

## Оригинальные статьи

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616-092.9

Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф.

### Половые различия возрастных изменений функциональной активности и экспрессии *MaxiK* каналов в аорте и сердце крыс

ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»,  
125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Старение является доминирующим фактором риска возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, которые остаются основной причиной смерти в мире.  $Ca^{2+}$ -активируемые потенциалзависимые калиевые каналы большой проводимости (*MaxiK*) играют важную роль в поддержании тонуса сосудов и регуляции сократительной функции миокарда. С нарушением функции *MaxiK* связывают аномальное расслабление или сокращение сосудов, а также нарушение сердечного ритма. Однако влияние старения на функцию *MaxiK* и их вклад в развитие возраст-ассоциированных заболеваний неясны. Большинство исследований проводятся на мелких резистивных сосудах старых животных, в то время как в старости большую роль в регуляции системного артериального давления приобретают магистральные сосуды. Отсутствуют данные о половых особенностях возрастных изменений свойств этих каналов. **Цель исследования** – оценка влияния возраста и пола животных на функциональную активность и экспрессию  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц *MaxiK* каналов в аорте и сердце.

**Методика.** Исследования проводили на молодых (3 мес) и возрастных (18 мес) крысах самцах и самках. Силу сокращения изолированных фрагментов грудного отдела аорты измеряли в изометрическом режиме на проволочном четырехканальном миографе (Danish Myo Technology, модель Multi Myograph System – 620M). Экспрессию генов порообразующей  $\alpha$  (*Kcna1*) и регуляторной  $\beta$  (*Kcnmb4*) субъединиц *MaxiK* канала в аорте и в различных отделах сердца оценивали с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализ).

**Результаты.** Инкубация сосудов с блокатором *MaxiK* ибериотоксином (100 нМ) в течение 30 мин приводила к усилению сократительной реакции аорты крыс в ответ на воздействие возрастающих доз серотонина ( $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  М) только у молодых половозрелых крыс обоего пола (3 мес), что проявлялось в сдвиге зависимости «концентрация-эффект» влево. У старых крыс, как в присутствии, так и в отсутствие ибериотоксина в равной мере возрастает чувствительность сосудов к вазоконстрикторному действию серотонина, что свидетельствует об утрате в стареющих сосудах защитного механизма отрицательной обратной связи, реализуемого *MaxiK*. В аорте старых самцов уровень экспрессии генов  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц канала оставался неизменным. В аорте старых самок выявлено снижение на 45% содержания мРНК  $\beta$  субъединицы *MaxiK* канала. Установлено, что у крыс обоего пола в левом желудочке экспрессия гена порообразующей  $\alpha$  субъединицы возрастает более чем в два раза. Экспрессия гена регуляторной  $\beta$  субъединицы снижается в 1,4 и 1,6 раза у самцов и самок соответственно. Предполагается, что нарушение нормального (1:1) соотношения между  $\alpha$  и  $\beta$  субъединицами *MaxiK* может провоцировать возникновение желудочковых аритмий в старости. Преобладание экспрессии  $\alpha$  субъединицы канала выявлено в правом предсердии старых крыс самцов. Напротив, в левом предсердии старых крыс обоего пола и в правом у самок значительно преобладает экспрессия гена *Kcnmb4* над *Kcna1*.

**Заключение.** В процессе старения в аорте крыс самцов и самок нивелируется важнейший механизм отрицательной обратной связи, реализуемый *MaxiK* каналами в ответ на воздействие эндогенных вазоконстрикторов, что может быть одним из факторов риска развития гипертонии в старости. Дисбаланс в уровнях экспрессии  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц *MaxiK* в различных отделах стареющего сердца может отрицательно влиять на сократительную функцию кардиомиоцитов и сердечный ритм. Полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии старения на свойства *MaxiK* каналов, локализованных в магистральных сосудах и сердце крыс самцов и самок. *MaxiK* могут быть потенциальными мишенями для фармакологической модуляции возраст-ассоциированной гипертонии и нарушений сердечного ритма.

**Ключевые слова:** старение; половой диморфизм; сократимость; аорта; миокард; калиевые каналы; экспрессия; *MaxiK*

**Для цитирования:** Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф. Половые различия возрастных изменений функциональной активности и экспрессии *MaxiK* каналов в аорте и сердце крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67(4): 4-12.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.4-12

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования, написание текста – Кожевникова Л.М.; сбор и обработка материала, подготовка иллюстративного материала, статистическая обработка – Суханова И.Ф.; редактирование – Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф. Утверждение окончательного варианта статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Козhevникова Любовь Михайловна, e-mail: lubovmih@yandex.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания № FGFU-2022-0008.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.10. 2023

Принята к печати 19.10.2023

Опубликована 27.12.2023

**Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F.**

## Sex differences in age-related changes in the functional activity and expression of MaxiK channels in rat aorta and heart

Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation

Aging is a dominant risk factor of cardiovascular diseases that remain the leading cause of death worldwide. Ca<sup>2+</sup>-activated voltage-gated large conductance potassium channels (MaxiK) play an important role in maintaining vascular tone and myocardial contractility. Impaired MaxiK function is associated with disordered vascular relaxation or contraction and heart rhythm. However, the effects of aging on the MaxiK function and the MaxiK contribution to the development of age-associated diseases are unclear. Most studies have been performed on small resistance blood vessels of old animals while in old age, great vessels take on a greater role in the regulation of systemic blood pressure. Data on gender-related changes in MaxiK properties are not available. **The aim of the study** was to assess the effect of age and sex of animals on the functioning and expression of MaxiK  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in the aorta and heart.

