ИЗВЕСТИЯ РАН. СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ, 2020, № 1, с. 67–76

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 577.35

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОСТИ КРИОСОХРАНЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ИОНОТРОПНЫХ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ. ИССЛЕДОВАНИЕ *in vitro*

© 2020 г. А. А. Мокрушин[@]

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

[@]E-mail: mok@inbox.ru

Поступила в редакцию 05.07.2018 г.
После доработки 16.11.2018 г.
Принята к публикации 14.12.2018 г.

Исследовано влияние криосохранения с различной длительностью на изменения амплитуд АМПА (α-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота) и НМДА (*N*-метил-D-аспартат) глутаматергических ионотропных механизмов, а также потенциала действия латерального обонятельного тракта (ПД ЛОТ) при –20°С и последующем отогревании до +37°С. Опыты проведены на срезах мозга негибернирующих животных – крысы линии Вистар. Отмечено, что после криоконсервации глутаматергические ионотропные механизмы сохранялись и восстанавливались с использованием методики электрофизиологической регистрации АМПА- и НМДА-потенциалов и суммарного ПД ЛОТ. Установлено, что после криосохранения АМПА-зависимые механизмы и активность проводящих волокон ЛОТ восстанавливались до нормотермических значений, восстановление НМДА-зависимых механизмов было неполным и составляло в среднем 34% по сравнению с нормотермическими значениями, а долговременная посттетаническая потенциация после криоконсервации не восстанавливалась.

DOI: 10.31857/S0002332920010099

Криосохранение – это перспективная биотехнология, которая позволяет длительно сохранять биологический материал в жизнеспособном состоянии при низких температурах. Изучение обратимого торможения жизнедеятельности клеток и органов млекопитающих после их криоконсервации интересно с теоретической точки зрения и имеет большое практическое значение в связи с развитием методов трансплантации тканей, органов и необходимостью создания криобанка трансплантатов.

В настоящее время в медицине и ветеринарии успешно применяется низкотемпературное хранение однотипных клеток (ооциты, сперматозоиды, клетки крови) с последующим восстановлением их биологических функций после отогревания. Методы криоконсервации сложноорганизованных органов и тканей, например нервной, до сих пор детально не разработаны. По-видимому, это связано с гетерогенным клеточным составом нервной ткани (разного типа нейроны, глиальные клетки, синапсы), а также с отсутствием стандартных протоколов замораживания/отогревания (Paynter, 2008).

При криосохранении нервной ткани необходимо учитывать, что цель глубокого замораживания клеток и тканей – выяснение зависимости сохранности биообъектов при низкотемпературной консервации от условий протеканий этого процесса: скорости снижения температуры в отдельных температурных диапазонах, скорости отогревания, оптимальной температуры хранения, состава среды для криоконсервации, типа криопротектора (или нескольких).

При разработке протоколов криоконсервации нервной ткани переживающие срезы мозга – оптимальные экспериментальные объекты для изучения закономерностей криосохранения нервной системы. Ранее проведенные нами исследования выявили некоторые закономерности воздействия скорости и глубины замораживания на восстановление синаптической активности в срезах мозга, а также на применение некоторых криопротекторов (Mokrushin, 2015). Было обнаружено, что при медленных скоростях охлаждения срезов обонятельной коры мозга (0.1– 0.125°С/мин) до +16°С активности АМПА- и НМДА-зависимых (α-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота и *N*-метил-D-аспартат соответственно) механизмов сохранялись. Применение высоких скоростей (2.0, 4.0, 6.0, 9.0°С/мин) приводило к необратимому ингибированию активности АМПА- и НМДА-зависимых механизмов. Более того, при

такой температуре и медленных скоростях охлаждения срезов мозга в них сохранялись кратковременные (4–12 мин) АМПА- и НМДА-зависимые потенцированные состояния, индуцируемые тетанизацией срезов (Mokrushin *et al.*, 2014).

Эти данные по замораживанию эксплантантов мозга были использованы в последующем для разработки протокола кратковременного (8 сут) криосохранения (–10°С) срезов мозга без использования криопротекторов и последующего их отогревания. На основании проведенных исследований было выявлено, что активности АМПА- и НМДА-зависимых механизмов при медленной скорости замораживания/отогревания восстанавливались. Однако сохранение свойств нервной системы более высокого порядка (процессы обучения и формирования следов памяти) не исследовалось (Mokrushin, 2015). Необходимость решения этой проблемы заключается в том, что нервная система уникальна тем, что имеет два уровня организации функций: первый (базовый) связан с процессами обработки и передачи информации, второй, более сложный, проявляется в виде обучения.

