

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ
АКТИВНОСТИ $K_{AT\Phi}$ -КАНАЛОВ ПИАЛЬНЫХ АРТЕРИЙ
ПОСЛЕ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ С ПОМОЩЬЮ КЛЕТочНОЙ ТЕРАПИИ**

© 2023 г. И. Б. Соколова¹, *, О. П. Горшкова¹

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

**E-mail: SokolovaIB@infran.ru*

Поступила в редакцию 22.09.2022 г.

После доработки 28.03.2023 г.

Принята к публикации 28.03.2023 г.

Цель работы – выяснить эффективность внутривенной трансплантации мезенхимных стволовых клеток человека (МСКч), проведенной на 7-е сут после ишемии/реперфузии (И/Р) головного мозга, для восстановления функциональной активности $K_{AT\Phi}$ -каналов церебральных артерий. С помощью установки для прижизненной визуализации пиальных сосудов исследовали реакцию артерий на воздействие блокатора $K_{AT\Phi}$ -каналов глибенкламида (GB), активатора этих же каналов пинацидила (PI), ацетилхолина (ACh), и ACh на фоне действия GB (ACh/GB) через 14 и 21 сут после И/Р головного мозга (12-минутная окклюзия обеих сонных артерий с управляемой гипотензией) и внутривенной трансплантации МСКч, проведенной на 7-е сут после ишемического воздействия. Установлено, что на 14-е сут после И/Р число сузившихся артерий на GB уменьшилось в 1.5–1.8 раза по сравнению с ложнооперированными крысами. К 21-м сут после И/Р констрикторная реакция полностью восстановилась кроме артерий диаметром более 40 мкм. В группе клеточной терапии констрикторная реакция на GB была полностью восстановлена до уровня ложнооперированных крыс у артерий диаметром менее 40 мкм уже к 14-м сут после И/Р; у более крупных сосудов не восстановилась до 21-х сут. Число дилатаций на ACh/GB по сравнению с чистым ACh у ложнооперированных крыс понижено в 1.6–1.8 раза на 14-е сут и в 1.6–6.6 раза на 21-е сут. У И/Р животных на 14-е сут число дилатаций на ACh/GB по сравнению с чистым ACh статистически значимо повышено у артерий диаметром более 20 мкм в 1.5–1.7 раза, а через 21 сут у артерий диаметром более 40 мкм в 1.2 раза. После введения МСКч GB блокировал ACh-опосредованную дилатацию у артерий диаметром менее 40 мкм и на 14-е, и на 21-е сут после И/Р. У сосудов диаметром более 40 мкм функциональная активность $K_{AT\Phi}$ -каналов не восстановилась до 21 сут. Делается заключение, что И/Р коры головного мозга крыс снижает вклад $K_{AT\Phi}$ -каналов в поддержание базального тонуса пиальных артерий и практически полностью выключает данные каналы из формирования ACh-опосредованной дилатации на протяжении 21 сут постишемического периода. Внутривенная трансплантация МСКч, проведенная на 7-е сут после И/Р, приводит к восстановлению участия $K_{AT\Phi}$ -каналов гладкомышечных клеток в поддержании базального тонуса и осуществлении ACh-опосредованной дилатации пиальных артерий диаметром менее 40 мкм уже через 14 сут после перенесенной И/Р.

Ключевые слова: ишемия/реперфузия, головной мозг, пиальные артерии, внутривенная трансплантация, мезенхимные стволовые клетки, $K_{AT\Phi}$ -каналы

DOI: 10.31857/S0869813923050114, **EDN:** XRSONB

ВВЕДЕНИЕ

Ишемия/реперфузия (И/Р) головного мозга приводит к развитию эндотелиальной дисфункции в церебральных артериях [1] и ухудшению эндотелий-зависимой вазодилатации [2]. Один из основных каскадов эндотелий-зависимой вазодилатации: NO (оксид азота) → cGMP (циклический гуанозин монофосфат) → протеинкиназа G (PKG). PKG активирует кальций-активируемые калиевые каналы и $K_{ATФ}$ -каналы, что приводит к гиперполяризации гладкомышечных клеток, их расслаблению и дилатации артерий [3]. Ухудшение способности церебральных артерий к расширению может быть вызвано повреждением $K_{ATФ}$ -каналов, экспрессируемых как в сосудистых эндотелиальных, так и гладкомышечных клетках [4, 5]. В последние годы $K_{ATФ}$ -каналы рассматриваются в качестве мишеней терапевтического воздействия, направленного на сохранение нейронов и кардиомиоцитов после И/Р [6, 7]. Восстановление функциональной активности $K_{ATФ}$ -каналов церебральных сосудов после ишемического повреждения с помощью клеточной терапии – мало разработанный, но очень перспективный метод. В многочисленных работах было доказано, что трансплантация мезенхимных стволовых клеток (МСК) подавляет тканевое воспаление [8, 9], окислительный стресс [10, 11] после И/Р головного мозга, активирует ангиогенез в ишемизированной ткани и оказывает протекторное воздействие на мозговые структуры [12, 13]. Применительно к практическому использованию клеточной терапии нужно разработать методики трансплантации, удаленные от события транзиторной ишемии или другого повреждения головного мозга, для того чтобы подготовить клеточный материал. Процедура разморозки МСК, помещенных заранее на хранение в криобанк, и наращивания определенной клеточной массы требует не менее 7 сут [14]. В литературе имеются данные о повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера в течение первых 7 сут после И/Р [15], что в этот отрезок постшемического периода позволяет МСК после венозной трансплантации мигрировать в головной мозг [16].

Цель исследования – выяснить эффективность внутривенного введения мезенхимных стволовых клеток человека (МСКч), проведенного на 7-е сут после И/Р, для восстановления функциональной активности $K_{ATФ}$ -каналов церебральных артерий.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена на животных из ЦКП “Биоколлекция Института физиологии им. И.П. Павлова РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем” (Санкт-Петербург).

Животные. Эксперименты проведены на крысах-самцах Wistar ($n = 68$). Животные содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище.