**Methods.** The study was performed on young (3 months) and aged (18 months) male and female rats. The contraction force of isolated fragments of the thoracic aorta was measured in the isometric mode on a wire four-channel myograph (620M Multi Myograph System, Danish Myo Technology). Gene expression of the pore-forming  $\alpha$  (*Kcnma1*) and regulatory  $\beta$  (*Kcnmb4*) subunits of the MaxiK channel was assessed in the aorta and various parts of the heart using the quantitative polymerase chain reaction (PCR analysis).

**Results.** Incubation of blood vessels with the MaxiK blocker, iberiotoxin (100 nM), for 30 min increased the contractile reaction of the rat aorta to increasing doses of serotonin ( $10^{-7}$ – $10^{-5}$  M) only in young, sexually mature (3 months old) rats of either sex, which was evident in a shift of the concentration-effect curve to the left. In old rats, both in the presence and absence of iberiotoxin, the sensitivity of blood vessels to the vasoconstrictor effect of serotonin equally increased, which indicated the loss of the negative feedback protective mechanism mediated by MaxiK in aging blood vessels. In the aorta of old males, the level of gene expression of MaxiK  $\alpha$  and  $\beta$  subunits remained unchanged. In the aorta of old females, MaxiK  $\beta$  subunit mRNA was decreased by 45%. In the left ventricle of rats of either sex, the pore-forming  $\alpha$  subunit gene expression was more than twofold increased. The regulatory  $\beta$  subunit gene expression was reduced by 1.4 and 1.6 times in males and females, respectively. The data suggested that the disruption of the normal 1:1 ratio between the MaxiK  $\alpha$  and  $\beta$  subunits may provoke ventricular arrhythmias in old age. The MaxiK  $\alpha$  subunit expression predominated in the right atrium of old male rats. On the contrary, in the left atrium of old rats of either sex and in the right atrium of females, the *Kcnmb4* gene expression significantly predominated over the *Kcnma1* gene expression.

**Conclusion.** During the aging of the aorta of male and female rats, the essential negative feedback response of MaxiK channels to endogenous vasoconstrictors attenuates, which may be a risk factor for the development of hypertension in old age. Imbalanced expression of the MaxiK  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in different compartments of the aging heart may adversely affect the cardiomyocyte contractility and heart rhythm. The results of the study indicate a negative effect of aging on the properties of MaxiK channels localized in the great vessels and heart of male and female rats. Thus, MaxiK may be a potential target for pharmacological modulation of age-associated hypertension and cardiac arrhythmias.

**Keywords:** aging; sexual dimorphism; aortic contractility; myocardium; potassium channels; expression; MaxiK

**For citation:** Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F. Sex differences in age-related changes in the functional activity and expression of MaxiK channels in the aorta and heart of rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental' naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(4): 4-12. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.04.4-12

**Author's contribution:** concept and design of the study, text writing – Kozhevnikova L.M.; collection and processing of material, preparation of illustrative material, statistical processing – Sukhanova I.F.; editing – Kozhevnikova L.M., Sukhanova I.F. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all authors.

**For correspondence:** Lyubov M. Kozhevnikova, DSc, Major scientific researcher of the Laboratory of Chronic Inflammation and Microcirculation Institute of General Pathology and Pathophysiology Russian Academy of Sciences, Baltiyskaya Str. 8, Moscow, 125315, Russian Federation, e-mail: lubovmih@yandex.ru

**Information about the authors:**Kozhevnikova L.M., <https://orcid.org/0000-0002-1323-6472>Sukhanova I.F., <https://orcid.org/0000-0002-1220-2596>

Received 12.10.2023

Accepted 19.10.2023

Published 27.12.2023

**Введение**

Частота сердечно-сосудистых заболеваний увеличивается с возрастом из-за резкого снижения адаптивных механизмов и повышенной уязвимости сосудов и миокарда к воздействию эндогенных и экзогенных факторов. Существенный вклад в регуляцию миогенного тонуса сосудов и сократимости миокарда вносят ионные каналы. Большое значение в регуляции сократительной активности сосудов и миокарда имеют калиевые каналы [1-3].  $\text{Ca}^{2+}$ - и потенциал чувствительные калиевые каналы большой проводимости (MaxiK или  $\text{VK}_{\text{Ca}}$ ) играют важную роль в формировании возбудимости мышц и нейронов. MaxiK характеризуются высокой  $\text{K}^+$ -селективностью, большой канальной проводимостью и способностью к двойной активации двумя различными физиологическими стимулами: деполяризацией мембраны и локальным увеличением внутриклеточной концентрации ионов кальция. Стимуляция MaxiK каналов сопровождается быстрым оттоком ионов калия и гиперполяризацией мембраны, что является важнейшим физиологическим механизмом модуляции возбудимости мембран и внутриклеточного гомеостаза ионов кальция [4].

MaxiK каналы представляют собой трансмембранные белки, состоящие из двух нековалентно связанных субъединиц: порообразующей  $\alpha$  субъединицы (четыре  $\alpha$  субъединицы образуют пору канала) и регуляторной  $\beta$ 1 субъединицы [2, 5]. Хотя  $\alpha$  субъединица отвечает за основную функцию ионного потока MaxiK каналов, регуляторная  $\beta$ 1 субъединица значительно влияет на проводимость канала, изменяя его кинетику, чувствительность к напряжению/ $\text{Ca}^{2+}$  и фармакологию [6, 7].

