГУ.03.06,  
доктор биологических наук



Б.А. Умарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Нормальная работа сердечно-сосудистой системы необходима для успешной жизнедеятельности организма. В наше время заболевания сердечно-сосудистой системы являются ведущей причиной снижения качества жизни и смертности населения развитых стран мира. Следует отметить, что в последнее время заболевания системы кровообращения все чаще обнаруживаются у детей [Flynn, 2018].

В новорожденном организме работа системы кровообращения имеет ряд существенных особенностей. Сердце и сосуды в период раннего постнатального онтогенеза еще не окончательно сформированы, а интенсивно растущие органы нуждаются в обильном снабжении кислородом и питательными веществами [Stulcová, 1977; Sandow et al., 2004]. Уровень артериального давления (АД) в период раннего постнатального онтогенеза значительно ниже, чем во взрослом возрасте [Kent et al., 2007; Sofronova et al., 2016; Mochalov et al., 2018], что снижает нагрузку на еще не зрелое сердце и защищает стенки сосудов от чрезмерного растяжения. Соответственно, тонус резистивных сосудов в новорожденном организме должен быть ниже, чем в зрелом возрасте.

Существует несколько механизмов, способствующих снижению тонуса сосудов в период раннего постнатального онтогенеза. Известно, что у новорожденных крыс симпатическая иннервация сосудов практически отсутствует и заканчивает свое формирование лишь к возрасту одного месяца [Puzdrova et al., 2014; Mochalov et al., 2018]. Таким образом, сосуды крысят менее подвержены просократительным влияниям со стороны симпатической нервной системы. Кроме того, показано, что антиконстрикторная роль оксида азота, основного сосудорасширяющего фактора, секретлируемого эндотелием, значительно выше в артериях крыс в возрасте 1-2 недель по сравнению со взрослыми животными [Гайнуллина и др., 2017; Gaynullina et al., 2013, 2019; Sofronova et al., 2016]. В связи с меньшей толщиной гладкомышечной стенки сосудов и низким содержанием в ней сократительных белков [Puzdrova et al., 2014; Reho et al., 2014], способность артерий развивать сократительный ответ у новорожденных животных ниже, чем у взрослых. Однако к настоящему времени не описаны регуляторные механизмы, присущие гладкой мышце сосудов, которые могли бы ограничивать активацию сократительного аппарата клеток, т.е. обладать антиконстрикторным влиянием в период раннего постнатального онтогенеза.

Тонус сосудов во многом зависит от мембранного потенциала (МП) гладкомышечных клеток (ГМК) медиа [Nelson et al., 1990]. Действительно, смещение МП гладкой мышцы всего на несколько милливольт в сторону гиперполяризации или деполяризации приводит к увеличению и уменьшению просвета артерий, соответственно [Nelson, Quayle, 1995]. Ключевую роль в формировании уровня потенциала покоя, а также регуляции МП при действии различных вазоконстрикторов и

вазодилататоров играют калиевые каналы наружной мембраны [Jackson, 2005, 2017]. Показано, что применение блокаторов калиевых каналов приводит к деполяризации гладкой мышцы и увеличению сократительных ответов сосудистой стенки на стимулы различной природы, а активация калиевых каналов, напротив, противодействует развитию сокращения [Thorneloe, Nelson, 2005; Tykocki et al., 2017]. Таким образом, калиевые каналы гладкой мышцы артерий выполняют антиконстрикторную функцию.

Мы выдвинули гипотезу, что различия в функционировании гладкой мышцы артерий между новорожденным и взрослым организмом связаны с различиями в экспрессии и антиконстрикторном влиянии калиевых каналов. Следует отметить, что в последнее время появляется все больше данных, указывающих на связь ряда сердечно-сосудистых заболеваний с нарушением функционирования калиевых каналов не только у взрослых людей, но и у новорожденных детей [Konduri et al., 2009; Tajada et al., 2012; Ma et al., 2013; Nieves-Cintrón et al., 2018]. Это говорит об актуальности изучения функционирования калиевых каналов в сердечно-сосудистой системе в период раннего постнатального онтогенеза

**Степень разработанности темы.** В гладкой мышце артерий экспрессируются несколько типов калиевых каналов: потенциал-зависимые калиевые каналы ( $K_v$ ), кальций-активируемые калиевые каналы большой проводимости ( $BK_{Ca}$ ), калиевые каналы входящего выпрямления ( $K_{ir}$ ), аденозинтрифосфат (АТФ)-чувствительные калиевые каналы ( $K_{ATP}$ ), а также калиевые каналы, имеющие две порообразующие петли ( $K_{2P}$ ) [Gurney, Manoury, 2009; Tykocki et al., 2017]. Хотя функционирование этих каналов в артериальном русле взрослого организма изучено весьма подробно, данные литературы об их роли в регуляции сосудистого тонуса в раннем постнатальном онтогенезе крайне немногочисленны. К настоящему времени описаны возрастные изменения только двух семейств калиевых каналов –  $K_v$  и  $BK_{Ca}$ . Показано, что в артериях мозга овец функциональный вклад  $K_v$  каналов увеличивается с возрастом [Pearce, Elliott, 1994; Teng et al., 2002]. Сходным образом,  $K_v$  каналы вносят большой вклад в регуляцию тонуса легочных артерий у взрослых овец, чем у плодов на поздней стадии развития [Reeve et al., 1998; Cornfield et al., 2000; Rhodes et al., 2001]. Однако в легочном круге свиней антиконстрикторная роль  $K_v$  каналов, наоборот, снижается по мере взросления [Cogolludo et al., 2005]. Снижение роли  $K_v$  каналов показано и в аорте крысы [Gomez et al., 2000; Belevych et al., 2002].

Антиконстрикторное влияние  $BK_{Ca}$  каналов увеличивается в ходе постнатального развития в артериях мозга овец и грызунов [Gollasch et al., 1998; Teng et al., 2002], а также в аорте крысы [Gomez et al., 2000]. Однако в легочных артериях овец роль  $BK_{Ca}$  каналов выше у новорожденных животных по сравнению со взрослыми [Rhodes et al., 2001].

Результаты приведенных выше работ позволяют заключить, что вклад разных семейств калиевых каналов в регуляцию тонуса сосудов изменяется в ходе онтогенеза, но направленность этих изменений зависит от вида

животного и исследуемого сосудистого региона. К настоящему времени отсутствуют данные о возрастных изменениях роли калиевых каналов в регуляции тонуса периферических сосудов большого круга кровообращения, которые играют ключевую роль в регуляции системного АД. Не изучена связь уровня экспрессии и функционирования калиевых каналов гладкой мышцы сосудов с низким уровнем системного АД, характерным для раннего постнатального онтогенеза. В данной работе большой блок экспериментов проведен на препаратах подкожной артерии крысы, которая относится к резистивным артериям мышечного типа и густо иннервирована симпатическими нервными волокнами [Puzdrova et al., 2014]. Такие артерии играют важную роль в регуляции кровоснабжения различных органов. Это обстоятельство позволяет считать подкожную артерию крысы адекватной моделью для изучения функционирования гладкой мышцы артерий в период раннего постнатального онтогенеза. Поскольку у новорожденных крыс кожный кровоток достигает 20% сердечного выброса [Stulcová, 1977], изменения его регуляции могут отражаться на системной гемодинамике.

Наконец, не исследованы механизмы, обуславливающие возрастные изменения функционирования калиевых каналов в сосудах. Установлено, что трофические влияния симпатических нервов необходимы для созревания сократительного аппарата ГМК и дифференцировки гладкой мышцы артерий в сократительный фенотип [Kacem et al., 1995; Damon, 2005; Puzdrova et al., 2014; Reho et al., 2014; Adeoye et al., 2015]. Кроме того, с трофическим влиянием симпатических нервов может быть связано уменьшение проконстрикторной роли кальций-зависимых хлорных каналов с возрастом [Kostyunina et al., 2019]. Возможная роль симпатических нервов в регуляции функционирования калиевых каналов ГМК на разных этапах онтогенеза не изучена.

Таким образом, **целью работы** было изучить возрастные изменения антиконстрикторной роли разных семейств калиевых каналов в артериях крысы и выявить возможные регуляторные механизмы, обуславливающие такие изменения.

В работе использовали крыс в возрасте 2-3 месяцев (половозрелые животные, далее в тексте – «взрослые») и в возрасте 10-15 дней (период раннего постнатального онтогенеза). Были поставлены **задачи** сравнить в этих двух возрастных группах крыс:

- 1) эффекты блокаторов разных семейств калиевых каналов на сократительные реакции подкожной артерии;
- 2) эффекты блокады калиевых каналов на мембранный потенциал гладкой мышцы подкожной артерии;
- 3) содержание мРНК порообразующих и регуляторных субъединиц калиевых каналов в гладкой мышце подкожной артерии;
- 4) содержание белка субъединиц тех типов калиевых каналов, которые продемонстрируют наибольшие различия по влиянию на сократительные ответы в функциональных тестах;

- 5) эффекты блокады наиболее отличных по функциональной роли калиевых каналов на уровень системного артериального давления;
- 6) последней задачей работы было исследовать влияние хронической неонатальной десимпатизации на антиконстрикторное влияние и уровень экспрессии мРНК калиевых каналов в гладкой мышце подкожной артерии крысы.

**Научная новизна исследования.** Впервые изучены возрастные изменения функционирования многих семейств калиевых каналов в периферических артериях большого круга кровообращения. В результате впервые идентифицированы представители калиевых каналов, доминирующие в регуляции тонуса артерий в период раннего постнатального онтогенеза, а именно,  $K_v7$  и TASK-1 каналы. Показано, что эти каналы содержатся в большем количестве в ГМК 10-15-дневных крысят и оказывают наиболее выраженное влияние на уровень МП и сократительные ответы артерий. Впервые установлено, что TASK-1 каналы важны для формирования уровня АД в раннем постнатальном онтогенезе. Наконец, впервые проведены эксперименты по выявлению возможного механизма таких возрастных изменений. Установлено, что снижение функциональной роли  $K_{ir}$ ,  $K_v7$  и TASK-1 каналов в подкожной артерии крыс не связано с трофическим влиянием симпатических нервов.

**Теоретическая и практическая значимость.** С теоретической и фундаментальной точки зрения полученные в работе результаты о роли калиевых каналов в регуляции тонуса артерий у крыс разного возраста дополняют и развивают современные представления об особенностях функционирования сердечно-сосудистой системы в период раннего постнатального развития. Результаты работы представляются значимыми с практической точки зрения в связи с неуклонно растущей встречаемостью артериальной гипертензии в детском возрасте, патогенез которой у человека, как показано в ряде исследований, может быть связан с ослаблением антиконстрикторной роли калиевых каналов [Konduri et al., 2009; Tajada et al., 2012; Ma et al., 2013; Nieves-Cintrón et al., 2018]. Полученные в работе результаты об особенностях функционирования калиевых каналов в сосудистом русле развивающегося организма могут быть использованы при разработке новых способов коррекции сосудистых нарушений в раннем возрасте.

