

ОПТИМИЗАЦИЯ КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОГО СОСТАВА ИНКУБАЦИОННОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОЙ И ОБРАТИМОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СРЕЗОВ МОЗГА НЕГИБЕРНИРУЮЩИХ ЖИВОТНЫХ

© 2021 г. А.А. Мокрушин

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Россия, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

E-mail: mok@inbox.ru

Поступила в редакцию 29.10.2020 г.

После доработки 01.12.2020 г.

Принята к публикации 03.12.2020 г.

Обнаружено, что после длительного криосохранения срезов мозга при -10°C активность *N*-метил-*D*-аспаргат-зависимых механизмов (амплитуда *N*-метил-*D*-аспаргат-потенциалов) блокировалась. Для восстановления активности *N*-метил-*D*-аспаргат-зависимых механизмов после криосохранения/отогревания исследовали изменения внеклеточного (pH_o) инкубационного раствора. Обнаружено, что при интервалах pH_o 7.2–7.4 происходило ступенчатое закисление инкубационной среды до pH_o 6.5 ± 0.2 . При этом значении pH_o амплитуда *N*-метил-*D*-аспаргат-потенциалов снижалась до 33%. Изменение инкубационной среды (гибридная буферная система, включающая карбонатный, фосфатный и трис-буфер) до pH_o 7.7 способствовало восстановлению амплитуды *N*-метил-*D*-аспаргат-потенциалов до 84% по сравнению с исходными значениями (до криоконсервации). Таким образом, использование буферной системы с трис(гидроксиэтил)аминометаном, а также увеличение pH_o до 7.7 были наиболее оптимальными условиями для восстановления активности *N*-метил-*D*-аспаргат-зависимых механизмов при отогревании после длительного криосохранения.

Ключевые слова: срезы мозга, НМДА-потенциалы, криосохранение, буферные системы.

DOI: 10.31857/S0006302921050136

Исследование закономерностей и способов обратимого ингибирования жизнедеятельности клеток и органов млекопитающих после их криосохранения при низких температурах представляет особый как теоретический интерес, так и практическое значение для пересадки тканей, органов и создания криобанка трансплантатов [1].

В настоящее время в медицине и ветеринарии применяется низкотемпературное хранение одноклеточных клеток (ооциты, сперматозоиды, клетки крови и др.) с последующим восстановлением их биологических функций после отогревания и использования их в клинических условиях.

В России проблемы низкотемпературного криосохранения активно изучаются в Институте биофизики клетки РАН (Пушино Московской области). Одним из интересных направлений являются исследования под руководством Э.Н. Гаховой на целом мозге моллюска с сохра-

нением клеточной неоднородности и синаптических связей. Исследователи также изучали причины криоповреждения и способы криопротекции нервной ткани моллюска. Для этих целей было протестировано нейропротекторное действие пептида TSKY, выделенного из мозга зимнеспящих животных [2–4]. Несомненным достоинством этих работ являются результаты с использованием метода культуры *in vitro*, было показано, что нейроны, выделенные из оттаянного мозга моллюска, сохраняют способность формировать нейриты и образовывать нейрональные сети, аналогичные тем, что образуют нейроны моллюска, не прошедшие криоконсервацию. Эти данные позволяют изучать криосохранение нервной ткани незимнеспящих млекопитающих для создания криобанка.

Другие перспективные исследования криосохранения возбудимых тканей проводятся в том же институте в лаборатории Е.Е. Фесенко на миокарде крыс и изолированного сердца барана. Однако это направление связано с применением газовой среды, состоящей из смеси газов CO и O_2 , что принципиально отличается от жидких сред

Сокращения: АМПА – α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота, НМДА – *N*-метил-*D*-аспаргат, ЛОТ – латеральный обонятельный тракт, ФП – фокальный потенциал.

криосохранения живых тканей. Для пролонгирования криосохранения миокарда крыс применяются нейропротекторы и антибиотики. Практическим достижением этих исследований является разработка камеры для гипотермического хранения сердца крыс и баранов. Полученные положительные результаты криосохранения миокарда обнадеживают [5].

Что касается длительной криоконсервации нервных тканей незимнеспящих млекопитающих, то надежные протоколы и методы для применения в терапии лечения заболеваний до сих пор детально не разработаны. По всей вероятности, это связано с гетерогенным клеточным составом нервной ткани (нейроны, глиальные клетки, синапсы), а также с отсутствием стандартных протоколов процесса замораживания/отогревания [6–8].

Большое значение в решении этой проблемы, на наш взгляд, имеет выбор экспериментальных моделей для изучения механизмов криосохранения нервной ткани млекопитающих. При разработке методов криоконсервации нервной ткани срезы мозга являются оптимальными экспериментальными объектами. Ранее проведенные нами эксперименты выявили некоторые закономерности влияния физических факторов, таких как скорость и глубина замораживания, на восстановление синаптической активности в срезах мозга [9]. В результате исследований было обнаружено, что при низких скоростях охлаждения срезов обонятельной коры мозга ($0.1-0.125^\circ\text{C}/\text{мин}$) до 16°C активности глутаматергических ионотропных АМПА- (α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота) и НМДА-зависимых (*N*-метил-D-аспартат) механизмов сохранялись [10].

В дальнейших исследованиях была выявлена различная резистентность АМПА и НМДА механизмов на замораживании/отогревании срезов мозга после длительного криосохранения при более глубокой температуре и длительности (-10°C , 30 суток). НМДА-зависимые процессы при этих условиях ингибировались и блокировались тогда, как АМПА механизмы сохранялись, что свидетельствует о значительных криоповреждениях НМДА механизмов [9, 11–13]. Это важно, поскольку НМДА-зависимые механизмы ключевые структуры возбуждающей глутаматергической медиаторной системы. Они являются адаптивными механизмами в мозге, участвуют в обучении, формировании следов памяти, а также при развитии различных нейропатологий (эпилепсия, ишемия, травма и др.) [14–17].