В сердечно-сосудистой системе MaxiK каналы способствуют расслаблению сосудов и защищают миокард от ишемического повреждения [3, 6]. Дисфункция MaxiK приводит к нарушению сердечного ритма, развитию гипертензии и ряда других заболеваний [2, 8, 9].

До настоящего времени остаются неясными характер и механизмы изменения свойств MaxiK каналов в стареющих сосудах и миокарде, как и нет четкого представления об их причастности к развитию возраст-ассоциированных сердечно-сосудистых заболеваний. Показано, что в миоцитах мозговой артерии

стареющих крыс сохраняется нормальная экспрессия MaxiK, плотность тока ионов, кинетика и чувствительность каналов к  $\text{Ca}^{2+}$ , а также к активирующим соединениям [3]. В стареющих коронарных артериях, напротив, снижается экспрессия MaxiK каналов [5]. С возрастом снижается чувствительность MaxiK в брыжеечной артерии к  $\text{Ca}^{2+}$ /напряжению, падает экспрессия этих каналов [3]. Влияние старения на экспрессию и функцию MaxiK каналов во многом зависит от типа сосудов. Следует отметить, что все исследования проведены на резистивных сосудах самцов.

Физиологические эффекты и механизмы старения магистральных сосудов, в том числе изменения их чувствительности по отношению к вазоактивным соединениям, изучены недостаточно. Важная функция аорты заключается в том, чтобы гасить повышение давления, вызванного выбросом крови из левого желудочка во время систолы. Потеря данной функции приводит к увеличению систолического давления и к нагрузке на левый желудочек сердца. Все это способствует развитию гипертензии, гипертрофии левого желудочка, субэндокардиальной ишемии и фиброза миокарда [10, 11].

В сердце MaxiK каналы локализованы во внутренней митохондриальной мембране кардиомиоцитов. Каналы mitoMaxiK играют важную роль в защите сердца от повреждающего действия ишемии/реперфузии. Механизм кардиопротекции связывают с модуляцией уровней митохондриального кальция, активных форм кислорода и мембранного потенциала [12, 13]. Имеются данные об участии mitoMaxiK в регуляции сердечного ритма и причастности к развитию аритмий [8, 14].

До настоящего времени не изучено влияние пола на возрастные изменения функциональной активности и экспрессии MaxiK каналов в магистральных сосудах и сердце. В данной работе для понимания вклада MaxiK каналов в развитие возраст-ассоциированных сердечно-сосудистых заболеваний мы оценили влияние возраста и пола на функциональную активность и экспрессию генов  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц MaxiK канала в аорте и сердце крыс.

### Методика

Эксперименты выполнены на крысах породы Вистар. Содержание лабораторных животных и эксперименты проводили в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals», Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в эксперименте, и требованиями Директивы Совета ЕС «О сближении законов, постановлений и административных положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (86/609/ЕЕС), национальным стандартом РФ ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Этического комитета института общей патологии и патофизиологии, и было утверждено Комитетом по этике (протокол утверждения проекта № 5 от 7 июня 2019 г.; протокол окончательного утверждения № 1а от 2 октября, 2020 г.).

**Физиологические методы исследования.** Исследования проводили на крысах самцах и самках в возрасте 3 (молодые:  $n = 15$  для самцов,  $n = 12$  для самок) и 18 мес (пожилые:  $n = 15$  для самцов,  $n = 12$  для самок). Анестезированных крыс (25% раствор уретана, 4 мл/кг) декапитировали, извлекали грудной отдел аорты и сердце. Аорту помещали в раствор Кребса-Хенселейта, охлажденный до  $+4^{\circ}\text{C}$ , очищали и нарезали на кольца шириной 1,5–2,2 мм. Силу сокращения сосудов измеряли в изометрическом режиме на проволочном четырехканальном миографе (DanishMyo Technology, модель Multi Myograph System – 620M). Для этого кольца аорты крепили на держателях, помещенных в раствор Кребса-Хенселейта, аэрируемый карбогеном (5%  $\text{CO}_2$  в  $\text{O}_2$ ). Состав раствора Кребса-Хенселейта в мМ:  $\text{NaCl} - 121$ ;  $\text{KCl} - 4.69$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1.1$ ;  $\text{NaHCO}_3 - 23.8$ ;  $\text{MgSO}_4 - 1.6$ ;  $\text{CaCl}_2 - 1.6$ ; ЭДТА – 0.032; D-глюкоза – 8. После достижения в камерах миографа температуры раствора  $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  фрагменты аорты растягивали радиально до оптимального диаметра просвета, соответствующего 90% пассивного диаметра сосуда при 100 мм Hg. После процедуры растяжения и последующего периода стабилизации в течение 40 мин жизнеспособность сосудов проверяли с помощью 0,1 мкМ норадреналина – агониста адренорецепторов (Sigma, США). Сохранность эндотелия тестировали с помощью агониста мускариновых рецепторов (10 мкМ карбахола, Sigma, США). В экспериментах на изолированных сосудах использовали агонист 5HT<sub>2</sub> рецепторов серотонин (Sigma, США) и селективный блокатор MaxiK каналов ибериотоксин (Tocris, Англия).

**Молекулярно-биологические методы исследования.**  
**Выделение РНК.** Образцы тканей предсердий, левого желудочка и аорты помещали в раствор RNeasy (Ambion, США) и хранили до выделения РНК при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ткани измельчали в жидком азоте. Экстракцию РНК проводили с использованием набора GeneJET™ (ThermoFisher Scientific Inc., США) согласно протоколу производителя. Выделенную тотальную РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific Inc., США) для предотвращения загрязнения геномной ДНК. Концентрацию тотальной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Для проведения реакции обратной транскрипции с использованием набора Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США) брали 1 мкг РНК. Реакцию проводили в соответствии с инструкцией производителя, используя случайные гексамерные праймеры.

Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием набора qPCRmix-HS («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя праймеров. Праймеры для реакции были подобраны, синтезированы и валидированы ООО «ДНК-Синтез» (Россия) (табл.). ПЦР проводили в амплификаторе CFX96 Cyler-RealTime PCR Detection System (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, США) в 96-луночной планшете, в объеме 20 мкл, используя 1 мкл кДНК. Все эксперименты включали отрицательный контроль. Для нормализации уровней экспрессии генов использовали  $\beta$ -актин. Различия в экспрессии целевого гена оценивали по изменению соотношения уровней мРНК гена/мРНК  $\beta$ -актина. Результаты обрабатывали в Microsoft Excel с использованием алгоритма  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

**Статистический анализ** проводили с использованием программного обеспечения Graph Pad Prism 8. Для сравнения средних значений и статистических различий между группами использовали дисперсионный анализ (ANOVA). Данные в тексте представлены в виде средних значений и ошибки среднего. Расхождения считались значимыми при  $p < 0.05$ .

### Результаты

В работе оценивали влияние блокатора MaxiK каналов ибериотоксина на силу сокращения колец аорты в ответ на воздействие серотонина (5HT). Серотонин был выбран не случайно, поскольку ранее выявлено значительное повышение чувствительности сосудов старых животных к моноамину [15]. Причастность MaxiK каналов к развитию данного феномена



ранее не изучалась. Установлено, что предварительная инкубация сосудов с ибериотоксином в концентрации 100 нМ не влияла на базальный тонус сосудов молодых и пожилых крыс обоего пола. Блокатор калиевых каналов приводил к значительному усилению сократительной реакции колец аорты молодых самцов в ответ на воздействие серотонина, о чем свидетельствует смещение зависимости «концентрация-эффект» влево (рис. 1, А). Влияние ибериотоксина на 5HT-индуцированное сокращение изолированных фрагментов аорты молодых самок было менее выраженным, чем у самцов. По сравнению с контролем

в присутствии ибериотоксина сила сокращения сосудов молодых самок была статистически значимо выше только при добавлении моноамина в высоких концентрациях (рис. 1, Б).

С возрастом как у самцов, так и у самок возрастает чувствительность сосудов к действию 5HT. Сила сокращения сосудов возрастных животных обоего пола в ответ на воздействие серотонина после их инкубации с ибериотоксином была сопоставимой с реакцией сосудов в отсутствие блокатора MaxiK (рис. 1, А, Б). Это свидетельствует о том, что в стареющих сосудах снижена функциональная активность MaxiK каналов.

Последовательности праймеров, используемых в работе

Sequences of primers used in this work

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Праймер с флуоресцентным зондом
<i>Actb</i> (β-актин)	CTGACAGGATGCAGAAG-GAG	GATAGAGCCACCAATCCAC	FAM-CAAGATCATTGCTCCTCCT-GAGC-BHQ1
<i>Kcna1</i> (α субъединица MaxiK)	CTCAGCATGGTGC-CCTT	GCCATGTCGATCTGTAATGTGA	FAM-CTCATCAAC-CCAATAGAATCCTGCC-BHQ1
<i>Kcna4</i> (β субъединица MaxiK)	GACCAGCACCAGCTCCT	GACACTTCCGAGTTCTTCTGG	FAM-CCAAGTGCTCCTATATCCCGCCC-BHQ1

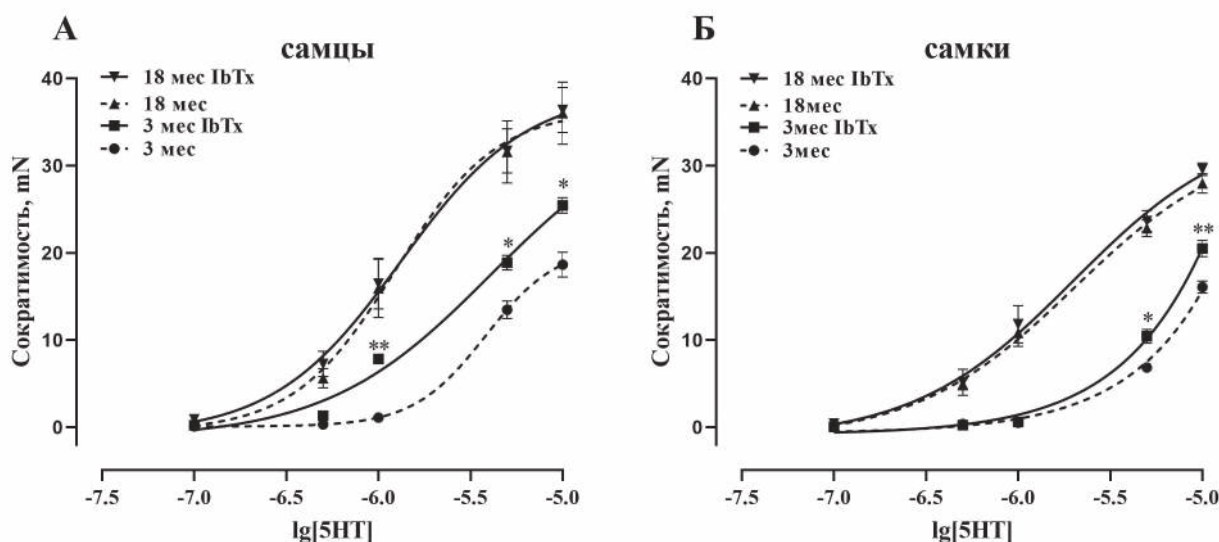


Рис. 1. Зависимости «концентрация-эффект» на 5-HT-индуцированное сокращение аорты в присутствии и отсутствии блокатора MaxiK каналов ибериотоксина (IbTx, 100 нМ) у крыс самцов (А) и самок (Б) разного возраста (3 и 18 мес). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  – сравнение между группами 3 мес крыс в присутствии и в отсутствие ибериотоксина.