**Методология и методы исследования.** Для оценки вклада разных семейств калиевых каналов в регуляцию тонуса артерий крыс разного возраста проводили эксперименты по регистрации сократительных ответов изолированных сегментов подкожной артерии в изометрическом режиме (с использованием системы wire myograph). Функциональную роль различных семейств и подсемейств калиевых каналов в подкожной артерии изучали с использованием селективных блокаторов. Для исследования вклада определенных представителей калиевых каналов в поддержание МП гладкой мышцы подкожной артерии применяли микроэлектродную технику.

Содержание мРНК и белка калиевых каналов оценивали с помощью методов полимеразной цепной реакции в реальном времени и Вестерн блоттинга, соответственно. Следует отметить, что все перечисленные выше методические подходы были реализованы на артериях с удаленным эндотелием, что позволило оценить функционирование калиевых каналов преимущественно в гладкой мышце артерий.

Для оценки системного влияния калиевых каналов TASK-1 проводили регистрацию АД у наркотизированных крыс через катетер в сонной артерии и внутривенное введение блокатора.

Чтобы исследовать роль трофического влияния симпатических нервов на функциональную активность калиевых каналов в подкожной артерии крысы, использовали модель хронической неонатальной десимпатизации.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Представители большинства семейств калиевых каналов, особенно  $K_v7$  и TASK-1, демонстрируют повышенный уровень экспрессии, а также более выраженное гиперполяризующее и антиконстрикторное влияние в гладкой мышце артерий крыс в период раннего постнатального онтогенеза, чем во взрослом организме.
2. Выраженное антиконстрикторное влияние калиевых каналов, а именно TASK-1, является одним из механизмов формирования низкого уровня артериального давления в период раннего постнатального онтогенеза.
3. Снижение функциональной роли калиевых каналов в подкожной артерии крысы по мере взросления не связано с трофическим влиянием симпатических нервов.

**Степень достоверности данных.** Постановка цели и задач работы, подготовка обзора литературы и обсуждения базируются на анализе актуальной литературы по теме исследования. Представленные в работе данные получены с использованием современных и общепринятых методов исследований. Результаты воспроизводимы и статистически достоверны.

**Апробация материалов диссертации.** Основные результаты диссертации были представлены на VI Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии кровообращения (Москва, Россия, 2016), на Съездах Скандинавского Физиологического Общества (Осло, Норвегия 2016; Рейкьявик, Исландия, 2019), на XII Международном Симпозиуме по резистивным артериям (Манчестер, Великобритания, 2017), на XXIII съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Воронеж, Россия, 2017), на I Летней школе Европейского Общества Микроциркуляции и Европейской Организации Сосудистой Биологии (Дрезден, Германия, 2018), на Международной Летней школе «Функционирование клеток сосудов в норме и патологии» (Сантьяго, Чили, 2018) и на конференции «Ломоносовские чтения-2019» (Москва, Россия, 2019).

Диссертация апробирована на заседании кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 10 июня 2019 года.

**Публикации.** По теме диссертации опубликованы 4 статьи и 2 тезисов докладов на конференциях в журналах, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science и RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности физиология 03.03.01, а также 9 тезисов в сборниках докладов научных конференций.

**Личный вклад автора.** Личный вклад соискателя А.А. Швецовой является весомым на всех этапах исследования и заключается в планировании направлений исследования, изучении и анализе современной литературы по теме работы, проведении экспериментов с использованием всех описанных выше методических подходов, обобщении и обсуждении результатов, написании статей и тезисов докладов, а также в представлении полученных данных на российских и международных конференциях и школах.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 159 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения полученных данных, заключения, выводов и приложения. Список литературы включает 268 источников. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 41 рисунком.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В экспериментах использовали крыс Wistar, полученных из вивария ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии (Москва) При работе с животными соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 2010/63/EU об использовании животных для экспериментальных исследований.

**Экспериментальные группы животных.** Для изучения функционирования калиевых каналов в онтогенезе использовали крыс в возрасте 10-15 дней (период раннего постнатального онтогенеза, n=175) и 2-3 месяцев (взрослые, n=130). Трофическое влияние симпатических нервов на функциональную активность калиевых каналов изучали с использованием неонатально десимпатизированных крыс (n=15) и контрольных к ним (n=15).

Неонатальную десимпатизацию проводили с помощью введения гуанетидина сульфата (Santa Cruz Biotechnology, США). Гуанетидин растворяли в физиологическом растворе (0.9% NaCl) и вводили подкожно в области холки 6 раз в неделю в дозе 25 мг/кг со 2 по 14 дни и в дозе 50 мг/кг с 15 по 54–56 дни жизни, животным контрольной группы вводили эквивалентный объем 0.9% NaCl. Крыс брали в эксперимент через два дня после последней инъекции гуанетидина (в возрасте 56-58 дней). Полноту десимпатизации оценивали по морфологии сплетения адренергических нервных волокон в стенке артерий после инкубации с глиоксиловой кислотой [Axelsson et al. 1972, Bjorklund et al. 1972]. Визуализацию проводили с использованием микроскопа Axiovert 200 с системой светофильтров S25 (возбуждение – 380-440 нм, эмиссия – 440-480 нм) и цифровой камеры



AxioCam HiRes (разрешение 1300×1030 пикселей, 8 бит/пиксель) (Zeiss, Германия) при увеличении 20.

**Регистрация сократительных ответов изолированных артерий.** Взрослых животных декапитировали гильотиной, а молодых – ножницами. Объектом исследования служила подкожная артерия (*a. saphena*, веточка бедренной артерии, приносящая кровь к стопе). Внутренний диаметр подкожной артерии крыс в возрасте 2-3 месяцев составляет  $648 \pm 84$  мкм ( $n=104$ ), в 10-15 дней –  $263 \pm 23$  мкм ( $n=130$ ) ( $p < 0.05$ , среднее  $\pm$  стандартное отклонение). Сократительные ответы артерий регистрировали в изометрическом режиме с использованием систем wire myograph (модели 410A, 420A и 620M, DMT, Дания). Из артерии вырезали несколько сегментов длиной 2 мм и закрепляли их на головках миографа. Во всех экспериментах проводили механическое удаление эндотелия с помощью крысиного уса. Раствор в миографе имел следующий состав: NaCl 120 мМ, NaHCO<sub>3</sub> 26 мМ, KCl 4.5 мМ, CaCl<sub>2</sub> 1.6 мМ, MgSO<sub>4</sub> 1 мМ, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 мМ, D-Глюкоза 5.5 мМ, ЭДТА 0.025 мМ, HEPES 5 мМ;  $t=37^\circ\text{C}$ . Для поддержания pH на уровне 7.4 и снабжения ткани артерий кислородом раствор непрерывно аэрировали карбогеном (O<sub>2</sub> – 95%, CO<sub>2</sub> – 5%). В начале эксперимента определяли растяжение препарата, оптимальное для проявления его сократительной активности [Mulvany, Halpern, 1977]. Затем проводили активацию препаратов норадреналином (10 мкМ) и агонистом  $\alpha_1$ -адренорецепторов метоксамином (MX, 10 мкМ), а также проверку полноты удаления эндотелия по отсутствию расслабления на ацетилхолин (10 мкМ) на фоне предсокращения препарата MX (1 мкМ).

Протокол эксперимента включал две кумулятивные зависимости «концентрация-эффект» на MX (0.01 - 100 мкМ) или агонист рецепторов тромбоксана A<sub>2</sub> U46619 (0.1 нМ - 1 мкМ). Пример такого эксперимента приведен далее на рисунке 2. За 20 мин до второй зависимости «концентрация-эффект» к одному из препаратов добавляли блокатор калиевых каналов («опытный» препарат), а ко второму – эквивалентный объем растворителя (контрольный препарат). В первой зависимости «концентрация-эффект» исследуемые препараты обладали сходной реактивностью на агонист, что позволяло в дальнейшем оценивать эффекты блокаторов путем сравнения вторых зависимостей «концентрация-эффект».

При обработке результатов вычисляли значения силы сокращения при действии каждой концентрации агониста и выражали их в процентах от максимального значения силы сокращения в первой зависимости «концентрация-эффект». На графиках представлены вторые зависимости «концентрация-эффект» для опытных и контрольных препаратов в каждой экспериментальной группе.

**Эксперименты по измерению мембранного потенциала (МП) гладкой мышцы артерий.** МП ГМК измеряли с помощью стандартной микроэлектродной техники одновременно с регистрацией сократительных ответов артерий в изометрическом режиме. Препарат помещали в

одноканальный миограф (модель 301, DMT, Дания) и проводили удаление эндотелия. Начальный этап эксперимента включал подбор оптимального растяжения препарата, его активацию, проверку полноты удаления эндотелия и проведение одной зависимости «концентрация-эффект» для МХ (0.01 - 100 мкМ). Регистрацию МП начинали через 10-15 мин после отмывки препарата от МХ. Во время измерений через камеру миографа создавали постоянный проток раствора (2 мл/мин) с помощью перистальтического насоса (Julabo, Seelbach, Германия).

Микроэлектроды с сопротивлением 25-70 МОм изготавливали из алюмосиликатного стекла и заполняли насыщенным раствором КСl. Для оценки сопротивления электрода через него на протяжении всего эксперимента подавали подпороговые импульсы напряжения (амплитуда 0.02 В, длительность 0.025 сек, частота 1 Гц). Дополнительно сопротивление электрода оценивали с использованием акустической системы (Audis-01D/16, pri electronic, Германия). В работе использовали усилитель Intra 767 (World Precision Instruments, США). Положение микроэлектрода относительно артерии изменяли с помощью макровинта, а при введении в клетку – с помощью пьезомикроманипулятора (модель РМ10, Marzhauser Wetzlar, Германия).

Запись МП считали успешной, если наблюдали (1) резкое изменение показаний усилителя при входе электрода в клетку; (2) стабильный уровень МП в течение хотя бы 1 мин (для артерий взрослых крыс) или 30 с (для артерий крысят); (3) возвращение значения потенциала после выхода электрода из клетки к уровню до измерения; (4) одинаковое значение сопротивления электрода перед входом и после выхода из клетки;

При расчете МП из значения, соответствующего положению кончика микроэлектрода внутри клетки, вычитали значение, зарегистрированное после его выхода из клетки.