Таким образом, изучение особенностей криоповреждения НМДА-механизмов имеет исключительно важное значение для сохранения активности этих механизмов при криосохранении. Вы-

явленные закономерности модификаций НМДА-зависимых механизмов можно использовать для создания банка трансплантантов.

Традиционно для сохранения функционирования нервных структур используются различные криопротекторы. Однако они проявляют выраженные негативные эффекты на функционирование нейронов и синапсов. По этой причине мы отказались от их использования в настоящей работе.

Для выявления причины криоповреждения НМДА-механизмов были исследованы изменения pH_0 инкубационной среды и было обнаружено снижение pH_0 (закисление) инкубационной среды в процессе отогревания срезов. Была высказана гипотеза, что для уменьшения нарушений функционирования глутаматергических ионотропных НМДА-зависимых механизмов при криоконсервации необходимо оптимизировать характеристики pH_0 инкубационного раствора. Справедливость этого предположения подтверждается результатами исследований, в которых было выявлено, что возбудимость нейронов в нормотермических условиях особенно чувствительна к изменениям внутриклеточного pH (pH_i) и внеклеточного pH (pH_0) [18–23]. Однако в экспериментах на срезах мозга наиболее надежно можно измерять влияние pH_0 на функционирование нейронов и синапсов, в том числе на НМДА-зависимые механизмы.

Экспериментально установлено, что оптимальный диапазон pH_0 инкубационной среды при нормотермических условиях (37°C) для длительного поддержания активностей нервных клеток и синапсов в срезах мозга составляет pH_0 7.2–7.4. При этих условиях активности глутаматергических ионотропных (АМПА и НМДА) механизмов сохранялись в течение 10–12 ч. Отклонения от этих показателей сопровождается нестабильностью активности этих механизмов в срезах мозга [15].

Цель настоящей работы заключалась в изучении эффектов гибридной буферной системы (карбонатный (NaHCO_3), фосфатный (KH_2PO_4) трис(гидроксиметил)аминометан ($\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$) инкубационного раствора на восстановление электрогенеза НМДА-механизмов после длительной криоконсервации. Активности НМДА-механизмов определяли электрофизиологическими методами по величине амплитуд НМДА-потенциалов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на крысах–самцах линии Вистар массой 180–200 г из биокolleкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН («Коллекция лабораторных млекопитающих раз-

ной таксономической принадлежности»), подержанной программой биоресурсных коллекций Минобрнауки России с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенными European Communities Council Direction (86/609 ЕЕС). Опыты с животными проводили в соответствии с Руководством Совета Федерации по уходу и использованию лабораторных животных (1996 г.) и принципами этического кодекса Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (1996 г.).

Исследования проводили на тангенциальных срезах обонятельной коры толщиной 400–500 мкм [24], которые изготавливали из мозга крыс–самцов (29 животных). В результате проведенных исследований было установлено, что предельно допустимая толщина кортикальных срезов крыс при инкубации в атмосфере кислорода составляет в среднем 0.052 см (520 мкм), а при инкубации срезов в атмосфере воздуха и присутствии углекислого газа – 0.22 мм (220 мкм) [24]. Для изготовления срезов использовали станок Емельянова (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН) [24]. Срезы преинкубировали в стеклянных виалах объемом 1 мл в аппарате Варбурга (модель ВА 01 10, Германия) при температуре 37°C с частотой качания 120/мин в течение 2 ч, что имитирует кровообращение в мозге. Инкубационная среда одного и того же состава в виалах со срезами менялась дважды (через 1 ч и 2 ч преинкубации) для устранения поврежденных клеток и их метаболитов.

Для приготовления инкубационных растворов была использована дистиллированная вода, которая хранилась в стеклянном сосуде темного цвета объемом 10 л. Непосредственно перед приготовлением раствора дистиллированную воду пропускали через колонку с ионообменным наполнителем, состоящим из катионита КУ–2–8 и анионита АВ–17–8 («Химреактив», Россия) для дополнительной очистки. Значение кислотности pH_0 7.0 этой воды сохранялось при 25–39°C.

На такой воде были приготовлены инкубационные растворы с буферными системами для предварительной инкубации срезов до замораживания, хранения и последующего отогревания до 37°C.

Искусственная церебральная жидкость для инкубации срезов была следующего состава (в мМ): NaCl – 124.0, KCl – 5.0, CaCl₂ – 2.6, KH₂PO₄ – 1.24, MgSO₄ – 1.2, NaHCO₃ – 3.0, глюкоза – 10.0, трис-HCl – 23.0, pH – 7.2–7.3. Инкубационный раствор в виалах со срезами и газовую атмосферу над раствором насыщали кислородом, углекислый газ не использовался.

После преинкубации срезы поочередно переносили в регистрирующую проточную камеру электрофизиологической установки [13, 15]. В ней активности НМДА-зависимых механизмов

определяли при регистрации этих потенциалов экстраклеточно стеклянными микроэлектродами сопротивлением 1–5 МОм, заполненными 1 М NaCl, в ответ на ортодромные электрические импульсы (прямоугольной формы, длительностью 0.1 мс, интенсивностью 0.1–0.3 мА, частотой 0.003 Гц), генерируемые стимулятором ЭСУ-1 (Россия) латерального обонятельного тракта (ЛОТ). Индифферентный хлорсеребряный электрод находился в инкубационной камере. Для детекции НМДА-потенциалов использовали усилитель («НТО», Россия). Далее потенциалы оцифровывали при помощи аналого-цифрового устройства (Е 20–10, Россия) с частотой квантования 20 кГц и обрабатывали на компьютере с помощью специальной компьютерной программы «Анализ электрической активности нейронов» (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН).