Fig. 1. «Dose-response» relationship on 5-HT-induced aortic contraction in the presence and absence of the MaxiK channel blocker iberiotoxin (IbTx, 100 nM) in male (A) and female (B) rats of different ages (3 and 18 months). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  – comparison between groups of 3-month-old rats in the presence and absence of iberiotoxin.

Как показано на **рис. 2**, с возрастом экспрессия генов порообразующей  $\alpha$  (*Kcnma1*) и регуляторной  $\beta$  (*Kcnmb4*) субъединиц MaxiK каналов в аорте самцов не изменяется, в то время как у самок наблюдается значительное снижение уровня мРНК  $\beta$  MaxiK.

В работе также оценивали содержание мРНК *MaxiK* каналов в различных отделах сердца. В левом желудочке возрастных самцов и самок в 2 и более раза возрастает уровень экспрессии гена *Kcnma1* по сравнению с аналогичным показателем у молодых животных. Экспрессия гена регуляторной субъединицы канала *Kcnmb4* снижается у самцов в 1,4 и у самок в 1,6 раза (**рис. 3, А, Б**).

В левом предсердии возрастных крыс обоего пола, напротив, выявлено значительное снижение уровня мРНК порообразующей  $\alpha$  субъединицы MaxiK каналов (**рис. 3**). Кроме того, у самок в левом предсердии увеличивается экспрессия гена  $\beta$  субъединицы *Kcnmb4*. В правом предсердии у возрастных самцов снижается уровень экспрессии регуляторной  $\beta$  субъединицы, а у самок – порообразующей  $\alpha$  субъединицы MaxiK каналов.

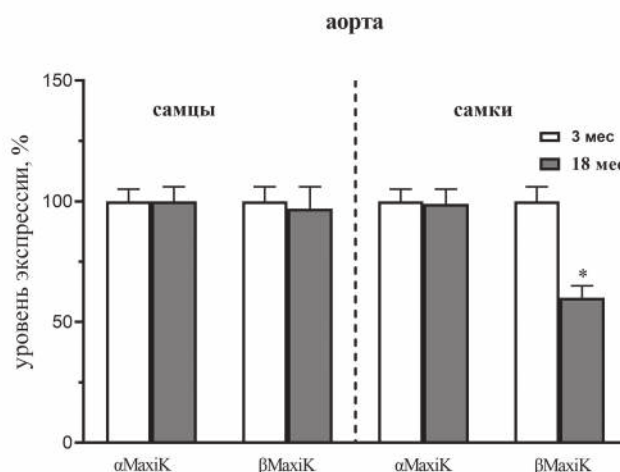
### Обсуждение

Ранее было показано, что с возрастом снижается вклад MaxiK каналов в регуляцию сократимости брыжеечной артерии крыс самцов [5]. Выявлено возраст-ассоциированное снижение экспрессии  $\beta$  субъединицы MaxiK. Авторы полагают, что нарушение работы MaxiK каналов обусловлено изменением соотношения  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц. В гладкомышечных клетках артерий  $\beta$  субъединица является основной функционально вспомогательной субъединицей канала. Считается, что в норме соотношение порообразующих и регуляторных субъединиц MaxiK каналов составляет 1:1. Ассоциация с регуляторными  $\beta$  субъединицами приводит к увеличению кальций- и потенциал чувствительности  $\alpha$  субъединиц, влияет на кинетику и фармакологию канала [16].

Полученные нами данные также указывают на изменение соотношения  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц в аорте пожилых самок, но не самцов. С возрастом функциональная активность каналов в аорте крыс обоего пола нарушается в равной степени, однако, в отличие от самок, в аорте самцов уровни экспрессии генов порообразующей  $\alpha$  (*Kcnma1*) и регуляторной  $\beta$  (*Kcnmb4*) субъединиц остаются неизменными (**рис. 2**). Исходя из этого можно предположить, что угнетение функции MaxiK каналов обусловлено и другими механизмами. Подобную ситуацию наблюдали при изучении причин эректильной дисфункции у пожилых крыс. В процессе старения

в клетках гладких мышц сосудов кавернозных тел пениса (rat corporal smooth muscle cells) уровни мРНК генов порообразующих  $\alpha$  (*Kcnma1*) и регуляторных  $\beta$  (*Kcnmb4*) субъединиц остаются неизменными. Однако происходят значительные изменения на уровне образования транскриптов, кодирующих различные сплайс-варианты белков порообразующей  $\alpha$  субъединицы. Альтернативный сплайсинг приводит к нарушению трафика MaxiK каналов из цитоплазмы к мембране и многократному снижению содержания канальных белков в ней [17]. Возможно, в аорте пожилых крыс имеет место наличие функционально неактивных сплайс-вариантов белков MaxiK, что приводит к снижению влияния MaxiK на сократимость аорты при неизменных уровнях экспрессии мРНК генов порообразующей  $\alpha$  (*Kcnma1*) и регуляторной  $\beta$  (*Kcnmb4*) субъединиц. Это предположение требует дальнейших исследований.