**Определение содержания мРНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.** Анализ содержания РНК проводили в образцах артерий с удаленным эндотелием. Для механического удаления эндотелия сегменты артерий длиной около 8 мм помещали в устройство, аналогичное системе wire myograph. Один образец ткани содержал 2 сегмента одной артерии взрослой крысы или 4 сегмента, выделенные из обеих конечностей двух крыс в возрасте 10-15 дней. Образцы помещали в раствор RNA-later и хранили при -20°C до проведения анализа. Выделение РНК проводили с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen) или ExtractRNA (Евроген), после чего пробы обрабатывали ДНКазой I (Fermentas). Затем измеряли концентрацию РНК с помощью прибора NanoDrop1000 (Thermo Scientific, США), разводили образцы до одинаковой концентрации и проводили синтез кДНК с помощью набора MMLV RV kit (Евроген). Синтезированную кДНК хранили при -20°C. Количественную ПЦР проводили в приборе RotorGene6000 с помощью набора реагентов qPCRmix-NS SYBR (Евроген). Используемые в работе праймеры были синтезированы

в фирме Евроген, их последовательности представлены в опубликованных статьях [Lloyd et al. 2009; Shvetsova et al., 2019]. Эффективность праймеров определяли с использованием программы LinRegPCR [Ruijter et al, 2009], для всех исследованных генов значения эффективности находились в диапазоне 1.8-2.0.

Для обработки результатов использовали программное обеспечение RotorGene6000. Содержание мРНК в образцах рассчитывали как  $E^{-Ct}$ , где  $E$  – эффективность праймеров, а  $Ct$  – номер цикла, на котором кривая накопления продукта пересекает пороговый уровень флуоресценции. Полученные значения нормировали на среднее геометрическое значений для двух референсных генов в том же образце. При сравнении содержания мРНК в артериях крыс разного возраста в качестве референсных использовали гены *Gapdh* и *Rn18s*, а в артериях десимпатизированных и контрольных крыс – *Rn18s* и *Rplp0*. Затем данные выражали в процентах от среднего значения в группе взрослых крыс или крыс, контрольных к десимпатизированным.

**Определение содержания белков в ткани артерий методом Western Blotting.** Анализ содержания белков также проводили в образцах артерий с удаленным эндотелием, которые готовили аналогично образцам для ПЦР-исследований, но затем замораживали в жидком азоте и хранили до анализа при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Образцы гомогенизировали на льду в SDS-буфере (0.0625 М Tris–HCl (pH 6.8), 2.5% SDS, 10% глицерин, 2.47% дитиотреитол, 0.002% бромфеноловый синий) с добавлением ингибиторов протеаз (50 мг/мл аprotинина, 100 мг/мл лейпептина, 30 мг/мл пепстатина). Гомогенаты центрифугировали при 16900 g в течение 5 мин, отбирали супернатант и хранили его при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для разделения белков использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле (5% концентрирующий и 10% разделяющий гели) в присутствии SDS. Электрофорез проводили в приборе Bio-Rad (США) при 20 мА в течение 1 ч, после чего проводили процедуру полусухого электропереноса белков на нитроцеллюлозную мембрану в приборе фирмы Bio-Rad (США) при 2.5 А в течение 30 мин. Буфер для электропереноса имел следующий состав: 0.025 М трис–HCl, 0.192 М глицин, 9.6 % этанол. Для оценки качества электропереноса мембраны окрашивали Ponceau S (0.1 % раствор в 0.1 % уксусной кислоте). Затем в течение часа мембраны инкубировали в 5% обезжиренном молоке (OM) в TBSt (20 М Tris–HCl, pH 7.6; 150 mM NaCl с добавлением 0.1% Tween 20). Далее в течение ночи мембраны инкубировали в растворе антител к  $K_v7.4$  (Santa Cruz, 1:100, 5% OM), Kcne4 (Sigma, 1:2000, 5% OM), TASK-1 (Abcam, 1:800, 5% бычий сывороточный альбумин) или GAPDH (Abcam, 1:2000, 5% OM). На следующий день мембраны отмывали буфером TBSt и в течение часа инкубировали со вторичными антителами (в 5% OM), которые выбирали в зависимости от видовой принадлежности первичных антител: anti-mouse (1:5000) для GAPDH и  $K_v7.4$ , anti-rabbit (1:10000) для Kcne4 и TASK-1. Мембраны снова отмывали в TBSt. Для получения хемилюминесцентного

сигнала использовали раствор Femto ECL (Thermo Scientific), разведенный в 10 раз TBSt. Сигнал регистрировали в приборе ChemiDoc (Bio-Rad, США).

Обработку результатов проводили в программе ImageLab Software (Bio-Rad, США). Уровни флуоресценции при окрашивании  $K_v7.4$  и  $K_{cne4}$  нормировали на соответствующие значения для GAPDH, полученные для каждого образца на той же мембране, а при окрашивании TASK-1 – на общее количество белка, которое оценивали по интенсивности окрашивания соответствующей дорожки мембраны Ponceau S [Romero-Calvo et al., 2010]. Полученные значения выражали в процентах от среднего для группы взрослых крыс.

**Эксперименты по регистрации АД и частоты сердечных сокращений (ЧСС) у наркотизированных крыс.** Для регистрации АД наркотизированной уретаном (1.2 г/кг внутривенно) крысе имплантировали катетер (PE5-PE50) в левую сонную артерию. Вещества вводили через два катетера в левую яремную вену. Механические колебания давления преобразовывались в электрический сигнал с помощью тензотриггерного датчика (BLPR2, World Precision Instruments, США). Усиленный сигнал от датчика через аналого-цифровой преобразователь (USB-6211, National Instruments, США) поступал на компьютер с программным обеспечением. Частота оцифровки сигнала составляла 1кГц. Запись и обработка данных выполнялись с использованием специального программного обеспечения, написанного в LabView 2011 (National Instruments) д.б.н. Е.В. Лукошковой (ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии МЗ РФ). В течение всего эксперимента артериальный катетер промывали гепаринизированным физиологическим раствором (50 Ед/мл) с помощью инфузора (Syringe pump model 341, SAGE Instruments, США). Скорость промывки составляла 0.2 мл/ч для взрослых крыс и 0.08 мл/ч для 10-15-дневных крыс.

После подключения животного к установке ждали 10-15 мин до стабилизации АД и ЧСС. Затем через один из венозных катетеров вводили ганглиоблокатор хлоризондамин (2.5 мг/кг, растворен в 0.9% NaCl). Спустя 10-15 мин одной группе крыс через второй венозный катетер вводили блокатор TASK-1 каналов (AVE1231, 4 мг/кг), а другой (контрольной) группе – эквивалентный объем растворителя (ДМСО) и проводили регистрацию еще 15 мин. Значения среднего АД и ЧСС вычисляли на трех этапах эксперимента: в конце стабилизации (перед введением хлоризондамина), перед введением блокатора или растворителя и через 1-2 мин после введения блокатора или растворителя (на пике реакции). Длительность обрабатываемых участков записи составляла 1-2 мин.

**Статистическая обработка результатов.** Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc.). Характер распределения данных проверяли с использованием теста Д'Агостино-Пирсона. Сравнение зависимостей «концентрация-эффект» проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа для

повторных измерений. Сравнение уровня базального тонуса, МП, содержания мРНК и белков, САД и ЧСС проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при уровне  $p < 0.05$ . Данные представлены в виде среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего, n – количество животных или образцов ткани в группе.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**$K_{ATP}$  каналы не оказывают антиконстрикторного влияния в подкожной артерии крыс обеих возрастных групп.** Блокада  $K_{ATP}$  каналов с помощью глибенкламида (3 мкМ) не приводила к изменению базального тонуса и сократительных ответов артерий на МХ ни у взрослых, ни у 10-15-дневных крыс. Это говорит о том, что условиях эксперимента, приближенных к нормальным (достаточное снабжение ткани артерий кислородом и глюкозой),  $K_{ATP}$  каналы не играют антиконстрикторной роли в подкожной артерии крысы.

**Антиконстрикторное влияние  $ВК_{Ca}$  каналов в подкожной артерии крысы менее выражено в период раннего постнатального онтогенеза, чем во взрослом возрасте.** Блокада  $ВК_{Ca}$  каналов с помощью ибериотоксина (0.1 мкМ) приводила к усилению сократительных ответов артерий крыс в возрасте как 2-3 месяцев, так и 10-15 дней, о чем свидетельствует сдвиг зависимости «концентрация-эффект» влево относительно контрольной кривой (Рисунок 1А, Б). Однако величина данного сдвига в группе 10-15-дневных крысят была меньше, чем в группе взрослых крыс. Содержание мРНК порообразующей  $\alpha_1$ - и регуляторной  $\beta_1$ -субъединиц  $ВК_{Ca}$  канала было также ниже в гладкой мышце артерий крысят (Рисунок 1В, Г). Известно, что  $\beta_1$ -субъединица способствует увеличению чувствительности  $ВК_{Ca}$  канала к кальцию и снижает порог его активации [Patterson et al., 2002]. Исходя из этого, мы предполагаем, что менее выраженная антиконстрикторная роль  $ВК_{Ca}$  каналов в подкожной артерии крысы в период раннего постнатального онтогенеза может быть связана с их меньшим количеством и активностью в наружной мембране ГМК.

**Антиконстрикторная роль  $K_{ir}$  каналов в подкожной артерии крысы, напротив, более выражена в период раннего постнатального онтогенеза, чем во взрослом возрасте.** Инкубация артерий с блокатором  $K_{ir}$  каналов  $BaCl_2$  (30 мкМ) [Schubert et al., 2004] вызывала увеличение сократительных реакций артерий на МХ как в группе взрослых крыс, так и в группе 10-15-дневных крысят, однако данный эффект был более выражен в артериях крысят (Рисунок 1Д, Е). В соответствии с этим содержание мРНК порообразующих субъединиц  $K_{ir2.1}$  и  $K_{ir2.4}$  было выше в ГМК подкожной артерии крысят (Рисунок 1Ж, З). Содержание субъединицы  $K_{ir2.2}$ , напротив,