В связи с этим для разработки биотехнологий криосохранения нервной ткани мы использовали замораживание при –20°С. В выборе такой температуры мы исходили из того, что она будет оптимальной для стабильного криосохранения. Обнаружено, что активности энзимов в клетках при такой температуре ингибируются, но восстанавливаются при отогревании (Bakhach, 2009). Отметим, что применение жидкого азота (–196°С) для криосохранения нам представляется неоптимальным для сохранения и полного восстановления активности нейронов и особенно синаптической пластичности. Использование такой температуры замораживания нейронов беспозвоночных и теплокровных приводило к необратимым изменениям морфологических структур (снижение плотности клеток, признаки геморрагического инсульта, трещины в мозговой ткани) (Swett *et al.*, 1994; Koshinaga *et al.*, 1995; Дмитриева, 2004; Pichugin *et al.*, 2006; Ивличева, 2013; Пичугин, 2013; Ивличева и др., 2014).

Для клиники сохранение нервной ткани необходимо в течение длительного времени, поэтому мы исследовали влияния различных интервалов криосохранения на восстановление активности нервных клеток и синаптической пластичности.

Цель работы – выяснение закономерностей влияния криосохранения срезов мозга при –20°С с различной длительностью (недели, месяцы) на восстановление ионотропных глутаматергических рецепторных АМПА- и НМДА-зависимых механизмов, а также изучение эффектов криосохранения на развитие процессов неассоциативного обучения на модели долговременной посттетанической потенциации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали белых крыс-самцов линии Вистар массой 180–200 г. Все эксперименты были проведены на крысах из биоколлекции “Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенных European Communities Council Direction (86/609 EEC). Опыты с животными были одобрены в строгом соответствии с Руководством Совета Федерации по уходу и использованию лабораторных животных (1996 г.) и с руководящими принципами Института физиологии им. И.П. Павлова РАН этического кодекса (1996 г.).

Из мозга крыс с помощью специальных инструментов изготавливали тангенциальные срезы толщиной 400–500 мкм (Митюшов и др., 1986) и преинкубировали в стеклянных виалах средой 1 мл в аппарате Варбурга (Германия) при +37°С. После преинкубации в течение 2 ч срезы помещали в камеру электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017) и перфузировали со скоростью 2 мл/мин искусственной церебральной жидкостью следующего состава NaCl – 124, KCl – 5, $CaCl_2$ – 2.6, KH_2PO_4 –1.24, $MgSO_4$ – 1.2, $NaHCO_3$ – 3, глюкоза – 10, трис-HCl – 23 мМ, pH 7.2–7.3. Инкубационный раствор в виалах со срезами и газовая атмосфера над раствором насыщались кислородом только при температуре от +37 до +22°С. При дальнейшем охлаждении срезов от +22°С до –15°С насыщение кислородом инкубационной среды и атмосферы над срезом не проводилось, поскольку было обнаружено, что прекращение оксигенирования инкубационной среды и атмосферы над срезом при температуре от +20 до +22°С не влияло на генерацию АМПА- и НМДА-зависимых механизмов (Mokrushin *et al.*, 2014).

Жизнедеятельность срезов определялась при регистрации экстраклеточной электрической активности: потенциалов АМПА, НМДА и суммарного потенциала действия латерального обонятельного тракта (ПД ЛОТ). Эти потенциалы регистрировали стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl сопротивлением 1–5 мОм в ответ на одиночные ортодромные электрические импульсы (прямоугольной формы, длительностью 0.1 мс, интенсивностью 1–3 В, частотой 0.003 Гц) ЛОТ – главного афферентного входа к нейронам обонятельной коры. Индифферентный хлорсеребряный электрод располагался в камере.

Для регистрации экстраклеточных АМПА- и НМДА-потенциалов и ПД ЛОТ использовали усилитель (НТО, Россия). Затем потенциалы оцифровывали с помощью аналого-цифрового устрой-