Таким образом, с возрастом в магистральных сосудах крыс нивелируется защитный механизм отрица-

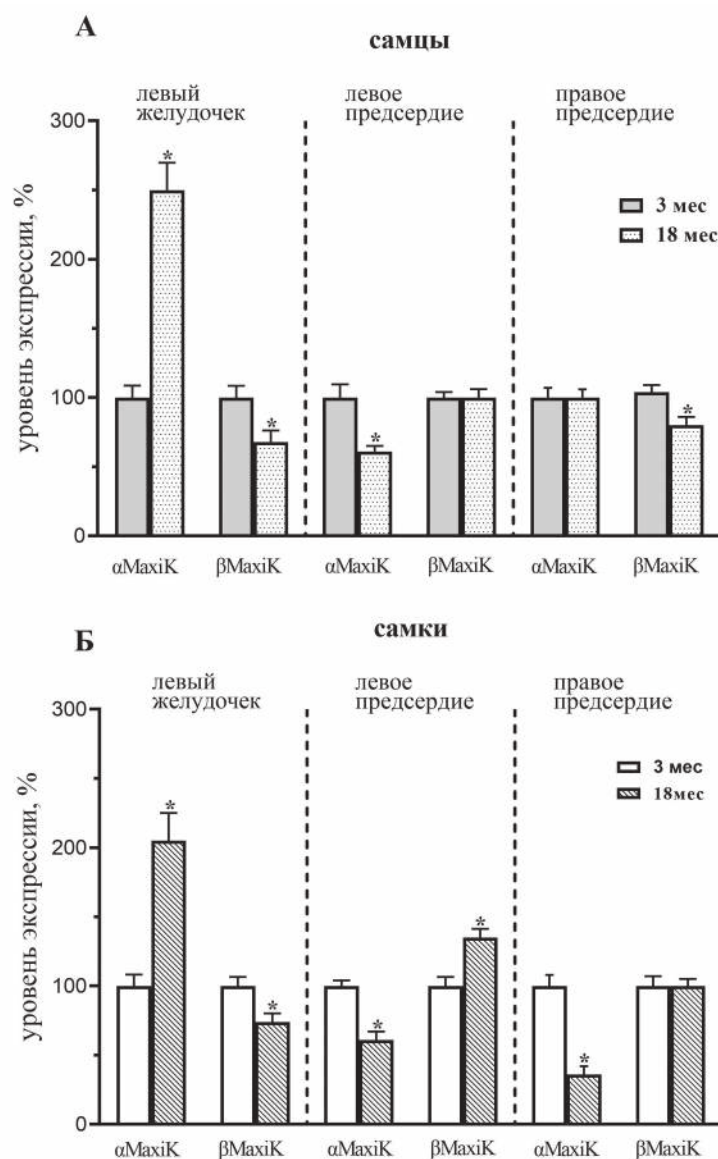


**Рис. 2.** Возрастные изменения уровней мРНК порообразующей (*Kcnma1*) и регуляторной (*Kcnmb4*) субъединиц MaxiK каналов в сосудах самцов и самок крыс. Здесь и далее значения экспрессии для каждого исследуемого гена нормировали на значение экспрессии референсного гена –  $\beta$ -актина в том же образце ткани. Содержание мРНК каждого исследуемого гена выражено в процентах от среднего значения того же гена в группе молодых крыс самцов или самок, принятого за 100%. \* –  $p < 0.01$  по сравнению с крысами в возрасте 3 мес.

**Fig. 2.** Age-related changes in the levels of mRNA of pore-forming (*Kcnma1*) and regulatory (*Kcnmb4*) subunits of the MaxiK channel in the vessels of male and female rats. Here and further, the expression values for each studied gene were normalized to the expression value of the reference gene –  $\beta$ -actin in the same tissue sample. The mRNA content of each studied gene is expressed as a percentage of the average value of the same gene in a group of young male or female rats, taken as 100%. \* –  $p < 0.01$  compared to rats aged 3 months.

тельной обратной связи в ответ на действие вазоконстрикторов, реализуемый MaxiK каналами в сосудах молодых животных. Возрастное угнетение данного механизма в сосудах может быть одним из факторов риска развития артериальной гипертензии. Можно предположить, что активация MaxiK каналов при гипертензии у лиц пожилого возраста с помощью фармакологических средств будет способствовать нормализации артериального давления.

С возрастом повышается уязвимость миокарда к воздействию неблагоприятных факторов, что приводит к нарушению функции кардиомиоцитов. Функциональное разнообразие MaxiK каналов, благодаря большому количеству сплайс-вариантов и множеству комбинаций, направлено на обеспечение нужд клеток, в которых они экспрессируются. MaxiK каналы во взрослых кардиомиоцитах располагаются не в плазматической мембране, а во внутренней ми-



**Рис. 3.** Влияние возраста на уровень мРНК генов порообразующей (*Kcna1*) и регуляторной (*Kcnmb4*) субъединиц MaxiK канала в левом желудочке и предсердиях крыс самцов и самок.

**Fig. 3.** The influence of age on the mRNA level of the pore-forming (*Kcna1*) and regulatory (*Kcnmb4*) subunits of the MaxiK channelsubunits in the left ventricle and atria of male and female rats.