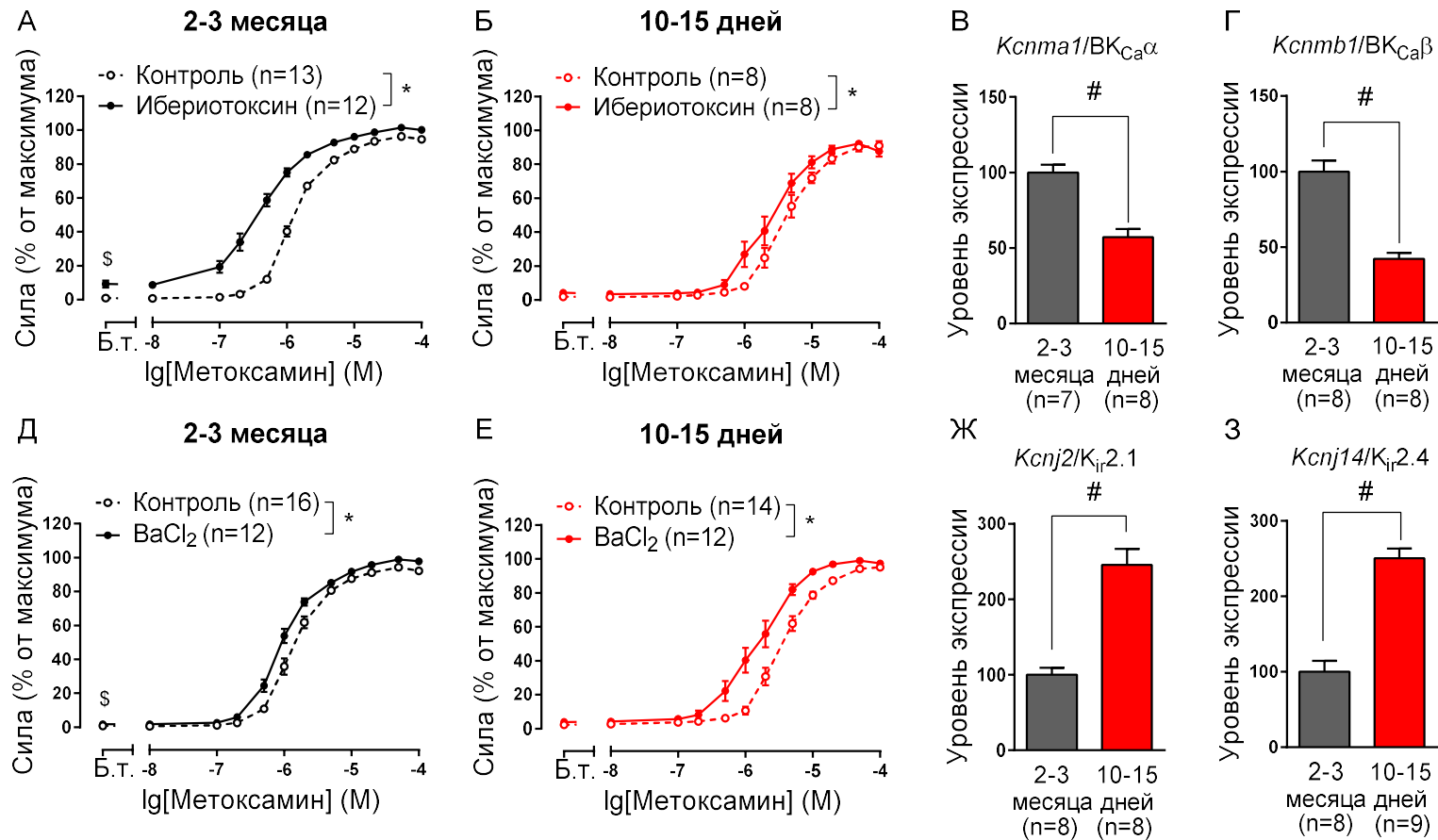


Рисунок 1. Анализ антиконстрикторной роли  $VK_{Ca}$  и  $K_{ir}$  каналов в артериях крыс разного возраста. А, Б: Эффекты блокады  $VK_{Ca}$  каналов ибериотоксином (0.1 мкМ) на сократительные реакции артерий. В, Г: Относительное содержание мРНК порообразующей  $\alpha_1$ - и регуляторной  $\beta_1$ -субъединиц  $VK_{Ca}$  канала в артериях. Д, Е: Эффекты блокады  $K_{ir}$  каналов  $BaCl_2$  (30 мкМ) на сократительные реакции артерий. Ж, З: Относительное содержание мРНК порообразующих субъединиц  $K_{ir}2.1$  и  $K_{ir}2.4$  в артериях. Б. т. – базальный тонус. \*  $p < 0.05$  – дисперсионный анализ для повторных измерений,  $^s p < 0.05$  и  $^# p < 0.05$  – критерий Стьюдента.

было выше в артериях взрослых крыс, а экспрессии  $K_{ir}2.3$  в подкожной артерии обнаружено не было. Важно отметить, что именно  $K_{ir}2.1$  и  $K_{ir}2.4$  считаются наиболее важными с функциональной точки зрения изоформами  $K_{ir}$  канала в ГМК артерий [Zaritsky et al., 2000; Tennant et al., 2006]. Таким образом, более выраженная антиконстрикторная роль  $K_{ir}$  каналов в подкожной артерии крысят может быть связана с высокой экспрессией изоформ  $K_{ir}2.1$  и  $K_{ir}2.4$ .

**Из всех подсемейств  $K_v$ ,  $K_v7$  каналы обладают наиболее выраженным антиконстрикторным влиянием в артериях крыс в период раннего постнатального онтогенеза.** С использованием селективных блокаторов мы оценили вклад трех подсемейств  $K_v$  каналов ( $K_v1$ ,  $K_v2$  и  $K_v7$ ), которые характерны для ГМК артерий [Yeung et al., 2007; Cox, Fromme, 2016] в регуляцию сократительных ответов подкожной артерии крыс разного возраста. Блокада  $K_v1$  каналов с помощью DPO-1 (1 мкМ) [Lagrutta et al., 2006] не изменяла сократительные ответы артерий взрослых крыс, но несколько усиливала их в группе 10-15-дневных крысят. Блокатор  $K_v2$  каналов строматоксин (0.1 мкМ) [Escoubas et al., 2002] не оказал влияния на МХ-вызванное сокращение артерий ни в одной исследуемой группе животных. Таким образом,  $K_v1$  и  $K_v2$  каналы не оказывают выраженного антиконстрикторного влияния в подкожной артерии крысы, что может быть связано со сравнительно высоким порогом их активации [Mackie et al., 2008].

Вместе с тем при блокаде  $K_v7$  каналов, порог активации которых близок к потенциалу покоя ГМК артерий [Mackie et al., 2008], с помощью ХЕ991 (3 мкМ) [Yeung, Greenwood, 2005] в артериях крысят наблюдалось развитие мощного базального тонуса и выраженное усиление сократительных ответов на МХ (Рисунок 2, 3Б). В артериях взрослых крыс эффекты блокады  $K_v7$  каналов были намного слабее (Рисунок 3А). При действии агониста рецепторов тромбоспандина  $A_2$  U46619, который активирует в ГМК артерий иные сигнальные пути, чем МХ [Gohla, Offermanns, 2000], ХЕ991 также усиливал сократительные ответы подкожной артерии крысят и при этом не оказывал влияния в артериях взрослых крыс. Другой блокатор  $K_v7$  каналов – линопирдин [Joshi et al., 2006] обладал схожим влиянием на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста. Результаты проведенных экспериментов позволяют заключить, что из всех подсемейств  $K_v$ ,  $K_v7$  каналы обладают наиболее выраженным антиконстрикторным влиянием в артериях крыс в период раннего постнатального онтогенеза, что проявляется в значительном увеличении базального тонуса, а также сократительных ответов на агонисты различной природы.

В соответствии с результатами функциональных тестов, содержание мРНК порообразующих субъединиц  $K_v7.1$ ,  $K_v7.2$  и  $K_v7.5$  (Рисунок 3В), а также всех регуляторных субъединиц  $K_v7$  каналов, в том числе  $K_{sne4}$  (Рисунок 3Г), в гладкой мышце подкожной артерии 10-15-дневных крысят было увеличенным по сравнению со взрослыми крысами.

Поскольку с функциональной точки зрения в резистивных артериях наиболее значим комплекс  $K_v7.4/K_{\text{cne4}}$  [Jepps et al., 2015; Abbott, Jepps, 2016], мы сочли необходимым исследовать экспрессию компонентов этого комплекса в ГМК подкожной артерии крыс разного возраста и на белковом уровне. Хотя на уровне мРНК содержание  $K_v7.4$  было несколько выше в ГМК артерий взрослых крыс (рисунок 3В), на уровне белка его количество было значительно больше в артериях крысят (Рисунок 3Д). Содержание белка  $K_{\text{cne4}}$  также было выше в артериях крысят (Рисунок 3Д). Показано, что  $K_{\text{cne4}}$  субъединица оказывает положительное влияние на экспрессию и активность канала, образованного  $K_v7.4$  субъединицами [Jepps et al., 2015; Abbott, Jepps, 2016]. В связи с этим мы предполагаем, что крайне выраженная антиконстрикторная роль  $K_v7$  каналов в подкожной артерии крысят связана с высоким содержанием регуляторной субъединицы  $K_{\text{cne4}}$ , что, в свою очередь, ведет к увеличению плотности и активности  $K_v7.4$  каналов в наружной мембране клетки.

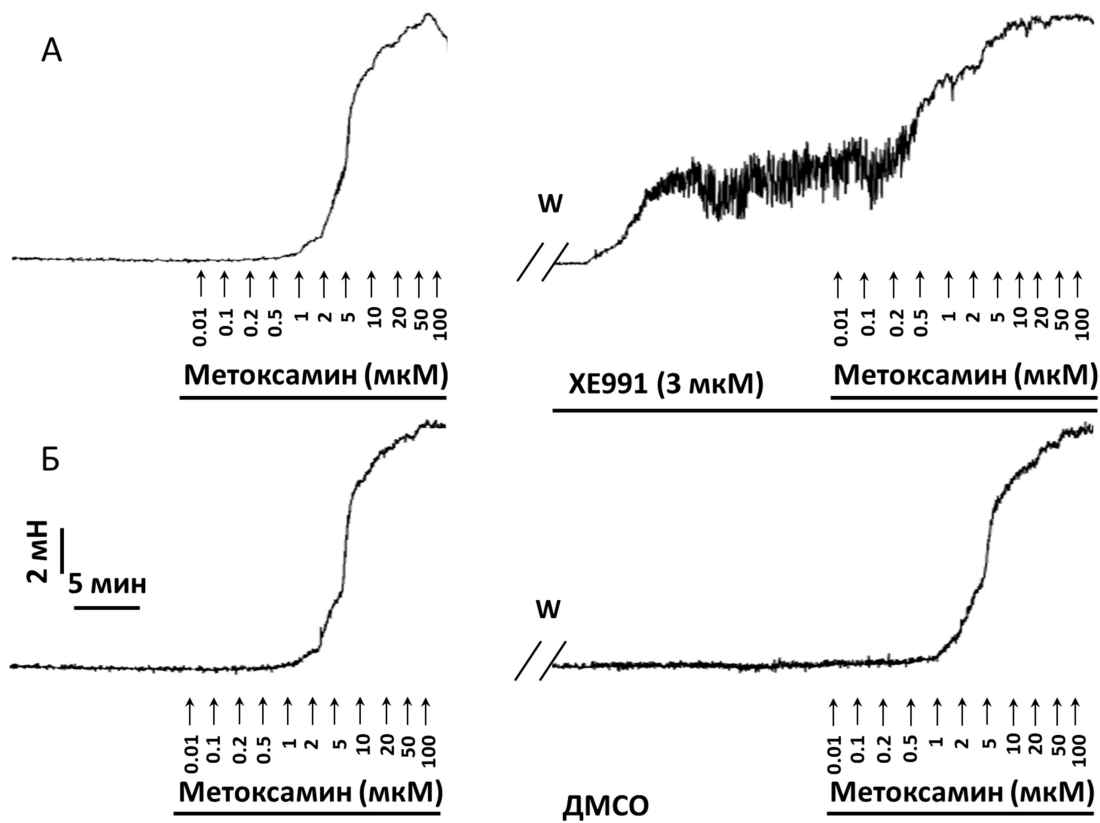


Рисунок 2. Блокада  $K_v7$  каналов с помощью XE991 (3 мкМ) вызывает развитие базального тонуса и усиление сократительных ответов подкожной артерии 12-дневного крысенка на МХ (А), тогда как инкубация с эквивалентным объемом растворителя (ДМСО, 0.03%) не оказывает влияния на тонус и сократительные ответы (Б). W – отмывка.