Ишемия/реперфузия. Для воспроизведения глобальной ишемии мозга использовали технику окклюзии двух сосудов с управляемой гипотензией, известную в англоязычной литературе как “2-vessel occlusion + hypotension model”, с авторскими модификациями [17]. У наркотизированных хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 43 мг/100 г массы тела) крыс производили пережатие обеих сонных артерий на 12 мин с одновременной управляемой гипотензией (снижение и строгое поддержание артериального давления (АД) на уровне 45 ± 2 мм рт. ст. путем забора/реинфузии крови в гепаринизированный шприц). Прямое измерение среднего АД производили через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к компьютеру, работающему с оригинальной программой визуализации значений АД, разра-

Таблица 1. Группы экспериментальных животных

Группа	Воздействие	14-е сутки после И/Р		21-е сутки после И/Р	
		масса (г)	АД (мм рт. ст.)	масса (г)	АД (мм рт. ст.)
1	Ложнооперированные крысы (n = 19)	303 ± 13	133 ± 5	330 ± 12	135 ± 2
2	Крысы после И/Р (n = 17)	256 ± 5	133 ± 5	318 ± 4	124 ± 4
3	Крысы после И/Р и трансплантации МСКч (n = 20)	340 ± 4	128 ± 4	337 ± 8	132 ± 3

ботанной в нашей лаборатории. Расчет среднего АД в реальном времени производился программой по классической формуле:

$$P_{\text{ср}} = P_{\text{д}} + 1/3 (P_{\text{с}} - P_{\text{д}}),$$

где $P_{\text{ср}}$ – среднее артериальное давление (мм рт. ст.), $P_{\text{с}}$ – систолическое давление (мм рт. ст.), $P_{\text{д}}$ – диастолическое давление (мм рт. ст.).

По окончании периода ишемии производили полную реинфузию забранной крови. После ушивания операционных ран и выхода из наркоза (на подогреваемых столиках) животных возвращали в клетки обычного содержания.

МСК и их трансплантация. Для внутривенной трансплантации использовали МСК человека, полученные от одного донора. Выделение МСК из костного мозга, их культивирование и фенотипирование проводили в ООО “Транс-Технологии” по стандартным, общепринятым методикам с минимальными изменениями [18]. В частности, для культивирования МСКч использовали питательную среду α -MEM (Nucleon, Новая Зеландия), с добавлением 20% сыворотки крови эмбрионов коров (Gibco, США) и 100 мкг/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco, США). Фенотипирование МСКч проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACSscan (Beckton Dickinson, США). МСКч окрашивали с помощью антител против позитивных маркеров CD90, CD105, CD44, CD73 и антител против негативных маркеров CD45, CD34, CD14, CD11b, HLA-DR и 7AAD (Beckton Dickinson, США). Для трансплантации использовали МСКч на 2–3 пассажах. Внутривенная трансплантация была проведена на 7-е сут после И/Р головного мозга. Каждому животному было введено 5 млн МСКч в 30 мкл культуральной среды.

Все последующие хирургические и экспериментальные действия были проведены на наркотизированных (золетил (20 мг/кг, внутривенно), Virbac, Франция) крысах; эвтаназия проведена путем введения увеличенной дозы золетила.

Группы животных представлены в табл. 1. Группа 1: контрольная группа – ложнооперированные (ЛО) крысы Вистар, которые подвергались оперативному вмешательству, но без проведения И/Р. Исследования функциональной активности $K_{\text{АТФ}}$ -каналов пиальных артерий у данной и всех последующих групп на отдельных подгруппах животных (острые опыты) были проведены через 14 и 21 сут после хирургического воздействия. Группа 2: крысы Вистар, которым была проведена И/Р головного мозга. Группа 3: крысы Вистар, которым была проведена И/Р головного мозга и на 7-е сут внутривенно введены МСКч.

Визуализация и мониторинг микрососудистой сети. Для проведения прижизненного исследования реакций пиальных артерий в теменной области черепа живот-

ного высверливали отверстие ($S \approx 1 \text{ см}^2$). Твердую мозговую оболочку в пределах отверстия удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (pH 7.4), температура которого составляла 37°C . На протяжении всего эксперимента контролировали среднее АД, показатели которого в течение всего эксперимента оставались примерно на одном уровне. Температуру тела животных в течение всего опыта поддерживали на уровне 38°C . Визуализацию пиальных артерий проводили с помощью оригинальной установки, включающей в себя стереоскопический микроскоп MC-2ZOOM (“Микромед”, Россия), цветную камеру – видеоокуляр для микроскопа DCM-510 (Scoretek, Китай) и персональный компьютер. На статических изображениях с помощью компьютерной программы для цитофотометрии “Photo M” (авторская разработка Черниговского, http://www.t_lambda.chat.ru) измеряли диаметры пиальных артериальных сосудов. В ходе эксперимента у каждого животного было исследовано от 40 до 120 пиальных артерий. Все исследованные пиальные артерии были разбиты на группы: более 40 мкм, 20–40 мкм, менее 20 мкм. Исследования реактивности сосудов были проведены через 14 и 21 сут после И/Р головного мозга. Диаметр артерий фиксировали в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором Кребса и при орошении мозга раствором ацетилхолина (ACh) (10^{-7} M , 8 мин) (Sigma-Aldrich, США), блокатором $K_{\text{ATФ}}$ -каналов раствором глибенкламида (GB) (Glybenclamide, Sigma-Aldrich, 10 мкМ, 10 мин), в растворе диметилсульфоксида (DMSO, Sigma-Aldrich, США) или активатором $K_{\text{ATФ}}$ -каналов раствором пинацидила (Pinacidil monohydrate, Sigma-Aldrich, 200 мкМ, в растворе DMSO, 5 мин). Концентрация DMSO в применяемом растворе глибенкламида (GB) и пинацидила (PI) не превышала 0.1%. Ранее проведенные исследования показали, что DMSO в такой концентрации не оказывает влияния на тонус церебральных артерий [19]. Исследование реакции сосудов на воздействие ACh проводили в отсутствие и на фоне блокады $K_{\text{ATФ}}$ -каналов (предварительное орошение поверхности мозга раствором GB в течение 10 мин с последующим добавлением ACh в раствор блокатора). Фоновую реакцию на воздействие ACh в каждой группе анализировали по всему массиву сосудов и принимали за 100%. Проверка по критерию Краскела–Уоллеса показала отсутствие значимых различий между отдельными животными в фоновых реакциях на воздействие ACh внутри каждой из исследованных групп. Относительно этого уровня оценивали изменение диаметра пиальных артерий при воздействии ACh на фоне блокатора $K_{\text{ATФ}}$ -каналов GB.