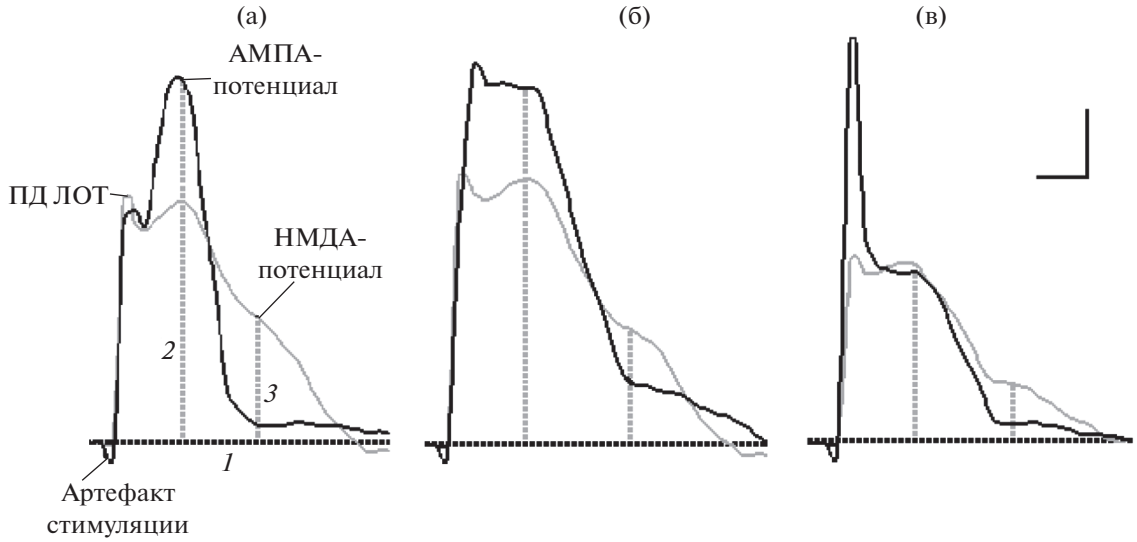

Рис. 1. Изменения амплитуд ПД ЛОТ, АМПА- и НМДА-потенциалов после криосохранения с длительностями 10 (а), 23 (б) и 90 сут (в) при отогревании срезов до +37°С. *1* – изолиния; *2*, *3* – амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов соответственно. Потенциал ПД ЛОТ – жирная линия. Измерения амплитуд потенциалов проводились от изолинии до пика. Калибровка: 0.1 мВ, 5.0 мс.

ства (Е 20–10, Россия) с частотой квантования 25 кГц и с помощью компьютерной программы “Анализ электрической активности нейронов” (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН) обрабатывали потенциалы. Анализировались амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов и ПД ЛОТ, вызываемых электрической стимуляцией ЛОТ. Генерация АМПА- и НМДА-потенциалов отражает активацию глутаматергических ионотропных компонентов возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП), тогда как ПД ЛОТ, пресинаптический компонент, отражает активацию волокон ЛОТ.

Фармакологическая идентификация этих рецепторных механизмов была проведена нами ранее с использованием специфических блокаторов CNQX и APV для АМПА- и НМДА-рецепторов, соответственно (Mokrushin, Pavlinova, 2013). Амплитуды этих потенциалов определялись от изолинии до пика (рис. 1).

В исследовании не применялись традиционные криопротекторы (диметилсульфоксид, этиленгликоль, глицерин, 1,2-пропандиол, диметилформамид и др.), поскольку они вызывают негативные реакции на жизнедеятельность нервных клеток и синапсов (Fang, Zhang, 1992; Пичугин, 2013). Химические реактивы, необходимые для приготовления искусственной цереброспинальной жидкости, были предоставлены фирмой “Химреактив” (Россия). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием непараметрического параметра (*U*-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни). Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

Протокол криосохранения заключался в последовательных этапах. Срезы после преинкубации помещались в проточную камеру электрофизиологической установки и в них до замораживания регистрировались амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов и ПД ЛОТ при +37°С (Мокрушин, Боровиков, 2017). Затем срезы градуально охлаждались до +16°С в установке при медленных скоростях (0.1–0.125°С/мин). Отметим, что такие скорости замораживания и последующего отогревания были выбраны нами на основании результатов ранее проведенных исследований. Медленные скорости были оптимальными для сохранения активностей механизмов электрогенеза срезов при их замораживании и отогревании (Mokrushin *et al.*, 2014; Mokrushin, 2015). Затем срезы переносили в стеклянные виалы с инкубационным раствором (1 мл), постепенно замораживали до –20°С и сохраняли в морозильнике термостата ThermoStat plus (Eppendorf, Германия).