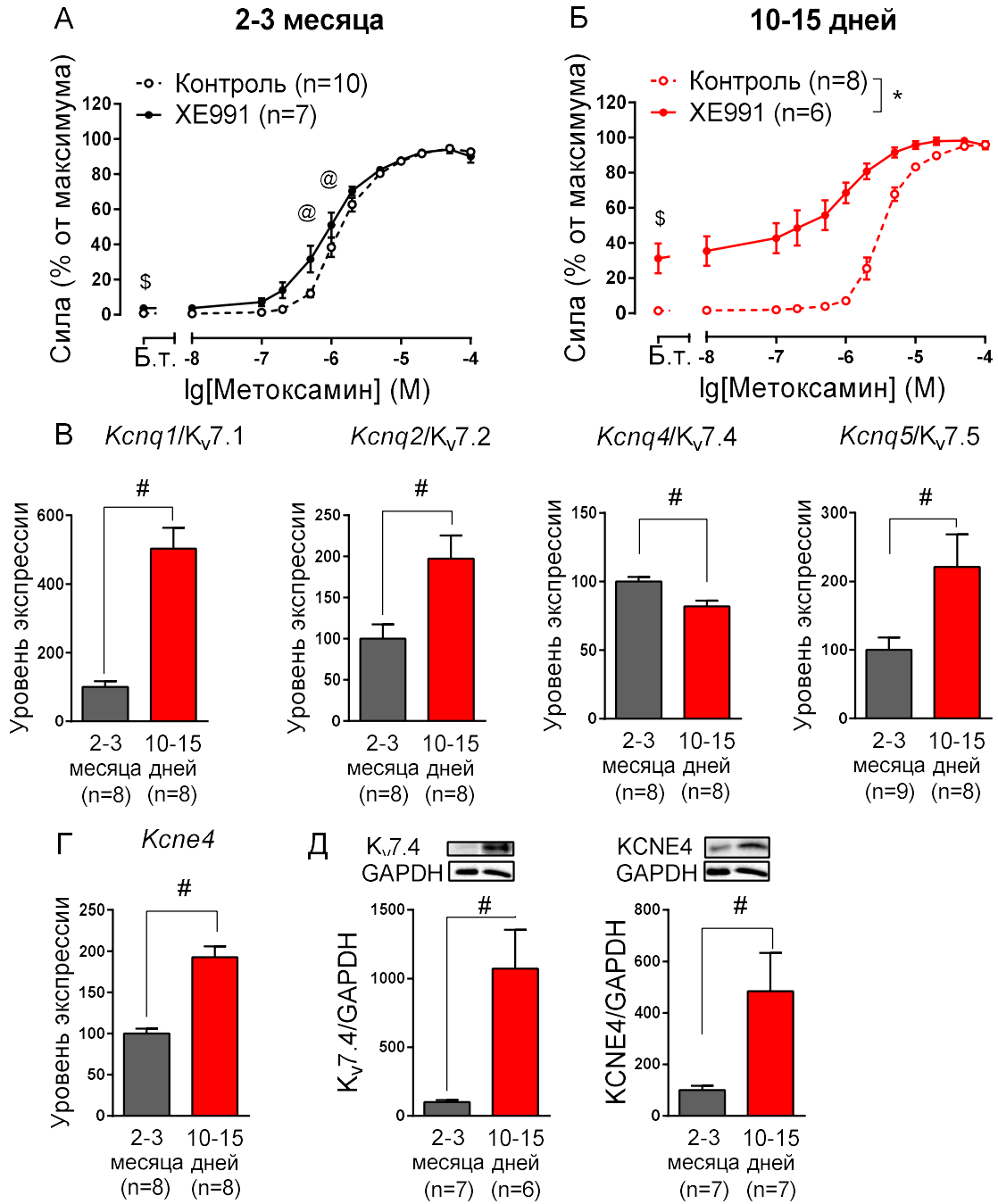


Рисунок 3. Анतिकонстрикторная роль  $K_v7$  каналов в период раннего постнатального онтогенеза выше, чем во взрослом возрасте. А, Б: Влияние блокады  $K_v7$  каналов ХЕ991 (3 мкМ) на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста. В, Г: Относительное содержание мРНК порообразующих субъединиц  $K_v7.1$ ,  $K_v7.2$ ,  $K_v7.4$ ,  $K_v7.5$  (В) и регуляторной *Kcne4* субъединицы  $K_v7$  канала (Г) в артериях крыс разного возраста. Д: Содержание белков  $K_v7.4$  и *Kcne4* в артериях крыс разного возраста. Б. т. – базальный тонус. \*  $p < 0.05$  – дисперсионный анализ для повторных измерений (@ – с использованием поправки Сидака для анализа эффектов ХЕ991 при различных концентрациях МХ); \$  $p < 0.05$  и #  $p < 0.05$  – критерий Стьюдента.

**Влияние TASK-1 каналов уменьшает сократительные ответы подкожной артерии 10-15 дневных крысят, но не взрослых крыс.** Блокада TASK-1 каналов с помощью AVE1231 (1 мкМ) не оказывала эффекта на базальный тонус и сократительные ответы артерий крыс в возрасте 2-3 месяцев (Рисунок 4А). Однако в артериях 10-15-дневных крыс AVE1231 вызывал развитие выраженного базального тонуса и значительно увеличивал сократительные ответы на МХ (Рисунок 4Б). Содержание мРНК и белка порообразующей субъединицы TASK-1 было выше в гладкой мышце подкожной артерии крысят (Рисунок 4Г, Д), что согласуется с результатами функциональных экспериментов. Полученные данные говорят о важной роли TASK-1 каналов в артериях крысят, но не взрослых крыс.

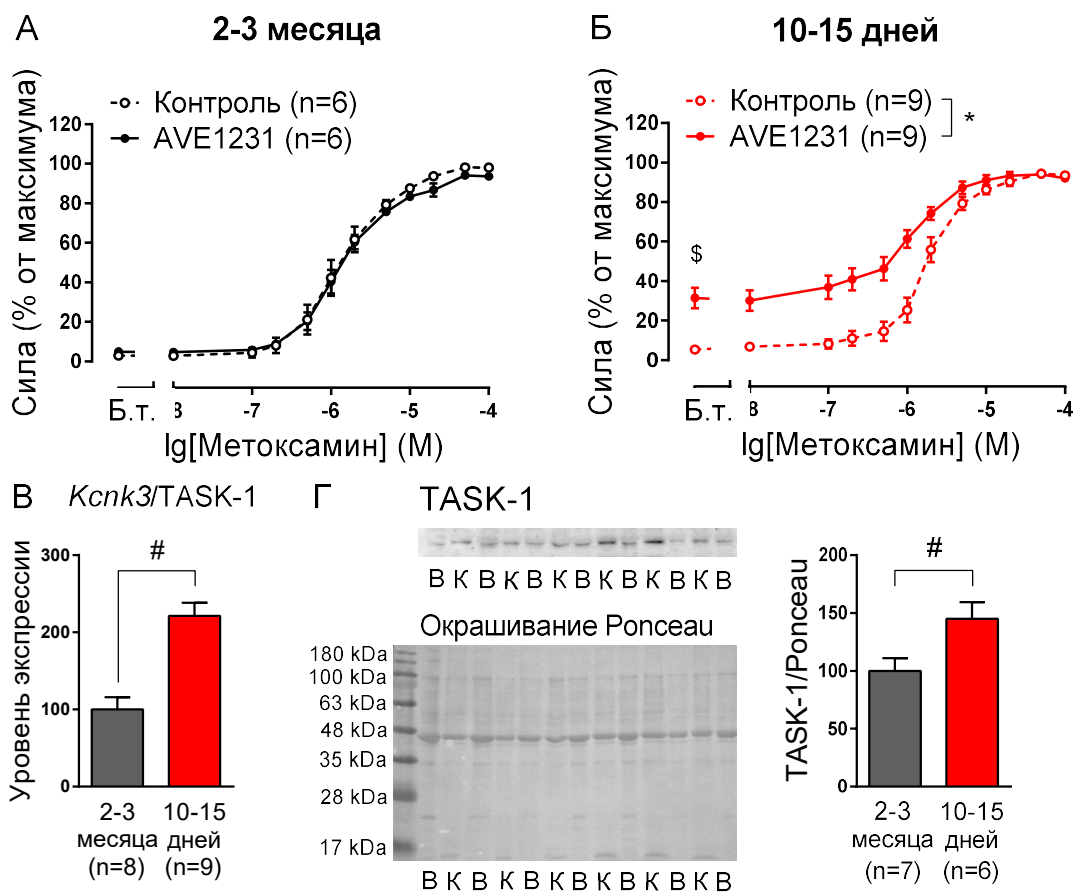


Рисунок 4. Анतिकонстрикторная роль TASK-1 каналов в период раннего постнатального онтогенеза выше, чем во взрослом возрасте. А, Б: Влияние блокады TASK-1 каналов AVE1231 (1 мкМ) на сократительные ответы подкожной артерии крыс разного возраста. В, Г: Относительное содержание мРНК (В) и белка (Г) порообразующей субъединицы TASK-1 в артериях крыс разного возраста («В» – взрослые (2-3 месяца), «К» – крысят (10-15 дней)). Б. т. – базальный тонус. \*  $p < 0.05$  – дисперсионный анализ для повторных измерений; \$  $p < 0.05$  и #  $p < 0.05$  – критерий Стьюдента.

Следует отметить, что исходно AVE1231 использовали в качестве блокатора  $K_v1.5$  каналов [Ehrlich et al., 2008], но затем выяснилось, что  $IC_{50}$

AVE1231 для TASK-1 более чем в 40 раз ниже, чем для  $K_v1.5$  [Kiper et al., 2015]. С целью доказать, что выраженные эффекты AVE1231 в артериях крысят связаны с блокированием именно TASK-1, а не  $K_v1.5$  каналов, была проведена серия экспериментов по исследованию эффектов AVE1231 (1 мкМ) на фоне блокады  $K_v1$  каналов DPO-1 (1 мкМ). Было показано, что в условиях блокады  $K_v1$  каналов AVE1231 также значительно усиливал сократительные ответы артерий крысят, то есть ключевой мишенью влияния AVE1231 в подкожной артерии крысы являются TASK-1 каналы.