О результатах воздействия судили по количеству расширившихся или сузившихся артерий. Изменение числа сосудов, расширившихся/сузившихся в ответ на воздействие, выражали в процентах относительно общего числа исследованных сосудов в группе. Реакцию (ΔD) оценивали как разность между значениями диаметра после (D_2) и до (D_1) воздействия ACh, отнесенную к диаметру сосуда D_1 перед воздействием, %:

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

Считали, что реакция на воздействие отсутствует, если изменения диаметра не превышали $5.0 \pm 0.5\%$. Это значение, как мы предварительно установили, регистрируется в покое в отсутствие каких-либо воздействий. Данные по каждой группе сосудов, полученные на разных животных, усреднялись для отдельной экспериментальной группы крыс и использовались для статистических сравнений.

Статистическая оценка данных. Математическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2003 и программы InStat 3.02 (“GraphPad Software Inc.”, США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Проверка эксперимен-

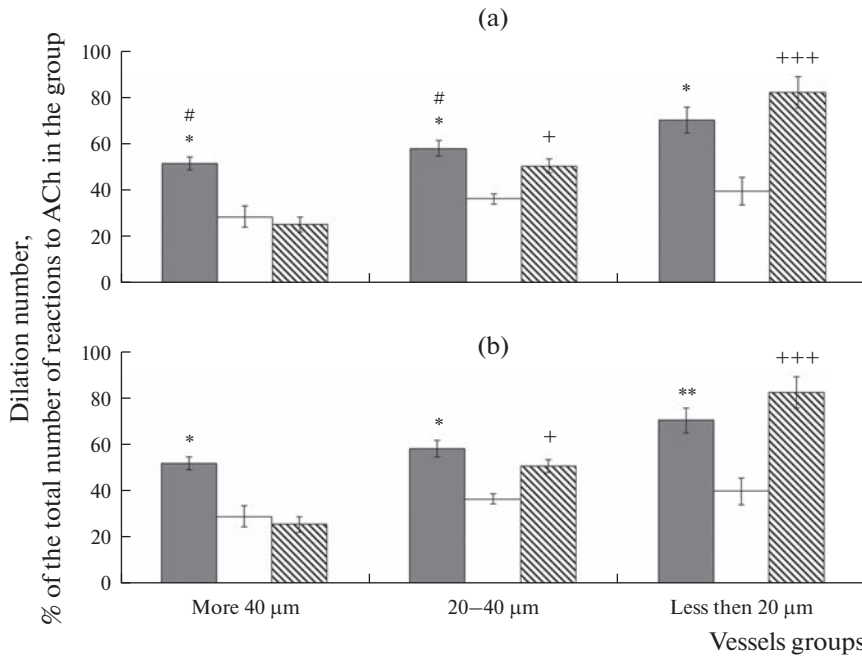


Рис. 1. Дилататорная реакция пияльных артерий различных диаметров на воздействие АСh. (а) – 14-е сут после И/Р, (б) – 21-е сут после И/Р. Темная заливка – ЛО крысы, светлая заливка – крысы, перенесшие И/Р, косая штриховка – крысы, перенесшие ишемию, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч. По горизонтали – группы сосудов, по вертикали – число сосудов, расширившихся в ответ на воздействие АСh, % от общего числа реакций на АСh в группе. * – изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у животных, перенесших И/Р; # – изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс после И/Р, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч; + – изменения значимы у крыс после И/Р, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч по сравнению с соответствующими значениями у крыс после И/Р без клеточной терапии (*, #, + $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$, критерий Тьюки).

тальных данных на нормальное распределение проведена с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок при нормальном характере распределения вариантов в совокупности данных (выборке) рассчитывали при помощи дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. При распределении вариантов в выборке, отличном от нормального, при сравнении групп применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением групп согласно U -критерию Манна–Уитни. Достоверным уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ культуры МСКч методом проточной цитофлуориметрии показал, что она состояла на 99.7% из CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD44⁺-клеток (собственно МСК), на 0.3% CD45⁺, CD34⁺-клеток (клетки гемопоэтического ряда) и на 0.5% из CD14⁺, CD11b⁺, HLA-DR⁺. 7AAD⁺-клеток (нежизнеспособных) было не более 0.9–1%.

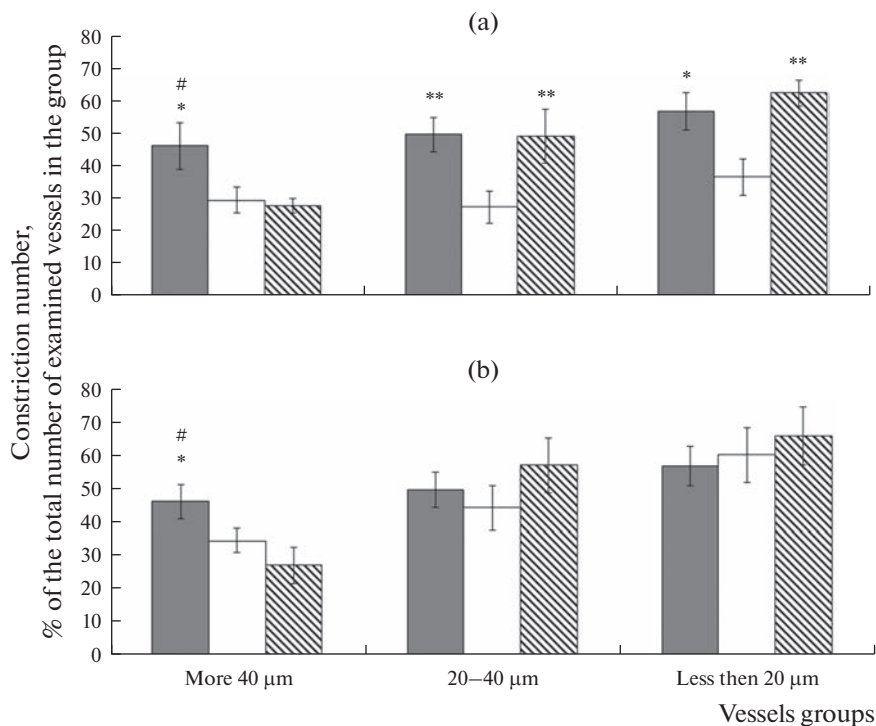


Рис. 2. Число пиальных артерий, ответивших констрикцией на воздействие глибенкламида. (а) – 14-е сут после И/Р, (б) – 21-е сут после И/Р. Темная заливка – ЛО крысы, светлая заливка – крысы, перенесшие И/Р, косая штриховка – крысы, перенесшие ишемию, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч. По горизонтали – группы сосудов, по вертикали – число сосудов, сузившихся в ответ на воздействие GB, % от общего числа реакций на GB в группе. * – изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у животных, перенесших И/Р; # – изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс после И/Р, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч (*, # $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, критерий Тьюки).