тохондриальной мембране [2]. Митохондриальный канал (mitoMaxiK) представляет собой сплайсинговый вариант канала плазматической мембраны [18]. Активность mitoMaxiK каналов увеличивает проводимость  $K^+$  и улучшает дыхательную функцию митохондрий. Открытие mitoMaxiK приводит к снижению продукции активных форм кислорода и чрезмерной концентрации внутримитохондриального  $Ca^{2+}$ , играя важную роль в защите сердца от повреждающего действия ишемии/реперфузии. Ранее было показано, что активация mitoMaxiK с помощью фармакологических средств оказывает кардиопротекторное действие при ишемическом/реперфузионном повреждении, как у молодых, так и возрастных крыс [12, 13]. Полагают, что фармакологическое воздействие на MaxiK каналы до или после ишемии миокарда является перспективной терапевтической стратегией для защиты стареющего сердца от ишемического и реперфузионного повреждения.

В последние годы накапливается все больше данных о причастности сердечных MaxiK к развитию аритмий [8, 14]. Нами установлено, что в стареющем сердце крыс наиболее глубокие нарушения отмечены в левом желудочке, которые проявлялись в значительном росте экспрессии генов порообразующей  $\alpha$  (*Kcnma1*) и снижении регуляторной  $\beta$  (*Kcnmb*) субъединиц MaxiK каналов. Значительное преобладание экспрессии  $\alpha$  субъединицы над  $\beta$  субъединицей свидетельствует о нарушении баланса между субъединицами (приблизительно 3:1 судя по уровню их мРНК), вследствие чего могут изменяться физико-химические характеристики и функциональная активность каналов.

Показано, что ингибиторы MaxiK каналов значительно снижают частоту сердечных сокращений у мышей дикого типа, но не влияют на сердечный ритм мышей с нокаутом *Kcnma1*(-/-) канала [19, 20]. В то время как у мышей с нокаутом *b1* и *b1/b4* субъединиц (*Kcnmb12/2* и *Kcnmb1b42/2* соответственно) блокатор MaxiK каналов паксиллин не оказывал влияния на частоту сердечных сокращений. Доказана определяющая роль  $\alpha$  субъединицы MaxiK канала в регуляции сердечного ритма [19]. С учетом данных литературы можно предложить, что значительное увеличение экспрессии гена порообразующей  $\alpha$  субъединицы (*Kcnma1*) MaxiK в левом желудочке возрастных крыс обоего пола является фактором риска возникновения в старости желудочковых аритмий в результате нарушения проведения волн возбуждения по сократительным кардиомиоцитам.

Только у старых самцов в правом предсердии, как и в левом желудочке, уменьшается экспрессия гена  $\beta$

субъединицы и изменяется соотношение между порообразующими и регуляторными белками с преобладанием  $\alpha$  субъединицы, что также может приводить к изменению активности MaxiK канала. В стенке правого предсердия расположен синоатриальный узел, в котором выявлен наибольший уровень экспрессии  $\alpha$  субъединиц канала по сравнению с другими отделами сердца [14]. Показано, что нарушение функции MaxiK в синоатриальном узле может провоцировать развитие предсердных аритмий [14, 20]. Авторы полагают, что MaxiK каналы являются потенциальными терапевтическими мишенями при нарушениях сердечного ритма и сократимости сердца.

Нарушение баланса между субъединицами MaxiK канала отмечено и в левом предсердии крыс, но в отличие от желудочков и правого предсердия в них наблюдается сдвиг соотношения в сторону преобладания  $\beta$  субъединиц (рис. 3). Аналогичные изменения выявлены и в правом предсердии стареющих самок. Пока не понятно, каким образом они могут повлиять на функциональную активность каналов и отразиться на сократительной функции сердца стареющих крыс. С учетом данных литературы MaxiK каналы можно рассматривать в качестве потенциальных мишеней для модуляции частоты сердечных сокращений и сократимости при ишемических повреждениях в процессе старения.

### Заключение

Наши результаты впервые демонстрируют, что возрастное снижение функциональной активности MaxiK каналов в гладкомышечных клетках аорты может быть одним из механизмов развития гиперчувствительности к действию эндогенных вазоконстрикторов. В частности, в магистральных сосудах стареющих крыс обоего пола утрачивается защитный механизм отрицательной обратной связи, реализуемый MaxiK-каналами в сосудах молодых животных. В левом желудочке стареющего сердца выявлены высокий уровень экспрессии гена  $\alpha$  субъединицы и низкий  $\beta$  субъединицы MaxiK канала, что приводит к значительному сдвигу соотношения между уровнями экспрессии  $\alpha$  и  $\beta$  субъединиц в сторону порообразующей субъединицы. Преобладание  $\alpha$  субъединицы выявлено и в правом предсердии старых самцов. Выявленные изменения могут негативно влиять на сердечный ритм стареющего сердца и выступать в качестве предикторов развития желудочковых и предсердных аритмий. Стоит отметить, что в старости у крыс самцов большая степень риска возникновения предсердных аритмий, чем у самок. Полученные данные



позволяют предположить, что MaxiK каналы могут быть терапевтической мишенью для модуляции возраст-ассоциированных нарушений регуляции тонуса сосудов и частоты сердечных сокращений.