Итак, результаты миографической части исследования демонстрируют, что большинство типов калиевых каналов ( $K_{ir}$ , и, особенно,  $K_v7$  и TASK-1) играют более значимую роль в регуляции тонуса артерий в период раннего постнатального онтогенеза. Следующей задачей работы было доказать, что более выраженное влияние этих каналов на сократительные ответы артерий крысят связано с их влиянием на МП ГМК.

**$K_{ir}$ ,  $K_v7$  и TASK-1 каналы оказывают более выраженное влияние на МП гладкой мышцы подкожной артерии 10-15-дневных крыс, чем взрослых.** Уровень потенциала покоя ГМК подкожной артерии не отличался между 10-15-дневными крысятами и взрослыми крысами ( $-65.3 \pm 5.4$  мВ и  $-64.8 \pm 6.8$  мВ, соответственно (среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего,  $p > 0.05$ , критерий Стьюдента)).

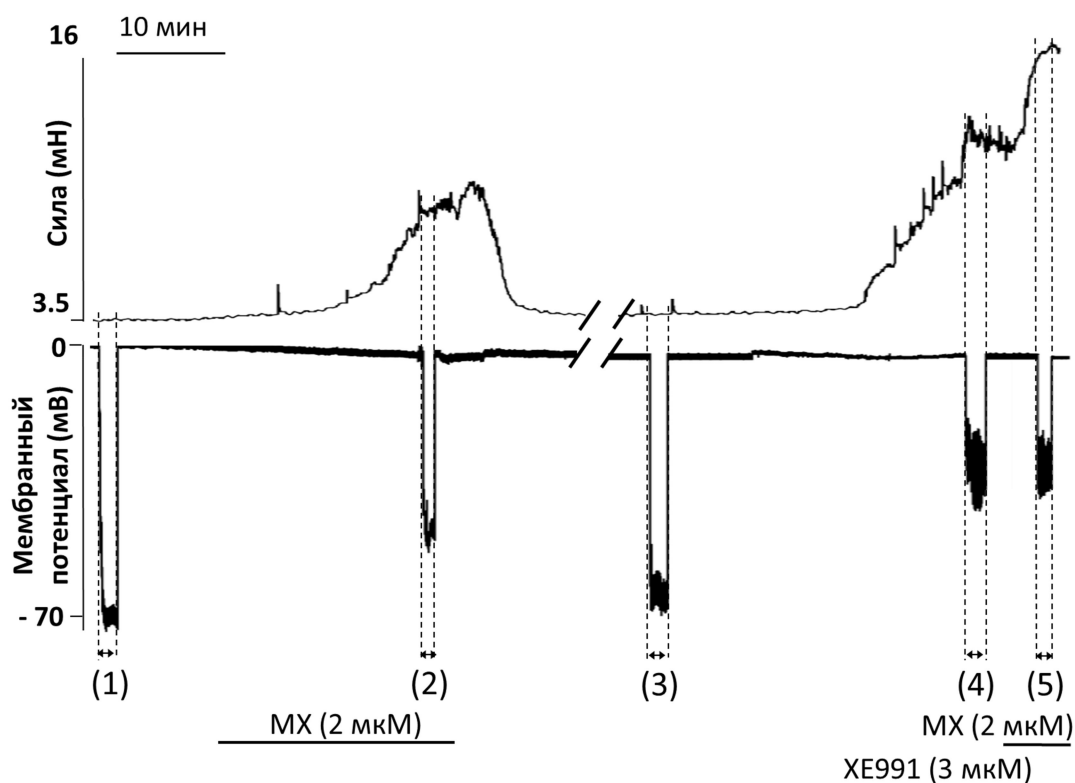


Рисунок 5. Оригинальная запись эксперимента с одновременной регистрацией силы и МП гладкой мышцы подкожной артерии крысенка в возрасте 13 дней. Сила и МП были зарегистрированы на пяти этапах эксперимента: (1) в отсутствие блокаторов и агонистов; (2) на фоне MX (30% от максимального сокращения); (3) после отмывки от MX; (4) на фоне блокатора  $K_v7$  каналов XE991; (5) при совместном действии MX и XE991.

Как видно на рисунке 5, блокатор  $K_v7$  каналов XE991 вызывал развитие мощного базального тонуса и выраженной деполяризации ГМК артерий крысят. Эффект XE991 на МП в артериях крысят был намного больше, чем в артериях взрослых крыс:  $24.6 \pm 3.3$  мВ ( $n=10$ ) и  $7.1 \pm 2.0$  мВ ( $n=8$ ), соответственно (среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего,  $p < 0.05$  по критерию Стьюдента). Схожие результаты были получены в экспериментах с блокатором TASK-1: инкубация с AVE1231 сопровождалась более выраженной деполяризацией ГМК в артериях крысят ( $20.6 \pm 1.7$  мВ,  $n=10$ ) по сравнению со взрослыми крысами ( $10.2 \pm 1.9$  мВ,  $n=7$ ,  $p < 0.05$ ). Блокада  $K_{ir}$  каналов  $BaCl_2$  вызывала развитие небольшой деполяризации гладкой мышцы (около 7 мВ) в артериях взрослых крыс, чего не наблюдали в группе 10-15-дневных животных.

Далее мы сравнили влияние  $K_{ir}$ ,  $K_v7$  и TASK-1 каналов на сокращение и деполяризацию гладкой мышцы в ответ на МХ между двумя группами крыс. Для этого мы вычисляли разность изменений силы и МП при действии МХ на фоне блокатора (этап 5, Рисунок 5) и при одиночном действии МХ (этап 2, Рисунок 5). Как видно на рисунке 6, более выраженное усиление МХ-индуцированных сократительных ответов артерий крысят под действием блокаторов всех трех типов калиевых каналов было связано с более выраженной деполяризацией ГМК артерий в этой возрастной группе.

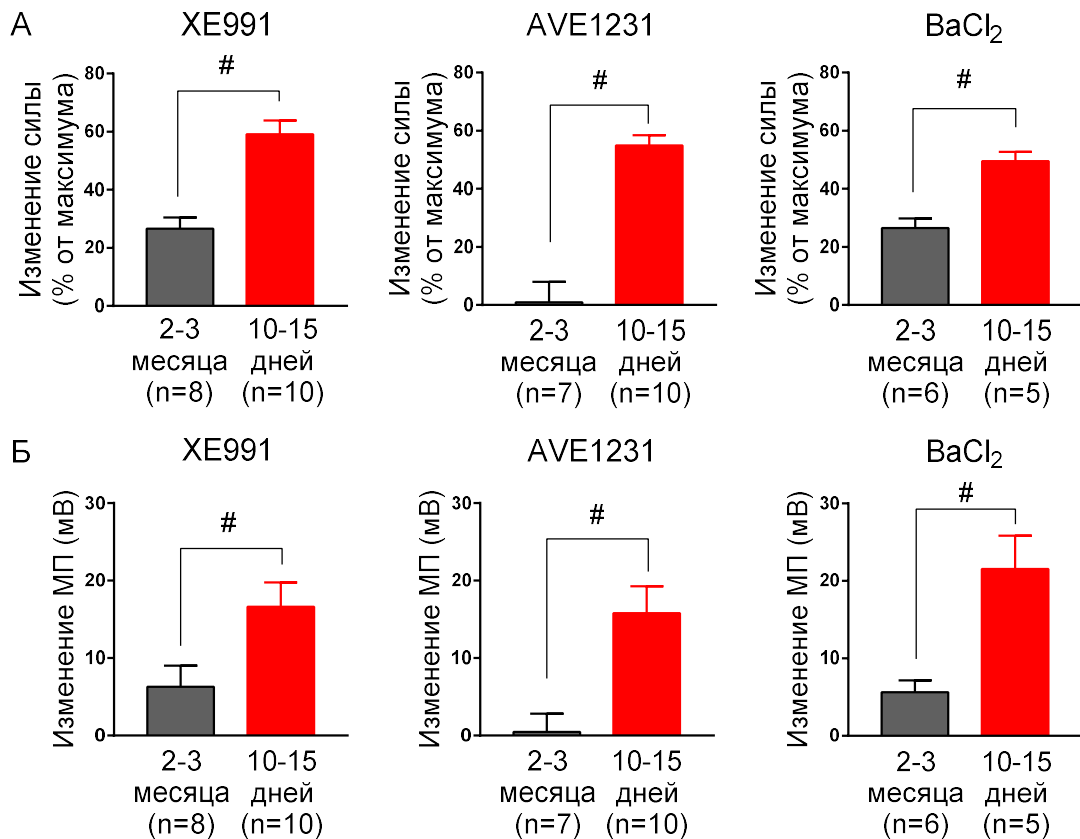


Рисунок 6. Изменения вызванных МХ сократительных ответов (А) и деполяризации (Б) в присутствии блокаторов:  $K_v7$  каналов XE991 (3 мкМ), TASK-1 каналов AVE1231 (1 мкМ) и  $K_{ir}$  каналов  $BaCl_2$  (30 мкМ). #  $p < 0.05$  – критерий Стьюдента.

В целом, результаты экспериментов по измерению МП ГМК позволяют заключить, что  $K_{ir}$ ,  $K_v7$  и TASK-1 каналы играют более значимую антиконстрикторную роль в раннем постнатальном онтогенезе путем более выраженного влияния на уровень МП гладкой мышцы артерий.

**В развивающемся организме влияние TASK-1 каналов снижает уровень системного АД.** Мы предположили, что крайне выраженное антиконстрикторное влияние  $K_v7$  и TASK-1 каналов в подкожной артерии крысят должно способствовать снижению периферического сопротивления сосудов и уровня АД, то есть проявляться на системном уровне. Для проверки данного предположения мы планировали провести эксперименты с внутривенным введением блокаторов этих каналов наркотизированным крысам. Однако блокатор  $K_v7$  каналов XE991 оказывал значительное влияние на работу сердца, что проявлялось в появлении выраженных аритмий, то есть исследование эффектов XE991 на системное АД не представлялось возможным. Поэтому мы ограничились исследованием системных эффектов блокатора TASK-1 каналов AVE1231.

Уровень среднего АД у крысят был вдвое ниже, чем у взрослых крыс, а ЧСС не различалась (Таблица 1), что согласуется с данными литературы [Sofronova et al., 2016; Mochalov et al., 2018]. Чтобы исключить влияние AVE1231 на активность автономной нервной системы, исследование его эффектов проводили в условиях ганглиоблокады. Ганглиоблокада привела к снижению среднего АД в обеих возрастных группах, а также к снижению ЧСС у крысят (Таблица 1).