На рис. 1 представлена дилататорная реакция пиальных артерий в ответ на воздействие ACh. Через 14 сут после И/Р (группа № 2) число расширившихся на ACh артерий всех исследованных диаметров было в среднем в 1.8 раза меньше, чем у ЛО (рис. 1а). В группе № 3 (введение МСКч на 7-е сут после И/Р) через 14 сут после И/Р число ACh-опосредованных дилатаций артерий диаметром более 20 мкм было в 1.2–1.5 раза меньше, чем в группе ЛО. У артерий диаметром менее 20 мкм число дилатаций достоверно не отличалось от такового у ЛО. По сравнению с группой № 2 у артерий диаметром 20–40 мкм число дилатаций было в 1.4 раза больше. Через 21 сут в группе № 2 число вызванных ACh дилатаций было меньше в 1.2–1.8 раза по сравнению с ЛО крысами (рис. 1б). В группе № 3 дилататорная реакция на ACh пиальных артерий всех исследованных диаметров не отличалась от реакций у ЛО животных (рис. 1б).

Констрикторная реакция пиальных артерий разного диаметра на воздействие глибенкламидом (GB) представлена на рис. 2. У ЛО животных на действие GB уменьшением диаметра ответило $57.3 \pm 6.4\%$ мелких артерий и около 46% пиальных артерий диаметром более 20 мкм. В этой группе не было выявлено статистически значимой

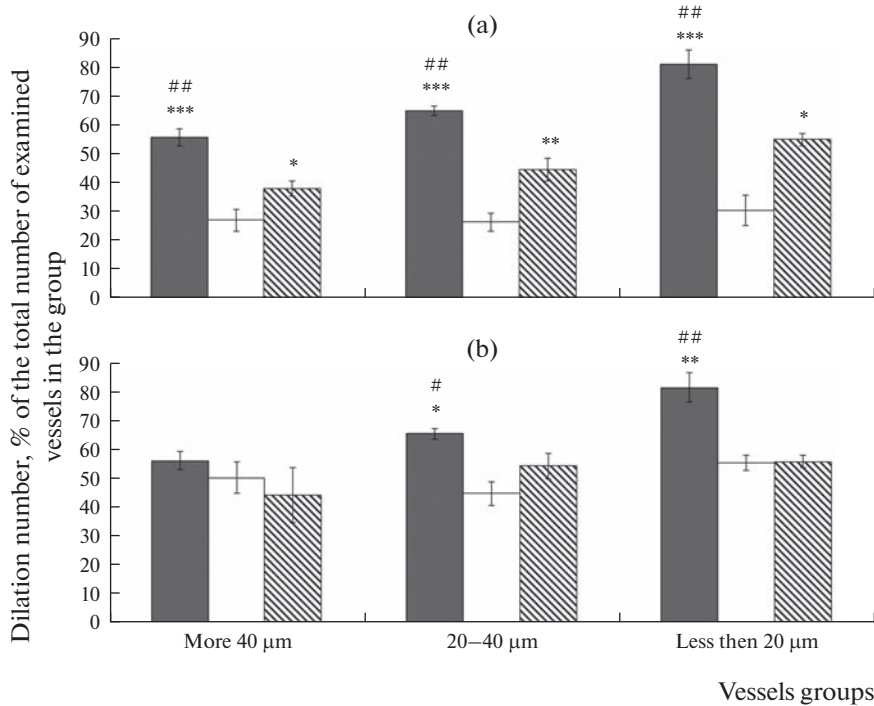


Рис. 3. Число пиальных артерий, ответивших дилатацией на воздействие пинацидила. (а) – 14 сут после И/Р, (б) – 21 сут после И/Р. Темная заливка – ЛО крысы, светлая заливка – крысы, перенесшие И/Р, косая штриховка – крысы, перенесшие ишемию, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч. По горизонтали – группы сосудов, по вертикали – число сосудов, расширившихся в ответ на воздействие PI, % от общего числа реакций на PI в группе. * – изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у животных, перенесших И/Р; # – изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у крыс после И/Р, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч (*, # $p < 0.05$, **, ## $p < 0.01$, ***, ### $p < 0.001$, U-критерий Манна–Уитни).

разницы в реактивности пиальных артерий внутри одного калибра (более 40 мкм, 20–40 мкм, менее 20 мкм) на разных сроках послеоперационного периода, поэтому для сравнения с другими экспериментальными группами представлены усредненные данные по всем результатам в течение эксперимента с 14-ти до 21-х сут.

Через 14 сут после И/Р у крыс из группы № 2 на воздействие GB сужением ответило в 1.5–1.8 раза меньше пиальных артерий по сравнению с ЛО группой (рис. 2а). В группе № 3 число сузившихся артерий диаметром более 40 мкм было в среднем в 1.7 раза меньше, чем в группе № 1 (т.е. столько же, сколько у крыс из группы № 2); артерии диаметром менее 40 мкм реагировали на GB так же, как сосуды у ЛО животных. Через 21 сут после И/Р у крыс из группы № 2 и 3 число сузившихся артерий диаметром более 40 мкм под влиянием GB было в 1.3–1.6 раза меньше, чем у ЛО крыс. У артерий меньшего диаметра не наблюдали статистически значимой разницы в констрикторной реакции на GB во всех экспериментальных группах (рис. 2б).

Дилататорная реакция пиальных артерий разного диаметра у ЛО крыс на воздействие пинацидила (PI) представлена на рис. 3 в виде усредненных данных по всем результатам в течение эксперимента с 14-ти до 21-х сут (объяснения см. вы-