Морфологические особенности обонятельной коры мозга хорошо различимы в световом микроскопе и позволяют стабильно повторять локализации раздражающего электрода в проксимальной части ЛОТ, а регистрирующего – в точке его изгиба. Ранее проведенные исследования продемонстрировали, что в этой точке находится фокус максимальной активности при погружении регистрирующего электрода на глубину 230–270 мкм от пиальной поверхности среза (рис. 1). Параметры электрической стимуляции ЛОТ (частота, интенсивность) для данного среза после криоконсервации были такие же, как и до замораживания.

Идентификацию отдельных компонентов фокального потенциала (ФП), регистрируемого в срезах обонятельной коры, проводили с использованием специфических блокаторов: для НМДА-рецепторов – *D*-2-амино-5-фосфоновалериата; для АМПА-рецепторов – 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-диона, с помощью методов, описанных в работах [15, 25, 26]. Вызванные ФП регистрировались в ответ на стимуляцию ЛОТ в контроле и во время инкубации срезов специфическими антагонистами АМПА- и НМДА-рецепторов. ФП является многокомпонентным потенциалом и состоит из пресинаптического компонента, который отражает активность проводящих волокон ЛОТ, и постсинаптических компонентов, которые отражают активацию глутаматергических ионотропных механизмов – АМПА- и НМДА-потенциалов (рис. 2). Для идентификации НМДА-потенциалов срезы инкубировали с *D*-2-амино-5-фосфоновалериатом (50 мМ). Для предотвращения блокады этих рецепторов ионами Mg²⁺ срезы инкубировали в среде с низкой концентрацией этих ионов (200 мМ) в течение 20 мин. Полученные результаты продемонстрировали редукцию позднего синаптического компонента ФП, что указывает на его активацию НМДА-рецепторами. Для выявления АМПА-

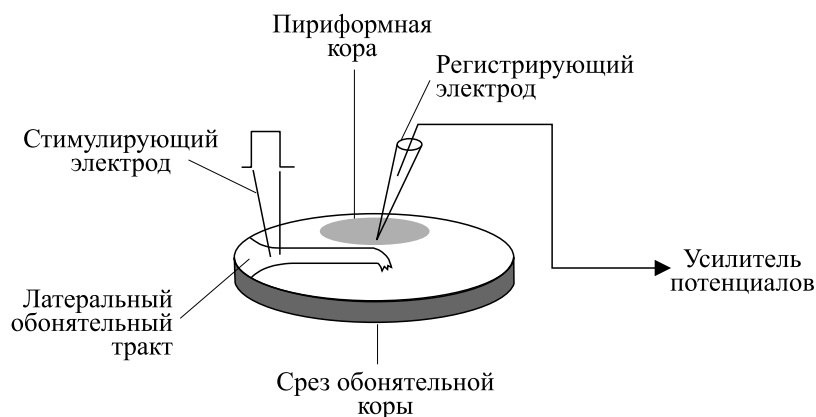


Рис. 1. Схема обонятельной коры среза мозга крысы, вид с пиальной поверхности.

компонента ФП срезы инкубировали с 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-дионом (25 мкМ) в течение 20 мин. Такое воздействие блокировало ранний постсинаптический компонент, а также НМДА-компонент, сохранялся только пресинаптический компонент (рис. 2). Таким образом, проведенная фармакологическая идентификация синаптических компонентов ФП свидетельствует, что ранний АМПА-потенциал отражает активацию АМПА-, а поздний — НМДА-рецепторов (рис. 2). Учитывая проведенные исследования, было выявлено, что максимальная амплитуда НМДА регистрировалась в фиксированной точке (8 мс) от артефакта стимуляции (рис. 2).

Криопротекторы в процессе криосохранения срезов не применялись.

Химические реактивы для приготовления искусственной цереброспинальной жидкости представлены фирмой «Химреактив» (Россия).

Статистическую обработку цифровых данных проводили с использованием непараметрического параметра (*U*-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни). Уровень статистической значимости был $p \leq 0.05$.

Протокол криосохранения срезов заключался в следующем. Инкубационную среду с вышеописанным ионным составом готовили на гибридной буферной системе: карбонатный буфер (NaHCO_3), фосфатный буфер (KH_2PO_4) и трис(гидроксиметил)аминометан ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$). Исходные значения pH_0 среды для преинкубации срезов до замораживания составляли 7.2–7.3 при 37°C. Активность глутаматергических ионотропных механизмов (АМПА- и НМДА-механизмов) при этой температуре и pH_0 была оптимальной.

Срезы в проточной камере перфузировали со скоростью 2 мл/мин. В них до замораживания регистрировали амплитуды НМДА-потенциалов при 37°C в течение 20 мин. Полученные значения

амплитуд НМДА-потенциалов рассматривали как контрольные перед замораживанием. Было выявлено, что применение более частой стимуляции вызывает в срезах частотно-зависимые изменения амплитуд ответов, особенно НМДА-потенциалов, что не представляется оптимальным для длительного криосохранения.