### Литература

#### (п.п. 1-3; 5-14; 16-20 см. References)

4. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф. Патологическая роль кальций- и потенциалзависимых калиевых каналов большой проводимости (BKCa) и каналов внутреннего выпрямления (Kir) в регуляции сердечно-сосудистой системы. *Патогенез*. 2023; 21(1): 4-15. <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2023.01.4-15>
15. Кожевникова Л.М., Суханова И.Ф., Цорин И.Б., Вититнова М.Б., Крыжановский С.А. Изменения экспрессии генов серотониновых 5HT2A-R и эндотелиновых ETA-R рецепторов как маркеры раннего старения аорты крысы. *Патогенез*. 2018; 16(3): 94-7. <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2018.03.94-97>

### References

1. Thijssen D.H., Carter S.E., Green D.J. Arterial structure and function in vascular ageing: are you as old as your arteries? *J Physiol*. 2016; 594(8): 2275-84. doi: 10.1113/JP270597
2. Balderas E., Zhang J., Stefani E., Toro L. Mitochondrial BKCa channel. *Front Physiol*. 2015; 6: 104. doi: 10.3389/fphys.2015.00104 eCollection 2015
3. Tykocki N.R., Boerman E.M., Jackson W.F. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol*. 2017; 7(2): 485-581. doi: 10.1002/cphy.c160011
5. Shi L., Liu B., Zhang Y., Xue Z., Liu Y., Chen Y. Exercise training reverses unparallel downregulation of MaxiK channel  $\alpha$ - and  $\beta$ 1-subunit to enhance vascular function in aging mesenteric arteries. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014; 69(12): 1462-73. doi: 10.1093/gerona/glt205
6. Dopico A.M., Bukiya A.N., Jaggar J.H. Calcium- and voltage-gated BK channels in vascular smooth muscle. *Pflugers Arch*. 2018; 470(9): 1271-89. doi: 10.1007/s00424-018-2151-y
7. Sancho M., Kyle B.D. The Large-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channel: A Big Key Regulator of Cell Physiology. *Front Physiol*. 2021; 12: 750615. doi: 10.3389/fphys.2021.750615 eCollection 2021
8. Patel N.H., Johannesen J., Shah K., Goswami S.K., Patel N.J., Ponnalagu D., et al. Inhibition of BKCa negatively alters

- cardiovascular function. *Physiol Rep*. 2018; 6(12): e13748. doi: 10.14814/phy2.13748
9. Guntur D., Olschewski H., Enyedi P., Csáki R., Olschewski A., Nagaraj C. Revisiting the Large-Conductance Calcium-Activated Potassium (BKCa) Channels in the Pulmonary Circulation. *Biomolecules*. 2021; 11(11): 1629. doi: 10.3390/biom11111629
10. Mazzaro L., Almasi S.J., Shandas R., Seals D.R., Gates P.E. Aortic input impedance increases with age in healthy men and women. *Hypertension*. 2005; 45(6): 1101-6. doi: 10.1161/01.HYP.0000164579.73656.c4. Epub 2005 May 2
11. Sheydina A., Riordon D.R., Boheler K.R. Molecular mechanisms of cardiomyocyte aging. *Clin Sci (Lond)*. 2011; 121(8): 315-29. doi: 10.1042/CS20110115
12. Heinen A., Ströthoff M., Schmidt A., Stracke N., Behmenburg F., Bauer I., et al. Pharmacological options to protect the aged heart from ischemia and reperfusion injury by targeting the PKA-BK(Ca) signaling pathway. *Exp Gerontol*. 2014; 56: 99-105. doi: 10.1016/j.exger.2014.03.029
13. Testai L., Da Pozzo E., Piano I., Pistelli L., Gargini C., Breschi M.C., et al. The Citrus Flavanone Naringenin Produces Cardioprotective Effects in Hearts from 1 Year Old Rat, through Activation of mitoBK Channels. *Front Pharmacol*. 2017; 8: 71. doi: 10.3389/fphar.2017.00071. eCollection 2017
14. Pineda S., Nikolova-Krstevski V., Leimena C., Atkinson A. J., Altekoester A., Cox C. D., et al. Conserved Role of the Large Conductance Calcium-Activated Potassium Channel, KCa1.1, in Sinus Node Function and Arrhythmia Risk. *Circ Genom Precis Med*. 2021; 14(2): e003144. doi: 10.1161/CIRCGEN.120.003144
16. Toro L., Wallner M., Meera P., Tanaka Y. Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News Physiol Sci*. 1998; 112-7. doi: 10.1152/physiologyonline.1998.13.3.112
17. Davies K.P., Stanevsky Y., Tar M.T., Chang J.S., Chance M.R., Melman A. Ageing causes cytoplasmic retention of MaxiK channels in rat corporal smooth muscle cells. *Int J Impot Res*. 2007; 19(4): 371-7. doi: 10.1038/sj.ijir.3901541
18. González-Cota A.L., Santana-Calvo C., Servín-Vences R., Orta G., Balderas E. Regulatory mechanisms of mitochondrial BKCa channels. *Channels (Austin)*. 2021; 15(1): 424-37. doi: 10.1080/19336950.2021.1919463
19. Imlach W.L., Finch S.C., Miller J.H., Meredith A.L., Dalziel J.E. A role for BK channels in heart rate regulation in rodents. *PLoS One*. 2010; 5(1): e8698. doi: 10.1371/journal.pone.0008698
20. Lai M.H., Wu Y., Gao Z., Anderson M.E., Dalziel J.E., Meredith A.L. BK channels regulate sinoatrial node firing rate and cardiac pacing in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014; 307(9): H1327-38. doi: 10.1152/ajpheart.00354.2014

### Сведения об авторах:

**Кожевникова Любовь Михайловна**, доктор мед. наук, гл. науч. сотр., лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП;

**Суханова Ирина Федоровна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., лаб. хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ НИИОПП.