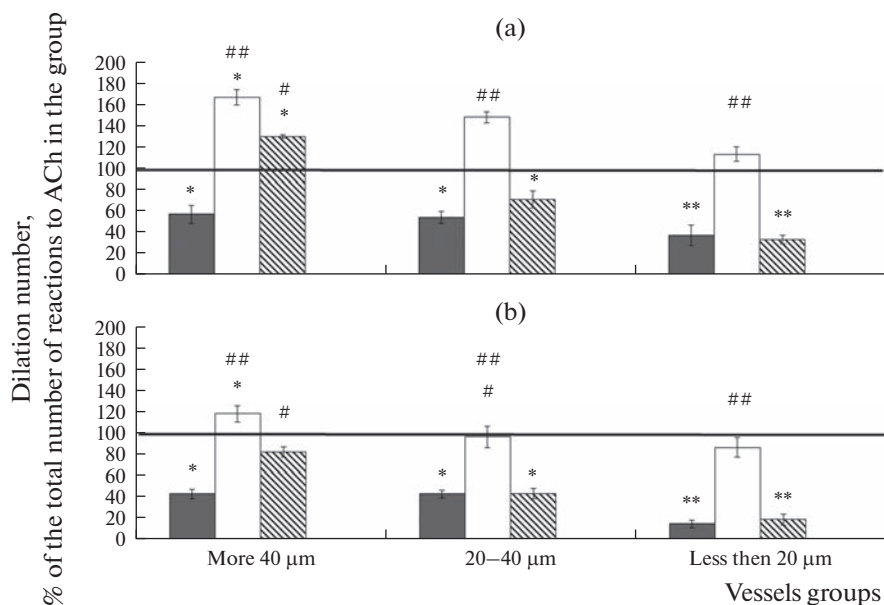


Рис. 4. Число пиальных артерий, ответивших дилатацией на воздействие ацетилхолина на фоне введения глибенкламида. (a) – 14 сут после И/Р, (b) – 21 сут после И/Р. Темная заливка – ЛО крысы, светлая заливка – крысы, перенесшие ишемию, косая штриховка – крысы, перенесшие ишемию, которым на 7-е сут после И/Р была проведена внутривенная трансплантация МСКч. Линия – дилаторная реакция сосудов в группе на введение АСh без применения GB, принятая за 100%. По горизонтали – группы сосудов, по вертикали – число сосудов, расширившихся в ответ на воздействие АСh, % от общего числа реакций на АСh в группе. * – изменения значимы по сравнению с реакцией на АСh без применения GB; # – изменения значимы по сравнению с соответствующими значениями у ЛО крыс (*, # $p < 0.05$, **, ## $p < 0.01$, критерий Тьюки).

ше). На воздействие PI расширением ответило $82 \pm 4.9\%$ пиальных артерий диаметром менее 20 мкм. Число расширившихся артерий более крупных диаметров составило около 60%.

Через 14 сут после И/Р головного мозга у крыс из группы № 2 число дилатаций на PI было в 2–2.6 раза меньше, чем в ЛО группе (рис. 3a). У крыс, которым на 7-е сут после И/Р были введены МСКч, расширением ответило в 1.4–1.5 раз меньше, чем в ЛО группе. При этом число дилатаций было выше, чем у крыс из группы № 2 в 1.4 раза (артерии диаметром более 40 мкм), в 1.7 раза (артерии диаметром 20–40 мкм), в 1.8 раза (артерии диаметром менее 20 мкм). Через 21 сут после И/Р у артерий диаметром более 40 мкм не было выявлено статистически значимой разницы по числу дилатаций на PI во всех экспериментальных группах (рис. 3b). Число расширившихся артерий диаметром 20–40 мкм у крыс из группы № 2 было меньше, чем в группах № 1 и 3 в 1.2–1.5 раза. Число дилатаций у артерий менее 20 мкм группах № 2 и 3 было ниже примерно в 1.5 раза по сравнению с ЛО.

Функциональную активность $K_{ATФ}$ -каналов пиальных артерий оценивали сравнением числа дилаторных реакций на воздействие АСh и АСh на фоне GB (АСh/GB) (рис. 4). У ЛО животных GB подавлял дилаторную реакцию на АСh: на действие АСh/GB расширением ответило в 1.6–1.8 раза меньше пиальных артерий, чем на чистый АСh.

Через 14 сут после И/Р головного мозга у крыс из группы № 2 число расширившихся пиальных артерий с исходным диаметром более 20 мкм на воздействие

ACh/GV было больше, чем на ACh в 1.5–1.7 раза, а у артерий с диаметром менее 20 мкм примерно одинаковым (рис. 4а). У крыс, которым на 7-е сут после И/Р были трансплантированы МСКч, число дилатаций на ACh/GV было больше, чем на чистый ACh у сосудов диаметром более 40 мкм. Число дилатаций на действие ACh/GV у артерий диаметром 20–40 мкм было меньше в 1.4 раза, чем на чистый ACh; у артерий диаметром менее 20 мкм – в 2.9 раза. Через 21 сут после И/Р у крыс из группы № 2 число расширившихся пиальных артерий диаметром более 40 мкм на воздействие ACh/GV было выше, чем на чистый ACh примерно в 1.2 раза; диаметром менее 40 мкм – одинаковым. В группе клеточной терапии артерии диаметром более 40 мкм реагировали одинаково на ACh и ACh/GV. У сосудов меньшего диаметра GV подавлял дилататорную реакцию на ACh в той же степени, что и у ЛО крыс (рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

И/Р приводит к угнетению ACh-опосредованной дилатации пиальных артериальных сосудов, которое сохраняется на протяжении 21-го дня после восстановления кровотока (рис. 1). Развитие сосудистой дисфункции после ишемии и последующей реперфузии может быть связано с нарушением активности ионных каналов. Важным механизмом, обеспечивающим вазодилатацию мозговых сосудов, является активация АТФ-чувствительных калиевых каналов [4]. После И/Р головного мозга усиливается выработка активных форм кислорода и азота, включая супероксид и оксид азота (NO), которые могут быстро реагировать с образованием пероксинитрита (ONOO^-). С одной стороны, пероксинитрит и другие радикалы могут активировать $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналы и кальций-чувствительные калиевые каналы большой проводимости, что, в свою очередь, приводит к гиперполяризации клеточной мембраны, расслаблению гладкомышечных клеток и увеличению диаметра артерий [20]. С другой стороны, они могут окислять и нитрозилировать сульфгидрильные группы в составе молекул $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов и соответственно понижать их функциональную активность [21]. Восстановление функции $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов – одно из основных направлений коррекции церебральной циркуляции после И/Р, поскольку эти каналы играют значимую роль в регуляции базального тонуса и реактивности артерий [22]. Активация $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов приводит к снижению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , гиперполяризации клеточной мембраны, расслаблению гладкомышечных клеток и увеличению диаметра артерий. Напротив, ингибирование $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов сопровождается входом Ca^{2+} в гладкомышечные клетки через кальциевые каналы, высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо, деполяризации мембраны гладкомышечных клеток, уменьшению диаметра артерий и увеличению сосудистого сопротивления [23].