Затем срезы градуально замораживали до -10°C при медленной скорости ($0.1^\circ\text{C}/\text{мин}$) и сохраняли при температуре -10°C в морозильнике термостата «ThermoStat plus» (Eppendorf, Герма-

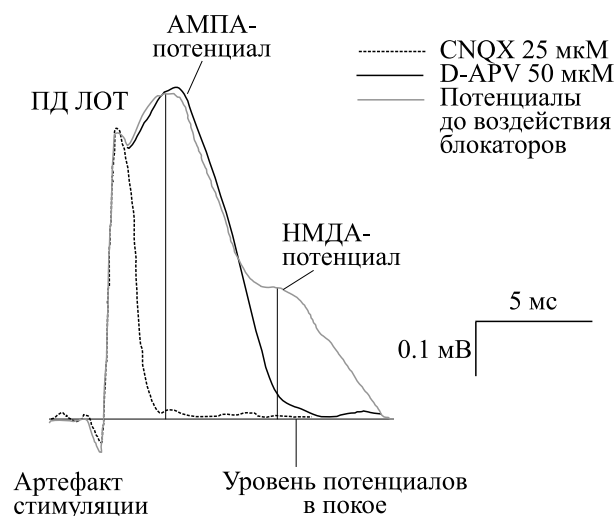


Рис. 2. Фармакологическая идентификация пре- и постсинаптических компонентов фокальных потенциалов, вызываемых электрической стимуляцией латерального обонятельного тракта (ЛОТ). Представлены усредненные ФП в инкубационной среде до воздействия блокаторов ($n = 11$), ФП при воздействии блокатора АМПА-рецепторов 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-диола ($n = 10$) и ФП при воздействии блокатора НМДА-рецепторов *D*-2-амино-5-фосфоновалериата в среде с пониженным содержанием Mg^{2+} (200 мкМ) ($n = 7$). Вертикальные серые линии — измерение амплитуд АМПА- и НМДА-потенциалов.

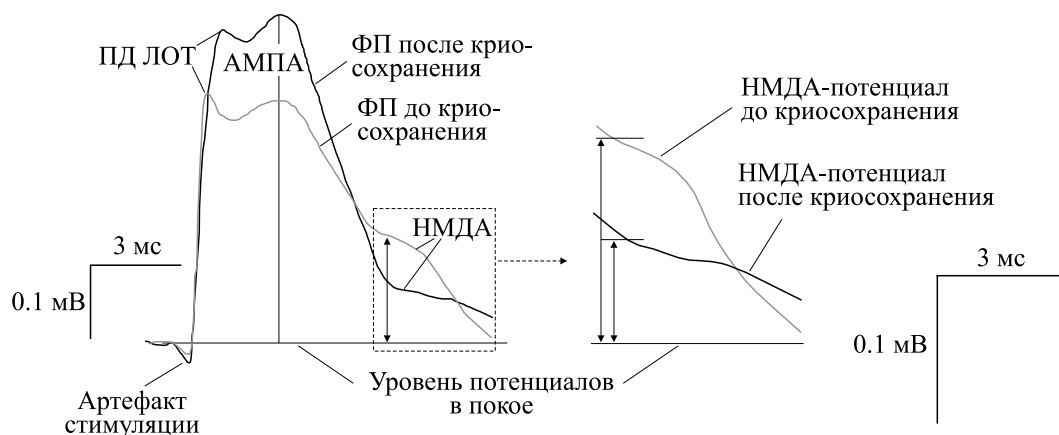


Рис. 3. Потенциалы, регистрируемые в срезах обонятельной коры мозга до и после криосохранения (30 суток при -10°C). Компоненты потенциалов: артефакт стимуляции; потенциал действия ЛОТ отражает активацию проводящих волокон ЛОТ; АМПА- и НМДА-потенциалы соответственно. Вертикальная серая стрелка — измерение амплитуд НМДА-потенциалов во временной точке 8 мс от артефакта стимуляции. На врезке справа показаны в увеличенном масштабе амплитуды НМДА-потенциалов до и после криосохранения. Вертикальные стрелки — измерение амплитуд НМДА-потенциалов до и после криосохранения.

ния). Через 30 суток криосохранения срезы отогревали до 37°C и в них вновь регистрировали амплитуды НМДА-потенциалов. При обработке результатов экспериментов амплитуды НМДА-потенциалов определяли по отношению к контрольным значениям и выражали в процентах.

Измерение pH_0 инкубационной среды осуществляли с применением рН-метра Seven Compact S220 (Mettler Toledo, США). Значения pH_0 определяли с точностью до 0.1. Температуру инкубационной среды со срезом до замораживания при регистрации НМДА потенциалов до криосохранения измеряли с помощью терморегулятора «ПИД ТРМ12» (Россия). Термодатчик находится рядом с регистрирующей камерой, но изолирован тонкой стенкой от среза, чтобы не вызывать негативные воздействия на активность нейронов срезов. Чувствительность рН-метра проверяли по стандартным титрам для приготовления образцовых буферных растворов для рН-метрии (Россия): калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4) — натрий фосфорнокислый двузамещенный (Na_2HPO_4), pH 6.86 при 25°C ; натрий тетраборнокислый ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), pH 9.18 при 25°C . В этих диапазонах рН проводили точную настройку рН-метра.

Измерение кислотно-основного баланса внутри клеток (pH_i) срезов мозга с использованием микродатчиков или специфических красителей не применялось, поскольку их использование вызывало необратимые изменения амплитуд НМДА-потенциалов.

Определение pH_0 и НМДА-потенциалов после криосохранения проводили в параллельных опытах. Это связано с тем, что одновременное из-

мерение этих параметров на срезах приводило к неконтролируемому искажению данных pH_0 и НМДА-потенциалов.

После отогревания срезы перфузировали инкубационной средой такого же состава, что и до замораживания. Это необходимо, чтобы морфологически сохранить структуры срезов. Инкубационные растворы со срезами продували кислородом, углекислый газ не использовали. Осадков в виде нерастворимых солей не выявлено. Специального контроля ионного состава среды не проводили. Необходимость использования среды, в которой был заморожен срез при отогревании, заключается в том, чтобы не вызывать механических повреждений структур среза, находящихся сначала в твердой фазе среды — во льду, а при отогревании в жидкой фазе — в растворе.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 3 представлены типичные профили экстраклеточных потенциалов, регистрируемых после криосохранения и последующего отогревания до 37°C . Анализируя изменения амплитуд АМПА- и НМДА-потенциалов до и после криосохранения, следует отметить разнонаправленные модификации активности глутаматергических ионотропных механизмов. Так, амплитуда АМПА-потенциалов увеличивалась по сравнению со значением амплитуд до криосохранения: до замораживания 290 мкВ, после отогревания — 410 мкВ, $p \leq 0.05$, $U = 7$, $n = 12$. Напротив, амплитуда НМДА-потенциалов уменьшалась после криосохранения и отогревания до нормотермических значений: до замораживания 157 мкВ, по-