Мы изучали восстановления активностей глутаматергических ионотропных механизмов по изменениям амплитуд АМПА- и НМДА-потенциалов после различных временны́х интервалов их криосохранения (4, 8, 10, 23 и 90 сут) и последующего отогревания срезов со скоростью 0.1°С/мин. Для выяснения нейропластических свойств нейрональной сети срезов (модификация эффективности синаптической передачи) после их отогревания до +37°С проводилась тетанизация ЛОТ (частота 100 Гц в течение 15 с) для индукции долговременной посттетанической потенциации (ДПП) и долговременной посттетанической депрессии (ДПД). Эти процессы

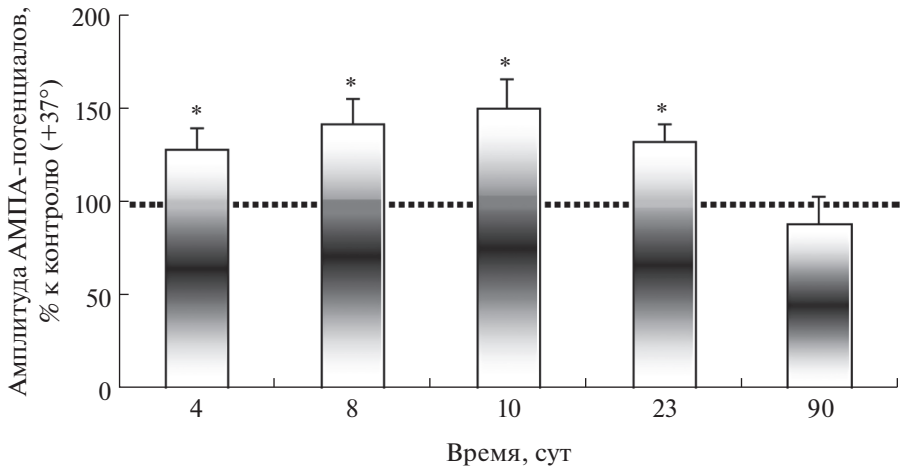

Рис. 2. Изменения амплитуды АМПА-потенциалов после криосохранения с различными длительностями при отогревании срезов до +37°С. Горизонтальная штриховая линия – контрольные значения АМПА-потенциалов при +37°С до замораживания. $n = 25$ для каждой точки. * – достоверность различия с контрольными значениями при $p \leq 0.05$, U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

отражают развитие неассоциативной формы обучения и формирования следов памяти (Bliss, Collingridge, 1993).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В начале исследований срезы после криоконсервации были протестированы на возникновение и сохранение АМПА- и НМДА-потенциалов и пресинаптического компонента ПД ЛОТ в течение 15–20 мин. Скорость отогревания срезов составляла 0.1°С/мин. Было обнаружено, что во всех срезах (100%, $n = 25$) активности АМПА и НМДА восстанавливались после криоконсервации.

Следующий этап заключался в проведении анализа степени восстановления активностей ПД ЛОТ, АМПА- и НМДА-зависимых механизмов после различных сроков криосохранения. На рис. 1 показаны изменения амплитуд этих потенциалов. Видно, что степени сохранения активностей этих механизмов различны. Так, активность проводящих волокон ЛОТ (амплитуда ПД ЛОТ) восстанавливалась после 10 сут, но возрастала после 23 и 90 сут криосохранения. Активность АМПА-механизмов возрастала при меньших сроках криосохранения (рис. 1а, б), но после 90 сут она восстанавливалась до контрольного значения (рис. 1в). Степень восстановления активности НМДА-механизмов после всех сроков криосохранения была меньше по сравнению с ПД ЛОТ и АМПА-механизмами (рис. 1).

Для того чтобы выяснить влияния различных сроков криосохранения на восстановления активностей проводящих волокон (ПД ЛОТ) АМПА- и НМДА-механизмов, были проанализированы суммарные данные изменения амплитуд этих потенциалов. Так, амплитуды АМПА-потенциалов после отогревания увеличивались в течение всего времени отогревания и статистически не отличались от контрольных значений после 4 и 23 сут криосохранения ($U = 15$, $n = 25$, $p \geq 0.05$) (рис. 2). При длительностях криосохранения в течение 8 и 10 сут амплитуды АМПА-потенциалов достоверно превышали контрольные значения в среднем на 47% ($U = 7$, $n = 25$, $p \leq 0.05$). Эти данные свидетельствуют о том, что воздействие кратковременной криоконсервации способствует восстановлению активностей АМПА-зависимых рецепторных механизмов с применением медленной скорости замораживания/отогревания (0.1°С/мин).

Далее была тестирована функциональная нейропластичность – изменение эффективности синаптической передачи после криоконсервации. Эта функция оценивалась по изменениям амплитуд АМПА-потенциалов после тетанизации ЛОТ – АМПА-зависимая ДПП.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что АМПА-зависимая ДПП в срезах не развивалась, индуцировалась только фаза индукции ДПП после всех тестированных интервалов криоконсервации по сравнению с контрольными нормотермическими условиями (рис. 3). Длительность этой фазы не превышала 3 мин. Затем она трансформировалась в стабильную ДПД (рис. 3).