В представленной работе мы показали, что И/Р головного мозга существенно влияет на функциональную активность $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов. Через 14 сут после И/Р уменьшение диаметра в ответ на введение блокатора $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов наблюдается только у 30% пиальных артерий (рис. 2а), тогда как у контрольных животных этот показатель составляет в среднем 60%. Уменьшение числа сузившихся на воздействие GV артерий после И/Р может быть связано со снижением плотности $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов в гладкомышечных клетках. Косвенным доказательством этому может служить тот факт, что применение в наших экспериментах активатора $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналов пинацидила (PI) через 14 сут после И/Р привело к расширению в среднем тоже только 30% пиальных артерий. Эти данные позволяют предположить, что для поддержания базального артериального тонуса на 14-е сут после И/Р практически все $\text{K}_{\text{ATФ}}$ -каналы находятся в активном состоянии, т.е. отсутствует резерв для контроля реактивности артерий при эндогенном/экзогенном воздействии (рис. 3а). Уча-

стие $K_{AT\Phi}$ -каналов в формировании базального сосудистого тонуса пиальных артерий восстанавливается к 21-м суткам после И/Р (исключая самые крупные артерии диаметром более 40 мкм) (рис. 2b). Далее мы продемонстрировали, что внутривенная трансплантация МСКч, проведенная на 7-е сут после И/Р, привела к восстановлению роли $K_{AT\Phi}$ -каналов в поддержании тонуса сосудистой стенки на 14-е сут после И/Р для пиальных артерий диаметром менее 40 мкм (рис. 2a). В более крупных артериях восстановления не произошло. Через 14 сут после ишемического воздействия в ответ на воздействие GB сужалось только около 30% сосудов, так же, как и у животных, перенесших И/Р без клеточной терапии. При этом на воздействие PI расширением ответило в среднем 40–60% пиальных артерий, что подтверждает структурную целостность $K_{AT\Phi}$ -каналов (рис. 3a). К 21-м суткам после И/Р в группе клеточной терапии у пиальных артерий диаметром более 40 мкм участие $K_{AT\Phi}$ -каналов в поддержании базального тонуса сосудистой стенки также не восстановилось (рис. 2b).

После И/Р головного мозга изменяется вклад $K_{AT\Phi}$ -каналов в осуществлении ACh-опосредованной дилатации. У животных из группы № 2 в наших экспериментах блокада $K_{AT\Phi}$ -каналов не уменьшала число дилатаций на ACh ни на 14-е, ни на 21-е сут после И/Р (рис. 4). Через 14 сут после И/Р введение GB увеличивало число ACh-опосредованных дилатаций пиальных артерий всех исследованных диаметров. Мы можем предположить, что после И/Р GB не уменьшает, а, напротив, усиливает калиевый ток, что, вероятно, и является причиной повышения числа дилатаций на ACh/Gb по сравнению с чистым ACh. Увеличение тока катионов K^+ проходит через SUR1-TRPM4-каналы, которых нет в сосудах головного мозга в обычном состоянии, но они активируются при различных патологических состояниях, в частности при гипоксии. В литературе есть данные, что GB препятствует открытию SUR1-TRPM4-каналов, но не влияет на уже открытые каналы [24]. Также причиной извращения дилататорной реакции на ACh на фоне введения GB может быть то, что эффективность блокаторов $K_{AT\Phi}$ -каналов зависит от внутриклеточного уровня Mg-АДФ, который значительно возрастает при ишемии и гипоксии [25]. Через 21 сут после И/Р число дилатаций на ACh на фоне блокады $K_{AT\Phi}$ -каналов достоверно не изменялось (рис. 3), это может свидетельствовать о том, что в этот отрезок постишемического периода $K_{AT\Phi}$ -каналы практически не участвуют в осуществлении ACh-опосредованной дилататорной реакции пиальных артерий. В группе клеточной терапии снижение роли $K_{AT\Phi}$ -каналов в ACh-опосредованной дилатации отмечалось только у артерий диаметром более 40 мкм. У артерий меньшего диаметра уже к 14-м суткам после И/Р блокирование $K_{AT\Phi}$ -каналов снижало ACh-опосредованную дилатацию в той же мере, что и у ЛО крыс. В последние годы показано, что МСК могут предотвращать гибель эндотелиальных клеток, поддерживая функциональную активность сигнальных путей, регулирующих клеточный цикл [26]. В литературе представлены данные о том, что в условиях ишемии в головном мозге может происходить передача неповрежденных митохондрий от трансплантированных МСК в эндотелиальные клетки сосудистой стенки, тем самым улучшая их функционирование [27]. Как известно, митохондриальные $K_{AT\Phi}$ -каналы также участвуют в формировании вазодилататорной реакции [28]. Следовательно, это еще один выявленный механизм влияния МСК на реактивность артериальных сосудов, который вполне может реализоваться в условиях И/Р головного мозга.

Также мы можем предположить, что после трансплантации МСКч, проведенной на 7-е сут после И/Р, в ткани ишемизированной области имела место активация ангиогенеза. Согласно литературным данным, МСК секретируют факторы, способствующие неоваскуляризации ткани: фактор роста фибробластов 2 (FGF-2), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), трансформирующий ростовой фактор

(TGF β), интерлейкины IL-6, IL-8, ангиогенин, фактор роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF BB) [12, 13]. Показано, что после внутривенной трансплантации МСК в ишемизированной тканевой зоне головного мозга наблюдали повышение уровня VEGF и фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α) [29]. HIF-1 α стимулирует в ишемизированной ткани повышение экспрессии генов, обеспечивающих адаптацию клеток к гипоксии, регулирующих сосудистый тонус, клеточную пролиферацию и апоптоз [30]. В литературе представлены экспериментальные данные, показывающие увеличение плотности церебральной сосудистой сети в 1.5–2 раза через 7 сут после введения МСК [27, 31]. В нашей работе с помощью МСКч функция $K_{AT\Phi}$ -каналов быстрее всего восстанавливалась у самых мелких артерий диаметром менее 20 мкм, которые могут быть не нативными, а вновь образованными сосудами. С другой стороны, нельзя исключать и протекторное воздействие МСКч на клетки сосудистой стенки. Как уже говорилось выше, МСК могут уменьшать негативное воздействие воспаления и окислительного стресса непосредственно в стенке сосудов, сохраняя тем самым жизнеспособность эндотелиальных и гладкомышечных клеток [32, 33]. За счет протекторного воздействия МСКч, скорее всего, восстанавливалась функция $K_{AT\Phi}$ -каналов в сосудах диаметром 20–40 мкм.