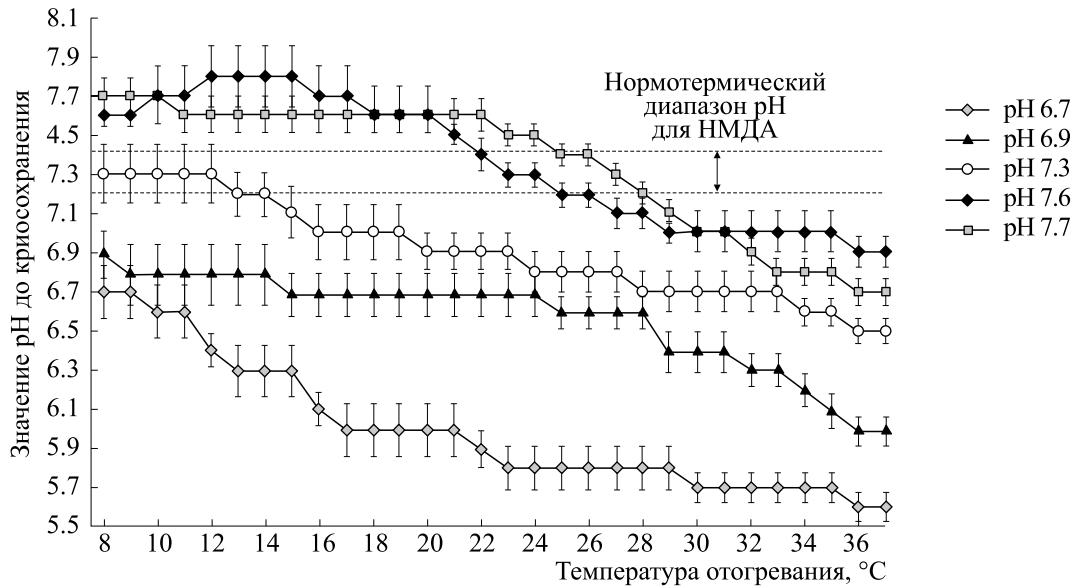


Рис. 4. Изменения pH_0 инкубационной среды с различными значениями pH_0 до криосохранения (30 суток при $-10^\circ C$) в процессе отогревания до $37^\circ C$. Измерения pH_0 проводили с интервалом $1^\circ C$. Горизонтальные пунктирные линии — оптимальный нормотермический диапазон для активности НМДА-зависимых механизмов; $n = 5$ (pH_0 6.7); $n = 7$ (pH_0 6.9); $n = 12$ (pH_0 7.3); $n = 9$ (pH_0 7.6); $n = 5$ (pH_0 7.7). Различия данных выявляли с использованием непараметрического U -критерия Вилкоксона–Манна–Уитни, $p \leq 0.05$.

сле отогревания — 94 мкВ , $p \leq 0.05$, $U = 7$, $n = 12$ (рис. 3).

Полученные результаты соответствуют данным, полученным ранее по криосохранению с различными длительностями и последующим отогреванием до нормотермических значений. Было обнаружено, что после длительного криосохранения срезов мозга амплитуды АМПА-потенциалов увеличивались, тогда как амплитуды НМДА-потенциалов снижались до минимальных значений или блокировались [11, 13].

Для поиска ответа на вопрос о причине снижения активности НМДА-механизмов были проведены исследования изменений показателей кислотно-щелочного баланса инкубационного раствора после криосохранения. Было обнаружено, что после длительного криосохранения и последующего отогревания происходит закисление инкубационной среды и высказано предположение, что такое изменение в инкубационной среде приводит к уменьшению активности НМДА-механизмов.

В связи с этой гипотезой было изучено влияние на сохранение и восстановление активности НМДА-зависимых механизмов после криосохранения (30 суток) инкубационного раствора с гибридной буферной системой (карбонатный буфер — фосфатный буфер — трис(гидроксиметил)аминометан). В такой буферной системе трис играет ключевую роль в длительном поддержании кислотно-щелочного равновесия в срезах мозга.

Для восстановления активности НМДА-механизмов после криосохранения было проведено изучение модификаций кислотно-щелочных характеристик трис-буфера в инкубационной среде (рис. 4).

При использовании инкубационных растворов трис-буфера были выявлены определенные закономерности изменения pH_0 инкубационной среды при отогревании в зависимости от различных исходных pH_0 до криосохранения. Было обнаружено, что при pH_0 7.3, традиционно используемом для сохранения активности НМДА-механизмов при инкубации срезов мозга [15], происходит ступенчатое закисление pH_0 до значения 6.5. Отметим, что при этих значениях pH_0 амплитуда НМДА-потенциалов снижалась до 33%: до замораживания — pH_0 7.3, НМДА-потенциал 140 мкВ *vice versa* при отогревании — pH_0 6.5, НМДА-потенциал 46 мкВ ; $p \geq 0.05$, $U = 11$, $n = 12$. При pH_0 6.9 и 6.7 закисление среды в процессе отогревания происходит более интенсивно, как и блокирование активности НМДА-механизмов (рис. 4).

При pH_0 7.6 и 7.7 в процессе отогревания также происходит закисление pH_0 среды до величин 6.7 и 6.9 соответственно, но этот процесс более медленный.