Таблица 1. Значения среднего АД (САД) и ЧСС до и после введения ганглиоблокатора хлоризондамина (2.5 мг/кг) у крыс в возрасте 2-3 месяца (n=12) и 10-15 дней (n=19)

Показатели	До ганглиоблокады		После ганглиоблокады	
	2-3 месяца	10-15 дней	2-3 месяца	10-15 дней
САД, мм рт.ст.	85.6±3.8	46.6±1.9*	62.4±1.5 <sup>#</sup>	32.2±1.2* <sup>#</sup>
ЧСС, уд/мин	345±10	337±11	341±13	236±11* <sup>#</sup>

\*, # – критерий Стьюдента (\* – по сравнению с группой «2-3 месяца», # – по сравнению со значениями САД и ЧСС до введения ганглиоблокатора).

На рисунке 7 показано, как в каждой возрастной группе крыс соотносились уровни среднего АД у животных, которым вводили растворитель и AVE1231. У взрослых крыс мы не обнаружили различий в уровне среднего АД между подгруппами «Контроль» и «AVE1231» (после введения ДМСО или блокатора, Рисунок 7А). Однако у крысят уровень среднего АД в подгруппе с блокадой TASK-1 каналов был значительно выше, чем в подгруппе, которой вводили ДМСО (Рисунок 7Б). Таким

образом, блокада TASK-1 каналов оказывает влияние на среднее АД только у 10-15-дневных крыс. Следует отметить, что мы не обнаружили статистически значимых различий в значениях ЧСС после введения ДМСО и AVE1231 ни у взрослых крыс, ни у крысят.

Итак, TASK-1 каналы способствуют поддержанию АД на низком уровне в период раннего постнатального онтогенеза.

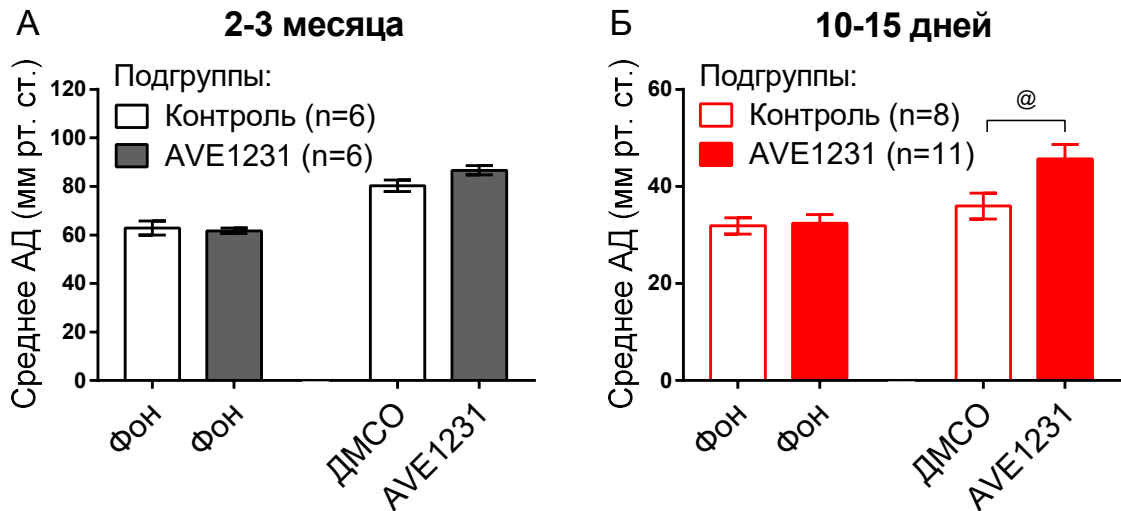


Рисунок 7. Влияние блокады TASK-1 каналов на уровень АД у крыс разного возраста. Приведены значения среднего АД после ганглиоблокады (Фон) и при последующем введении блокатора TASK-1 каналов (AVE1231, 4 мг/кг) или его растворителя (ДМСО) у взрослых крыс (А) и крысят (Б). @P<0.05 – критерий Стьюдента.

**Снижение антиконстрикторной роли  $K_{ir}$ ,  $K_v7$  и TASK-1 каналов в постнатальном онтогенезе не связано с трофическим влиянием симпатических нервов.** Известно, что симпатические нервы оказывают трофическое влияние на различные ткани [Орбели, 1962]. Например, снижение чувствительности сократительного аппарата гладкой мышцы артерий к  $Ca^{2+}$  по мере взросления коррелирует во времени с развитием симпатической иннервации сосудов [Puzdrova et al., 2014; Mochalov et al., 2018]. Мы предположили, что уменьшение вклада  $K_{ir}$ ,  $K_v7$  и TASK-1 каналов в регуляцию сосудистого тонуса с возрастом также связано с влиянием этого механизма. Чтобы проверить эту гипотезу, были исследованы эффекты блокаторов  $K_{ir}$ ,  $K_v7$  и TASK-1 каналов на сократительные ответы артерий крыс с хронической неонатальной десимпатизацией. Кроме того, мы оценили содержание мРНК порообразующих субъединиц  $K_{ir}$  каналов и TASK-1 каналов в гладкой мышце артерий таких животных.

Результаты проведенного исследования показали, что артерии десимпатизированных крыс обладали большей чувствительностью к МХ, что согласуется с данными литературы [Neumann et al., 2016]. Однако эффекты блокады  $K_{ir}$ ,  $K_v7$  и TASK-1 каналов на сократительные реакции артерий

десимпатизированных крыс (Рисунок 8Б) не были увеличены по сравнению с контрольной группой (Рисунок 8А). Кроме того, мы не обнаружили различий в количестве мРНК порообразующих субъединиц  $K_{ir}2.1$  и  $K_{ir}2.4$ , а также TASK-1 (Рисунок 8В) в ГМК подкожной артерии между двумя экспериментальными группами животных.

Исходя из результатов функциональных и молекулярных исследований, можно заключить, что снижение вклада  $K_{ir}$ ,  $K_v7$  и TASK-1 каналов в регуляцию сосудистого тонуса у крыс по мере взросления не связано с трофическим влиянием симпатических нервов.

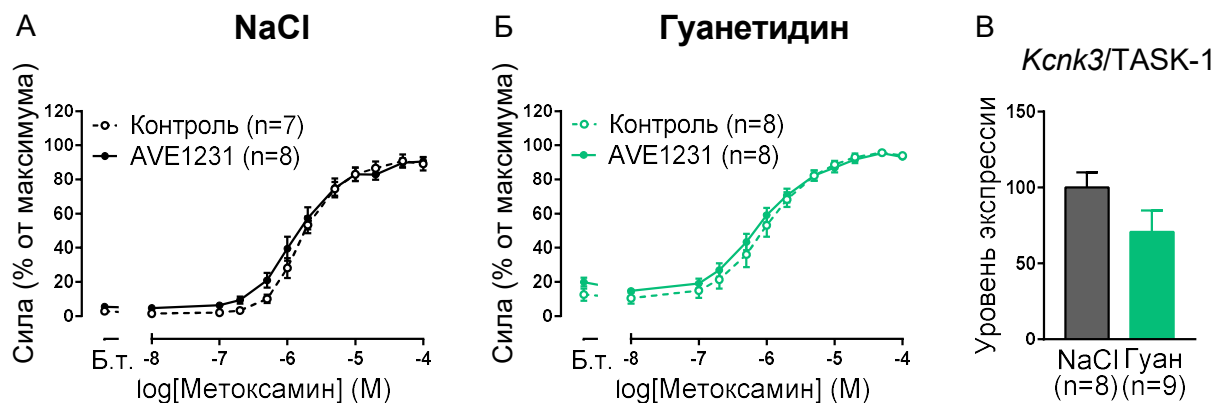


Рисунок 8. Анतिकонстрикторная роль TASK-1 каналов в подкожной артерии крыс не изменяется в результате хронической неонатальной десимпатизации. А, Б: Влияние блокады TASK-1 каналов AVE1231 (1 мкМ) на сократительные ответы подкожной артерии контрольных (NaCl) и десимпатизированных крыс (Гуанетидин). В: Относительное содержание мРНК порообразующей субъединицы TASK-1 в артериях контрольных и десимпатизированных крыс. Б. т. – базальный тонус.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена изучению особенностей функционирования калиевых каналов, важных регуляторов тонуса артериальных сосудов, в период раннего постнатального онтогенеза по сравнению со взрослым возрастом. Мы установили, что анतिकонстрикторная роль большинства семейств калиевых каналов в гладкой мышце периферических артерий резистивного типа у крыс значительно выше в период раннего постнатального онтогенеза и снижается по мере взросления организма. Важно, что такие изменения анतिकонстрикторной роли калиевых каналов с возрастом были установлены как на уровне отдельных сосудов (по эффектам блокаторов калиевых каналов на сократительные реакции и МП изолированных артерий), так и на системном уровне (по эффектам блокады калиевых каналов на уровень АД). Далее, выявленные возрастные различия в функционировании калиевых каналов были подтверждены данными о более высоком содержании мРНК и белка этих каналов в ГМК артерий в период раннего постнатального онтогенеза.

Высокая активность калиевых каналов в новорожденном организме наряду с другими факторами, такими как более выраженное антиконстрикторное влияние сосудистого эндотелия [Gaynullina et al., 2013; Sofronova et al., 2016], ведет к снижению тонуса гладкой мышцы сосудов и способствует поддержанию АД на низком уровне. В развивающемся организме низкий уровень давления крови имеет адаптивное значение, поскольку в период раннего постнатального онтогенеза сердце и сосуды еще не сформированы окончательно. Таким образом, более расслабленное состояние сосудов предотвращает возможное повреждение гладкомышечной стенки артерий, способствует снижению нагрузки на сердце и ведет к увеличению кровотока в активно развивающихся органах и тканях.

Очевидно, что слишком низкое АД в новорожденном возрасте может быть опасным для жизни. В связи с этим в сердечно-сосудистой системе крысят существуют механизмы, уравнивающие релаксирующие влияния оксида азота и калиевых каналов. Действительно, известно, что активность ключевого механизма, способствующего сокращению сосудов – сигнального пути Rho-киназы, значительно выше в сосудах крысят [Puzdrova et al., 2014; Mochalov et al., 2018]. Кроме того, вклад хлорных токов, деполяризующих гладкую мышцу артерий, также выше в период раннего постнатального онтогенеза [Kostyunina et al., 2019]. Вероятно, одновременное повышение активности вазодилататорных и вазоконстрикторных механизмов в новорожденном возрасте обеспечивает расширение диапазона регуляции сосудистого тонуса, что, в свою очередь, важно для адаптации организма к меняющимся условиям окружающей среды.