Итак, внутривенная трансплантация МСКч, проведенная на 7-е сут после И/Р, позволила полностью восстановить участие $K_{AT\Phi}$ -каналов в поддержании базального тонуса и их функциональную активность у пиальных артерий диаметром менее 40 мкм, т.е. именно в том участке церебральной сосудистой сети, который принимает основное участие в кислородном транспорте между кровью и тканью [34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

И/Р коры головного мозга крыс снижает вклад $K_{AT\Phi}$ -каналов в поддержании базального тонуса пиальных артерий и практически полностью выключает данные каналы из формирования АСh-опосредованной дилатации на протяжении 21 сут постиншемического периода. Внутривенная трансплантация МСКч, проведенная на 7-е сут после И/Р, приводит к восстановлению вклада $K_{AT\Phi}$ -каналов ГМК в поддержание базального тонуса и осуществление АСh-опосредованной дилатации пиальных артерий диаметром менее 40 мкм уже через 14 сут после перенесенной И/Р.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования проводили в соответствии с регламентом, установленным МЗСР РФ № 708н от 23.08.10 (“Правила лабораторной практики”), Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, и требованиями Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 09/05 от 05.09.2022 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Источник финансирования – госбюджет. Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0001.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликта интересов относительно публикации этой статьи не существует.

ВКЛАД АВТОРОВ

Планирование эксперимента – И.Б.С., сбор и обработка данных – И.Б.С., О.П.Г., написание и редактирование текста – И.Б.С., О.П.Г.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выносят глубокую благодарность ООО “Транс-Технологии” и лично генеральному директору Д.Г. Полынцеву за предоставление для проведения исследования клеточного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gong S, Ma H, Zheng F, Huang J, Zhang Y, Yu B, Li F, Kou J (2021) Inhibiting YAP in endothelial cells from entering the nucleus attenuates blood-brain barrier damage during ischemia-reperfusion injury. *Front Pharmacol* 26(12): 777680. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.777680>
2. Chen Y-J, Chen C, Li M-Y, Li Q-Q, Zhang X-J, Huang R, Zhu X-W, Bai C-Y, Liu-Yi Zhang, Peng P-H, Yang W-M (2021) Scutellarin reduces cerebral ischemia reperfusion injury involving in vascular endothelium protection and PKG signal. *Nat Prod Bioprospect* 11(6): 659–670. <https://doi.org/10.1007/s13659-021-00322-z>
3. Ferdous A, Jania RA, Arpa RN, Afroze M, Khan M, Moniruzzaman M (2020) The leaves of *Bougainvillea spectabilis* suppressed inflammation and nociception in vivo through the modulation of glutamatergic, cGMP, and ATP-sensitive K⁺ channel pathways. *J Ethnopharmacol* 28(261): 113148. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113148>
4. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF (2017) Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance. *Arteries and Arterioles. Compr Physiol* 7(2): 485–581. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160011>
5. Syed AU, Koide M, Brayden JE, Wellman GC (2019) Tonic regulation of middle meningeal artery diameter by ATP-sensitive potassium channels. *J Cereb Blood Flow Metab* 39(4): 670–679. <https://doi.org/10.1177/0271678X17749392>
6. Ning K, Jiang L, Hu T, Wang X, Liu A, Bao Y (2020) ATP-sensitive potassium channels mediate the cardioprotective effect of *Panax notoginseng* Saponins against myocardial ischaemia-reperfusion injury and inflammatory reaction. *Biomed Res Int* 2020: 3039184. <https://doi.org/10.1155/2020/3039184>
7. Maqoud F, Scala R, Hoxha M, Zappacosta B, Tricarico D (2022) ATP-sensitive potassium channel subunits in neuroinflammation: novel drug targets in neurodegenerative disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 21(2): 130–149. <https://doi.org/10.2174/1871527320666210119095626>
8. Shi Y, Wang Y, Li Q, Liu K, Hou J, Shao C, Ying Wang Y (2018) Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol* 14(8): 493–507. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0023-5>
9. Lin Q-M, Tang X-H, Lin S-R, Chen B-D, Feng Chen F (2020) Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation attenuates overexpression of inflammatory mediators in rat brain after cardiopulmonary resuscitation. *Neural Regen Res* 15(2): 324–331. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.265563>
10. Liu Y, Zhao Y, Min Y, Guo K, Chen Y, Huang Z, Long C (2022) Effects and mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of ischemic stroke in hypertensive rats. *Int J Stem Cells* 15(2): 217–226. <https://doi.org/10.15283/ijsc21136>
11. Xiao X, Xu M, Yu H, Wang L, Li X, Rak J, Wang S, Zhao RC (2021) Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles mitigate oxidative stress-induced senescence in endothelial cells via regulation of miR-146a/Src. *Signal Transduct Target Ther* 6(1): 54. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00765-3>
12. Sheikh A, Yano S, Mitaki S, Haque MDA, Yamaguchi S, Nagai A (2019) A mesenchymal stem cells line (B10) increases angiogenesis in rat MCAO model. *Exp Neurol* 311: 182. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.10.001>
13. Dong H-J, Peng D, Luo Y, Liu R, Yin H-J, Lei Wang L, Hong Sha H, Meng H-P, Ping W, Shang C (2022) The hope for Pandora's Box: mesenchymal stem cells for promoting angiogenesis in stroke and traumatic brain injury. *Signal Transduct Target Ther* 6(1): 354. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00765-3>
14. Egger D, Lavrentieva A, Kugelmeier P, Cornelia Kasper C (2021) Physiologic isolation and expansion of human mesenchymal stem/stromal cells for manufacturing of cell-based therapy products. *Eng Life Sci* 22(3–4): 361–372. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100097>