Следует отметить факт, что в процессе отогревания инкубационной среды в диапазоне темпе-

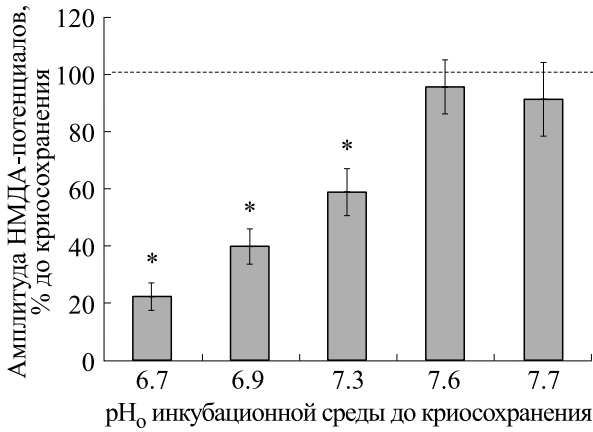


Рис. 5. Изменения амплитуды НМДА-потенциалов при отогревании до 37°C после криосохранения (30 сут при -10°C) в зависимости от различных рН₀. По оси абсцисс – рН₀ до криосохранения, по оси ординат – амплитуда НМДА-потенциалов при отогревании, в % к значениям до криосохранения; $n = 5$ (рН₀ 6.7); $n = 7$ (рН₀ 6.9); $n = 12$ (рН₀ 7.3); $n = 9$ (рН₀ 7.6); $n = 5$ (рН₀ 7.7). Различия данных выявляли с использованием непараметрического U -критерия Вилкоксона–Манна–Уитни, $p \leq 0.05$.

ратур 22–28°C при рН₀ 7.6 и 7.7 активности НМДА-механизмов находятся в нормотермическом диапазоне этих рецепторных механизмов (рис. 5).

Далее было исследовано влияние значения рН₀ 7.7 инкубационного раствора после отогревания. Последовательность приемов при проведении этих экспериментов заключалась в следующем. При плавном охлаждении инкубационной среды и достижении 20°C ее состав менялся на другой, в котором солевой состав был тот же, но

рН₀ был 7.7. Такое изменение рН₀ инкубационной среды до замораживания сопровождалось восстановлением амплитуд НМДА-потенциалов до 84% по сравнению с исходными значениями: после отогревания – при рН₀ 7.7 и температуре 37°C НМДА-потенциал 80 мкВ *vice versa* в контрольных условиях – при рН₀ 7.3 и температуре 37°C НМДА-потенциал 95 мкВ; $p \geq 0.05$, $U = 12$, $n = 14$.

Анализ данных, представленных на рис. 6, показывает, что амплитуды НМДА-потенциалов модифицируются S-образно. В интервалах температур 6–12°C инкубационная среда защелачивалась до рН₀ 7.9. При достижении интервалов температур 13–25°C происходило ступенчатое снижение до рН₀ 7.4. Нормотермический диапазон (рН₀ 7.2–7.4) для оптимальной активности НМДА-механизмов сохранялся при отогревании при интервалах температур 25–34°C (рис. 6). При дальнейшем отогревании до 37°C развивалось закисление инкубационной среды до рН₀ 7.1. Однако снижение рН₀ инкубационной среды не влияло на амплитуды НМДА-потенциалов: при рН₀ 7.1 и температуре 37°C НМДА-потенциал равнялся 85 мкВ *vice versa* в контрольных условиях – рН₀ 7.3 и температуре 37°C – НМДА-потенциал составлял 98 мкВ; $p \geq 0.05$, $U = 10$, $n = 12$. Такие изменения НМДА-потенциалов представлены на рис. 7. Следовательно, применение трис-буфера с рН₀ 7.7 при замораживании/отогревании способствует сохранению активности НМДА-механизмов.

Обращает на себя внимание факт, что изменения рН₀ инкубационного раствора после криосо-

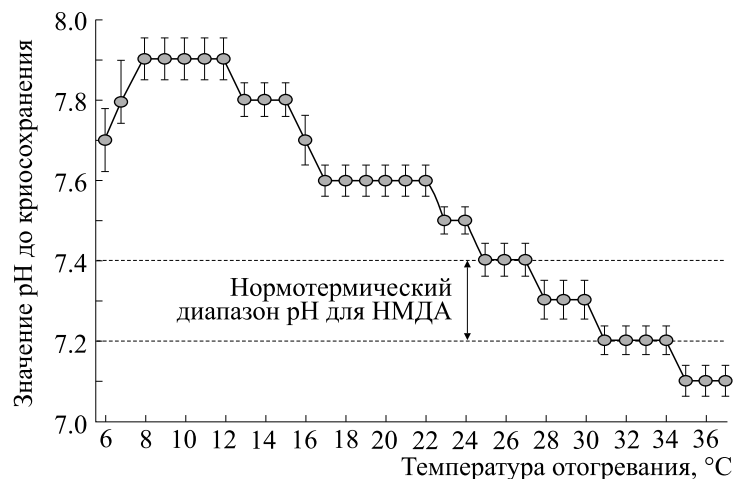


Рис. 6. Изменения рН₀ инкубационной среды при рН₀ (7.7) в зависимости от температуры при отогревании после криосохранения при -10°C; $n = 14$ для каждой точки. Различия данных в процессе отогревания по сравнению с температурной точкой 6°C выявляли с использованием непараметрического U -критерия Вилкоксона–Манна–Уитни, $p \leq 0.05$.