Интересно, что активность сигнального пути Rho-киназы и вклад хлорных деполяризующих токов в регуляцию сосудистого тонуса снижаются по мере взросления одновременно с развитием симпатической иннервации сосудов, что указывает на связь этих изменений с трофическим влиянием симпатических нервов [Puzdrova et al., 2014; Kostyunina et al., 2019]. Исходя из этих данных, мы предположили, что уменьшение функциональной роли калиевых каналов в сосудах с возрастом происходит по той же причине, однако данная гипотеза не подтвердилась. Таким образом, поиск механизмов, способствующих снижению антиконстрикторной роли калиевых каналов в сосудах с возрастом, является предметом дальнейших исследований.

Нельзя не отметить, что в литературе появляется все больше данных о нарушении функционирования калиевых каналов при сердечно-сосудистых патологиях [Konduri et al., 2009; Tajada et al., 2012; Ma et al., 2013; Nieves-Cintrón et al., 2018]. Также известно, что заболевания системы кровообращения всё чаще обнаруживают у детей [Школьникова et al., 2008; Flynn, 2018]. В связи с этим результаты данной работы важны для разработки путей фармакологической коррекции нарушений работы сердечно-сосудистой системы в период раннего постнатального онтогенеза.



## ВЫВОДЫ

1. Анतिकонстрикторное влияние большинства калиевых каналов ( $K_{ir}$ ,  $K_v1$  и особенно  $K_v7$  и TASK-1) увеличено в подкожной артерии крыс в возрасте 10-15 дней по сравнению со взрослыми животными, кроме  $ВК_{Ca}$  каналов, влияние которых, напротив, увеличено во взрослом возрасте.
2. Анतिकонстрикторное влияние  $K_{ir}$ ,  $K_v7$  и TASK-1 каналов в артериях 10-15-дневных крыс реализуется путем противодействия деполяризации гладкомышечных клеток сосудов.
3. Содержание мРНК большинства порообразующих и регуляторных субъединиц калиевых каналов в гладкой мышце артерий выше у 10-15-дневных крыс по сравнению со взрослыми животными, кроме  $ВК_{Ca}$  каналов, уровни экспрессии субъединиц которых выше во взрослом возрасте.
4. Содержание белка порообразующей субъединицы  $K_v7.4$  канала и его регуляторной субъединицы  $K_{sne4}$ , а также порообразующей субъединицы TASK-1 увеличено в гладкой мышце артерий 10-15-дневных крыс по сравнению со взрослыми животными.
5. Влияние TASK-1 каналов способствует снижению уровня артериального давления у крыс в возрасте 10-15 дней, но не во взрослом возрасте.
6. Уменьшение вклада  $K_{ir}$ ,  $K_v7$  и TASK-1 каналов в регуляцию тонуса подкожной артерии крысы в ходе взросления не связано с трофическим влиянием симпатических нервов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности 03.03.01 – Физиология:**

1. **Shvetsova A.A.**, Gaynullina D.K., Tarasova O.S., Schubert R. Negative feedback regulation of vasoconstriction by potassium channels in 10- to 15- day-old rats: dominating role of  $K_v7$  channels // *Acta Physiologica*. – 2019. – V. 225. – P. e13176. (Scopus, WoS, IF = 5.868)
2. Sofronova S.I., Gaynullina D.K., **Shvetsova A.A.**, Borzykh A.A., Selivanova E.K., Kostyunina D.S., Sharova A.P., Martyanov A.A., Tarasova O.S. Antenatal/early postnatal hypothyroidism alters arterial tone regulation in 2-week-old rats // *Journal of Endocrinology*. – 2017. – V. 235. – №2. – P. 137–151. (Scopus, WoS, IF = 4.381)
3. Костюнина Д.С., **Швецова А.А.**, Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С. Роль калиевых каналов входящего выпрямления в реакциях расслабления артерий задней конечности крысы // *Биофизика*. – 2016. – Т. 61. – № 5. – С. 898–905. (Scopus IF=0.22, RSCI IF=0.99)
4. Sofronova S.I., Borzykh A.A., Gaynullina D.K., Kuzmin I.V., **Shvetsova A.A.**, Lukoshkova E.V., Tarasova O.S. Endothelial nitric oxide weakens arterial contractile responses and reduces blood pressure during early postnatal

development in rats // Nitric Oxide – Biology and Chemistry. – 2016. – V. 55-56. – P. 1–9. (Scopus, WoS, IF = 3.371)

### **Тезисы докладов в рецензируемых журналах**

1. **Shvetsova A.A.**, Gaynullina D.K., Schubert R., Tarasova O.S. Postnatal maturation attenuates the impact of  $K_v7$  channels on smooth muscle membrane potential and contractility in rat arteries // Journal of Vascular Research. – 2017. – V. 54. – № 2. – P. 20. (Scopus, WoS, IF = 1.855)
2. **Shvetsova A.**, Gaynullina D., Schubert R., Tarasova O.  $K_{ATP}$ ,  $K_v7$  and  $BK_{Ca}$  channels in the regulation of contractile responses of rat saphenous arteries during early postnatal ontogenesis // Acta Physiologica. – 2015. – V. 215. – № S706. – P. 21. (Scopus, WoS, IF = 5.868)

### **Прочие тезисы докладов**

1. Kostyunina D., **Shvetsova A.**, Gaynullina D., Tarasova O.S. The role of chloride ions in contraction of rat saphenous artery changes during postnatal development partly due to influence of sympathetic innervation // Book of Abstracts «Europhysiology», London. – 2018. – P. 452.
2. Гайнуллина Д.К., **Швецова А.А.**, Костюнина Д.С., Кирюхина О.О., Мочалов С.В., Шуберт Р., Тарасова О.С. Ионные механизмы регуляции тонуса гладкой мышцы сосудов в раннем постнатальном онтогенезе // Сборник материалов XXIII съезда Физиологического общества имени И.П. Павлова. – 2017. – Воронеж, «ИСТОКИ». – С. 866-868.
3. Kostyunina D.S., **Shvetsova A.A.**, Gaynullina D.K., Tarasova O.S. The contribution of inward rectifying potassium channels to the potassium-induced relaxation of different arteries of rat hindlimb // Book of Abstracts «Joint Meeting of the American Physiological Society and The Physiological Society». – 2016. – Wiley & Sons (Chichester, Sussex, UK, England). – P. 424.
4. Kostyunina D.S., **Shvetsova A.A.**, Gaynullina D.K., Tarasova O.S. The role of inwardly rectifying potassium channels in the regulation of rat arteries contractile responses // Book of Abstracts «Biological Motility». – 2016. – Pushchino, SYNCHROBOOK. – С. 116-117.
5. Gaynullina D.K., **Shvetsova A.A.**, Kostyunina D.S., Schubert R., Tarasova O.S. Vascular smooth muscle potassium channels in early postnatal ontogenesis // Book of Abstracts «Biological Motility». – 2016. – Pushchino, SYNCHROBOOK. – С. 67-68.
6. Костюнина Д.С., **Швецова А.А.**, Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С. Механизмы расслабления различных артерий задней конечности крысы при повышении внеклеточной концентрации ионов калия // Сборник тезисов докладов VI Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии кровообращения. – 2016. – Москва, МАКС Пресс. – С. 74-76.
7. Гайнуллина Д.К., **Швецова А.А.**, Костюнина Д.С., Шуберт Р., Тарасова О.С. Роль калиевых каналов в регуляции тонуса артерий в раннем постнатальном онтогенезе // сборник материалов XIII Международной научной школы-конференции «Адаптация развивающегося организма». – 2016. – Казань, Вестфалика. – С. 33-34.
8. Костюнина Д.С., **Швецова А.А.**, Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С. Роль калиевых каналов входящего выпрямления в регуляции тонического сокращения артерий крыс // сборник материалов XIII Международной научной школы-конференции «Адаптация развивающегося организма». – 2016. – Казань, Вестфалика. – С. 64-65.
9. **Швецова А.А.**, Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С. Роль основных типов калиевых каналов гладкомышечных клеток в регуляции сократительных ответов подкожной артерии крысы в раннем постнатальном онтогенезе // сборник тезисов докладов VI Всероссийской с международным участием школы-конференции по физиологии кровообращения. – 2016. – Москва, МАКС Пресс. – С. 182-184.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВК<sub>Ca</sub> (big conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels) – Ca<sup>2+</sup>-активируемые калиевые каналы большой проводимости
- DPO-1 (diphenyl phosphine oxide-1) – дифенил фосфин оксид-1
- GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа
- K<sub>2P</sub> (two-pore domain potassium channels) – калиевые каналы, имеющие две порообразующие петли
- K<sub>АТР</sub> (АТР-sensitive potassium channels) – АТФ-чувствительные калиевые каналы
- K<sub>ir</sub> (inward-rectifier potassium channels) – калиевые каналы входящего выпрямления
- K<sub>v</sub> (voltage-gated potassium channels) – потенциал-управляемые калиевые каналы
- МХ (methoxamine) – метоксамин
- TASK (acid pH-sensitive K<sub>2P</sub> channels) – чувствительные к кислоте K<sub>2P</sub> каналы
- АД – артериальное давление
- ГМК – гладкомышечная клетка
- ДМСО – диметилсульфоксид
- МП – мембранный потенциал
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- ОМ – обезжиренное молоко
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ЧСС – частота сердечных сокращений

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность Тарасовой Ольге Сергеевне за чуткое руководство и помощь на всех этапах исследования; Гайнуллиной Дине Камилевне за моральную поддержку, помощь в освоении методик, внимательное отношение и рекомендации к работе; Мартьянову Андрею Александровичу, Борзых Анне Анатольевне, Кузьмину Илье Владимировичу, Софроновой Светлане Ивановне, Кирюхиной Оксане Олеговне, Селивановой Екатерине Константиновне, Костюниной Дарье Сергеевне за техническую помощь и поддержку.

Автор выражает благодарность профессору Рудольфу Шуберту, а также Камеле Йост и Ольге Заварицкой (Институт сердечно-сосудистой физиологии Гейдельбергского университета в г. Мангейм, Германия) за моральную поддержку, рекомендации к работе и помощь в написании статей.

Автор сердечно благодарен Кузьмину Владиславу Стефановичу за внимательное прочтение и рецензирование данной работы.

Автор глубоко признателен заведующему кафедрой физиологии человека и животных Каменскому Андрею Александровичу, а также всем сотрудникам кафедры за положительное отношение, интерес к работе и поддержку.

Автор чрезвычайно благодарен родным, близким и друзьям, в особенности Швецовой Виктории Владимировне, Митрофановой Марии Николаевне, Митрофанову Владимиру Федоровичу, Новикову Илье Александровичу, Богомоловой Агнесе Петровне и Гончарову Алексею Игоревичу за участие, поддержку и понимание.