15. *Kangussu LM, Almeida-Santos AF, Fernandes L, Alenina N, Bader M, Santos R, Massensini A, Campagnole-Santos J* (2023) Transgenic rat with overproduction of ubiquitous angiotensin-(1–7) presents neuroprotection in a model of ischemia and reperfusion. *Brain Res Bull* 192: 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.11.017>
16. *Lee SH, Choung JS, Kim JM, Kim H, Kim MY* (2023) Distribution of embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells after intravenous infusion in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Life (Basel)* 13(1): 227. <https://doi.org/10.3390/life13010227>
17. *Lensman M, Korzhhevskii DE, Mourouets VO, Kostkin VB, Izvarina N, Perasso L, Gandolfo C, Otellin VA, Polenov SA, Balestrino M* (2006). Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 1114(1): 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.06.103>
18. *Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V* (2018) Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells expand. *Cytometry A* 93(1): 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>
19. *Soltani N, Mohammadi E, Allahtavakoli M, Shamsizadeh A, Roohbakhsh A, Haghparsat A* (2016) Effects of dimethyl sulfoxid on neuronal response characteristics in deep layers of rat barrel cortex. *Basic Clin Neurosci* 7(3): 213–220. <https://doi.org/10.15412/J.BCN.03070306>
20. *Sancho M, Fletcher J, Welsh DG* (2022) Inward rectifier potassium channels: membrane lipid-dependent mechanosensitive gates in brain vascular cells. *Front Cardiovasc Med* 9: 869481. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.869481>
21. *Zeidner G, Sadjia R, Reuveny E* (2001) Redox-dependent gating of G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem* 276(38): 35564–35570. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105189200>
22. *Syed AU, Koide M, Brayden JE, Wellman G* (2019) Tonic regulation of middle meningeal artery diameter by ATP-sensitive potassium channels. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 39(4): 670–679. <https://doi.org/10.1177/0271678X17749392>
23. *Jackson WF* (2021) Myogenic tone in peripheral resistance arteries and arterioles: The Pressure Is On! *Front Physiol* 12: 699517. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.699517>
24. *Jha RM, Rani A, Desai SM, Raikwar S, Mihaljevic S, Munoz-Casabella A, Kochanek PM, Catapano J, Winkler E, Citerio G, Hemphill JC, Kimberly WT, Narayan R, Sahuquillo J, Sheth KN, Simard JM* (2021) Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: an updated review. *Int J Mol Sci* 22(21): 11899. <https://doi.org/10.3390/ijms222111899>
25. *Sancho M, Fletcher J, Welsh DG* (2022) Inward rectifier potassium channels: membrane lipid-dependent mechanosensitive gates in brain vascular cells. *Front Cardiovasc Med* 9: 869481. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.869481>
26. *Kang P, Ying C, Chen Y, Ford AL, An H, Lee J-M* (2022) Oxygen metabolic stress and white matter injury in patients with cerebral small vessel disease. *Stroke* 53(5): 1570–1579. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.035674>
27. *Liu K, Guo L, Zhou Z, Pan M, Yan C* (2019) Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke. *Microvasc Res* 123: 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2019.01.001>
28. *Busija DW, Katakam PV* (2014) Mitochondrial mechanisms in cerebral vascular control: shared signaling pathways with preconditioning. *J Vasc Res* 51(3): 175–189. <https://doi.org/10.1159/000360765>
29. *Xu W, Xu R, Li Z, Wang Y, Hu R* (2019) Hypoxia changes chemotaxis behaviour of mesenchymal stem cells via HIF-1 α signaling. *J Cell Mol Med* 23(3): 1899–1907. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14091>
30. *Han Y, Yang J, Fang J, Zhou Y, Candi E, Wang J, Hua D, Shao C, Yufang Shi Y* (2022) The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 7(1): 92. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00932-0>
31. *Guo Y, Peng Y, Zeng H, Gao Chen G* (2021) Progress in mesenchymal stem cell therapy for ischemic stroke. *Stem Cells Int* 2021: 9923566. <https://doi.org/10.1155/2021/9923566>
32. *Gao Y, Chen H, Cang X, Chen H, Di Y, Qi J, Cai H, Luo K, Jin S* (2022) Transplanted hair follicle mesenchymal stem cells alleviated small intestinal ischemia-reperfusion injury via intrinsic and paracrine mechanisms in a rat model. *Front Cell Dev Biol* 10: 1016597. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1016597>
33. *Korkmaz-İcöz S, Zhou P, Guo Y, Loganathan S, Brlecic P, Radovits T, Sayour AA, Ruppert M, Veres G, Karck M, Szabó G* (2021) Mesenchymal stem cell-derived conditioned medium pro-

- fects vascular grafts of brain-dead rats against in vitro ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res Ther* 12(1): 144.
<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02166-3>
34. Liu Y, Chen J, Liang H, Cai Y, Li X, Yan L, Zhou L, Shan L, Wang H (2022) Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells not only ameliorate blood glucose but also protect vascular endothelium from diabetic damage through a paracrine mechanism mediated by MAPK/ERK signaling. *Stem Cell Res Ther* 13(1): 258.
<https://doi.org/10.1186/s13287-022-02927-8>

Recovery of the Functional Activity of K_{ATP} -Channels of Pial Arteries after Ischemia/Reperfusion Using Cell Therapy

I. B. Sokolova^{a, *} and O. P. Gorshkova^a

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

^{*}*e-mail: SokolovaIB@infran.ru*

This study aims to examine the efficiency of intravenous transplantation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) performed 7 days after cerebral ischemia/reperfusion (I/R) for recovery of the functional activity of K_{ATP} -channels of cerebral arteries. Using a device for intravital visualization of pial vessels, the reaction of arteries to the K_{ATP} -channel blocker glibenclamide (GB), the activator of the same channels of pinacidil (PI), acetylcholine (ACh), and ACh against a background of GB action (ACh/GB) 14 and 21 days after I/R and intravenous hMSC transplantation performed 7 days after ischemic exposure. On exposure to GB 14 days after I/R, 1.5–1.8 times fewer arteries narrowed than in the sham-operated (SO) rats. By day 21 after I/R, the constriction reaction was completely restored, except for arteries with a diameter more than 40 μm . In the cell-therapy group, the constrictor response to GB was completely recovered to the level of SO animals in arteries with a diameter less than 40 μm by 14 day after I/R exposure; in arteries with a diameter of more than 40 μm , the constriction reaction did not recover until 21 days. The number of dilations per ACh/GB compared to a clear ACh in SO rats was reduced in 1.6–1.8 times on 14 day after I/R and in 1.6–6.6 after 21 days. In I/R animals on 14 day, the number of dilatations per ACh/GB compared to clear ACh was significantly increased in arteries with a diameter of more than 20 μm by 1.5–1.7 times, and after 21 days in arteries with a diameter of more than 40 μm by 1.2 times. After the introduction of hMSC, GB blocked ACh-mediated dilation in arteries less than 40 μm in diameter both on days 14 and 21 after I/R. In arteries with a diameter of more than 40 μm the functional activity of K_{ATP} -channels did not recover until 21 days. Conclusion. I/R of the rat cerebral cortex reduces the contribution of K_{ATP} -channels to maintaining the basal tone of the pial arteries and almost completely excludes these channels from the formation of ACh-mediated dilation during 21 days of the posts ischemic period. Practically did not participate in the dilatatory response. Intravenous transplantation of hMSC, performed 7 days after I/R, results in restoration of participation of SMC K_{ATP} -channels in maintaining the basal tone and ACh-mediated dilatation of pial arteries with a diameter less than 40 μm already 14 days after I/R.

Keywords: ischemia/reperfusion, brain, pial arteries, intravenous transplantation, mesenchymal stem cells, K_{ATP} -channels