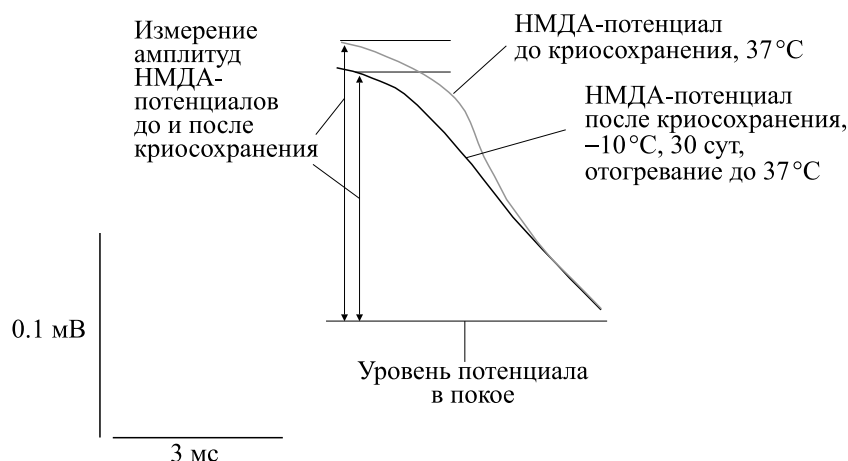


Рис. 7. Изменения НМДА-потенциалов при отогревании после криосохранения (pH_0 инкубационной среды 7.7, 37°C). НМДА-потенциалы представлены в увеличенном масштабе.

хранения происходит ступенчато, что может способствовать сохранению НМДА-механизмов при отогревании.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, проведенные исследования влияния pH_0 инкубационной среды с гибридной буферной системой (карбонатный, фосфатный и трис-буфер) на сохранение и восстановление активности глутаматергических ионотропных НМДА-зависимых механизмов оказались оптимальными для их восстановления после длительного криосохранения срезов. Наряду с использованием гибридной буферной системы восстановлению активности НМДА-механизмов способствовала замена инкубационной среды в процессе замораживания. Солевой состав не менялся, но pH_0 увеличивался до 7.7. Такое изменение pH_0 сопровождалось восстановлением амплитуды НМДА-потенциалов до 84% по сравнению с исходными значениями. Таким образом, использование гибридной буферной системы и увеличение pH_0 инкубационной среды до 7.7 были наиболее оптимальными условиями для восстановления активности НМДА-зависимых механизмов при отогревании после длительного криосохранения (-10°C, 30 суток).

Следует отметить, что в работах, связанных с клеточными культурами, в том числе срезами мозга, применяются другие буферные системы. Так, широко используется буферная система на основе НЕРЕС, который представляет собой цвиттерийонный органический буферный агент. НЕРЕС используется главным образом потому, что лучше поддерживает физиологическую величину pH_0 , несмотря на изменения концентрации диоксида углерода (вырабатываемом при кле-

точном дыхании) по сравнению с карбонатным буфером. Положительной характеристикой НЕРЕС является уменьшение диссоциации воды при понижении температуры, что дает основание использовать его при низких температурах. Однако существенным негативным эффектом НЕРЕС является его фототоксичность, когда под воздействием света образуется перекись водорода, которая негативно влияет на функционирование нейронов и синапсов [27–29].

Карбонатная и фосфатная буферные системы также применяются для инкубации срезов мозга. Однако следует отметить, что солевые растворы с карбонатным буфером нестабильны по показателям pH_0 и, как было обнаружено в наших исследованиях, отрицательно влияют на активность НМДА-зависимых механизмов, что выражалось в непредсказуемых изменениях их амплитудных значений как в нормотермических условиях, так и, что особенно важно, после криосохранения срезов мозга.

Что касается фосфатного буфера, то он, в отличие от карбонатного буфера, более стабилен, однако его буферная емкость при понижении температуры инкубационного раствора снижается. Из-за этого использование карбонатного буфера при криосохранении срезов является неоптимальным.

Учитывая ограничения свойств в поддержании кислотно-щелочного равновесия в наших исследованиях, мы применили гибридную буферную систему (карбонатный, фосфатный и трис-буфер) для длительной инкубации срезов мозга и устойчивой регистрации активностей НМДА-механизмов [15]. Трис является эффективным в качестве буфера в широком диапазоне pH_0 от 7.0 до 9.2. Отличительной чертой трис-буфера является то, что значение pK_a уменьшается

приблизительно на 0.03 при снижении температуры на 1°C [30, 31]. Отметим, что диапазон рН_o 7.0–9.0 соответствует физиологическим значениям рН_o для большинства организмов. Такие характеристики трис-буфера делают его оптимальным буфером не только в биохимии и молекулярной биологии, но и для криосохранения нервной ткани в нейробиологии [32–34].

В результате проведенных исследований были выявлены определенные закономерности применения трис-буфера в инкубационном растворе. Происходили изменения рН_o инкубационной среды при отогревании в зависимости от рН_o до криосохранения срезов. Было обнаружено, что при рН_o 7.3, традиционно используемом для сохранения активности НМДА-механизмов в срезах мозга [15], происходило ступенчатое закисление рН_o до значения 6.5. При таком сдвиге рН_o инкубационной среды в процессе отогревания амплитуда НМДА-потенциалов снижалась по сравнению со значениями амплитуд до криосохранения. Мы предположили, что в процессе криосохранения (замораживания/оттаивания) срезов происходит изменение кислотно-щелочного баланса в сторону закисления инкубационной среды. Такой сдвиг рН_o приводит к нарушению функционирования НМДА-зависимых механизмов, что проявляется при отогревании. Для того чтобы избежать такие негативные изменения, нами был использован прием изменения рН_o в процессе замораживания при 20°C до рН_o, равного 7.7. Такой прием был основан на наших предыдущих данных о том, что в диапазоне температур 20–24°C в процессе замораживания срезов они перестают быть чувствительными к гипоксии и другим цитотоксичным воздействиям [13]. Эти данные позволили предположить, что изменения рН_o не повлияют на сохранение активности НМДА-механизмов в процессе криосохранения и последующего отогревания, что и было подтверждено в настоящей работе. Очевидно, такой сдвиг рН_o инкубационной среды протектирует НМДА-зависимые механизмы от негативных влияний процесса криосохранения.

ВЫВОДЫ

Таким образом, использование гибридной буферной системы и увеличение рН_o до 7.7 оптимальны для восстановления активности НМДА-зависимых механизмов при отогревании после длительного криосохранения (–10°C, 30 суток).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает признательность Г.П. Смирновой за помощь при проведении экспериментов

и С.Е. Боровикову за техническую помощь в наладке и обслуживания электрофизиологической установки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 годы (ГП-14, раздел 65.2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Ichikawa, R.X. Yamada, and R. Muramatsu, *J. Pharmacol. Sci.* **104**, 387 (2007).
2. Н. А. Ивличева, Автореферат дис. ... канд. биол. наук (Пушино, 2013).
3. Н. А. Ивличева, Е. В. Дмитриева, М. А. Костенко и Э. Н. Гахова, *Биофизика* **49** (4), 710 (2004).
4. Н. А. Ивличева, И. А. Чистопольский, Л. И. Крамарова и Э. Н. Гахова, *Биол. мембраны* **31** (5), 342 (2014).
5. Е. Е. Фесенко (мл.), Е. Л. Гагаринский, А. С. Авенин и др., *Биофизика* **65** (4), 780 (2020).
6. C. V. Morris, *Methods Mol. Biol.* **368**, 227 (2007).
7. S. J. Paynter, *Brain Res. Bull.* **75**, 1 (2008).
8. X.-H. Ma, Y. Shi, and Y. Hou, *Cryobiology*. **60**, 184 (2010).
9. A. A. Mokrushin, *CryoLetters* **36** (6), 367 (2015).
10. A. A. Mokrushin, L. I. Pavlinova, and S. E. Borovikov, *J. Therm. Biol.* **44**, 5 (2014).
11. А. А. Мокрушин и Л. И. Павлинова, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **161** (1), 36 (2016).
12. А. А. Мокрушин и С. Е. Боровиков, *Молекуляр. медицина* **15** (2), 14 (2017).
13. А. А. Мокрушин, *Изв. РАН. Сер. биол.* № 1, 67 (2020).
14. E. D. Kanter and L. V. Haberly, *Brain Res.* **525**, 175 (1990).
15. А. А. Мокрушин, Дис. ... д-ра биол. наук (Институт физиологии им. И. П. Павлова РАН, СПб., 1997).
16. T. V. P. Bliss and G. L. Collingridge, *Nature* **361**, 31 (1993).
17. T. P. Obrenovitch and J. Urenjak, *Progr. Neurobiol.* **51**, 39 (1997).

18. S. F. Traynelis and S. D. Cull-Candy, *Nature* **345** (6273), 347 (1990).
19. J. W. McDonald, T. Bhattacharyya, and S. L. Sensi, *J. Neurosci.* **18** (16), 6290 (1998).
20. Y. Buskila, P. Breen, and J. Tapson, *Sci. Rep.* **4**, 5309 (2014).
21. V. A. Ruffin, A. I. Salameh, and W. F. Boron, *Front. Physiol.* **5** (43), 1 (2014).
22. F. Pischedda, C. Montani, and J. Obergasteiger, *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 81 (2018).
23. U. Bonnet, D. Bingmann, and E. J. Speckmann, *Brain Res.* **1710**, 146 (2019).
24. М. И. Митюшов, Н. А. Емельянов, А. А. Мокрушин и др., *Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрохимического исследования* (Наука, Л., 1986).
25. W. H. Hoffman and L. J. Haberly, *Neurosci.* **9** (1), 206 (1989).
26. M. W. Jung, J. Larson, and G. Lynch, *Exp. Brain Res.* **82** (5), 451 (1990).
27. J. L. Lepe-Zuniga, J. S. Zigler, and I. Gery, *J. Immunol. Methods* **103** (1), 145 (1987).
28. A. Penna, D. S. Wang, and J. Yu, *Neurosci.* **34** (32), 10624 (2014).
29. A. K. Chauhan and N. S. Magoski, *J. Neurosci.* **1**, 1460 (2019).
30. A. A. El-Harakany, F. M. Abdel Halima, and A. O. Barakat, *J. Electroanal. Chem.* **162** (1–2), 285 (1984).
31. C. A. Vega, R. A. Butler, and B. Perez, *J. Chem. Eng. Data* **30**, 376 (1985).
32. B. S. Markofsky and B. Sheldon, *Nitro Compounds, Aliphatic in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (New York, 2000).
33. Z. Ghalanbor, N. Ghaemi, and S. A. Marashi, *Prot. Peptide Lett.* **15** (2), 212 (2008).
34. D. Rohanová, D. Horkavcová, and L. Paidere, *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **106** (1), 143 (2018).

Optimization of the Acidic-Alkaline Composition of the Incubation Medium for a Long-Term and Reversible Cryopreservation of Brain Slices of Non-Hibernating Animals

A.A. Mokrushin

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia

It was found that the activity of the NMDA receptors (bursts of action potentials) was blocked after long-term cryostorage of brain slices at -10°C . To reactivate the NMDA receptors after cryostorage/thawing, alterations in extracellular pH (pH_o) of the incubation medium were studied. It was found that in the pH_o range (7.2–7.4), a stepwise decrease in pH until $\text{pH}_o 6.5 \pm 0.2$ was reached led to acidification of the incubation medium. As a result, NMDA receptor current amplitude decreased to 33%. The use of a hybrid buffer system (carbonate, phosphate, and Tris buffer, $\text{pH}_o 7.7$) prompted reactivation of NMDA receptors. Such a change in pH_o was accompanied by an increase in NMDA spike amplitude up to 84% compared to the initial amplitude (before cryostorage). Thus, the use of the hybrid buffer system and an increase in the pH_o level up to 7.7 were the most optimal conditions for reactivation of NMDA receptors during thawing after prolonged cryopreservation.

Keywords: brain slices, NMDA receptors, cryopreservation, buffer systems