Эти наблюдения указывают на то, что криоконсервация в течение 4, 8, 10, 23 и 90 сут не способствует восстановлению более сложных функций нейрональной сети срезов – способность к неассоциативной форме обучения по АМПА-зависимым ДПП.

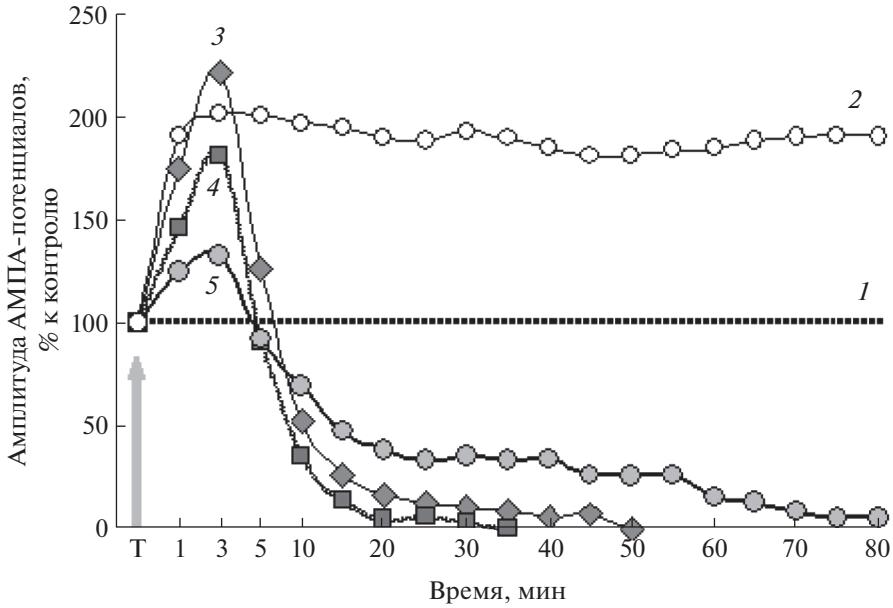

Рис. 3. Развитие АМПА–зависимой долговременной посттетанической потенциации (ДПП) в срезах обонятельной коры мозга крыс после криосохранения различной длительности при отогревании до +37°С. Т – тетанизация ЛОТ (частота 100 Гц, 15 с) при +37°С. *1* – контрольные амплитуды АМПА-потенциалов при +37°С до замораживания срезов; *2* – ДПП при +37°С; *3–5* – АМПА-зависимая ДПП в срезах после криосохранения длительностью 10, 23 и 90 сут соответственно.

Особый интерес представляют процессы криосохранения НМДА-механизмов. Известно, что при формировании следов памяти и обучения активности НМДА-рецепторов необходимы для инициирования функциональной пластичности, связанной с обучением (Rebola *et al.*, 2010).

Проведенные исследования показали, что НМДА-зависимые механизмы после криосохранения в отличие от изменений активности АМПА-зависимых механизмов восстанавливались иначе. Так, амплитуды НМДА-потенциалов имели тенденцию к восстановлению, но их амплитуда составляла в среднем 11% по сравнению с амплитудой до замораживания после 4, 8, 10 и 90 сут криоконсервации (рис. 4). Улучшение восстановления происходило после 23 сут криоконсервации и составляло в среднем 53% ($U = 8$, $n = 25$, $p \leq 0.05$).

Данные, представленные выше, свидетельствуют о том, что НМДА-зависимые механизмы наиболее уязвимы действием замораживания при –20°С и последующего отогревания. Известно, что НМДА-рецепторы активно вовлекаются в развитие различных форм обучения и формирования следов памяти. Для проверки вовлечения НМДА-зависимых механизмов в развитие функциональной пластичности мы использовали тетанизацию срезов на развитие неассоциативной формы обучения – ДПП (Bliss, Collingridge, 1993).

Были протестированы срезы на развитие ДПП при отогревании после различных сроков криоконсервации. Вместо ожидаемого развития НМДА-зависимого ДПП было обнаружено, что формируется только фаза индукции ДПП в течение 1–3 мин после 10 и 23 сут криоконсервации (рис. 5). При меньших сроках криосохранения (4 и 8 сут) развивалась быстрая стабильная депрессия во всех протестированных срезах ($n = 4$).

Обращает на себя внимание то, что ДПП после 90 сут криосохранения развивалась волнообразно и в редуцированном виде (рис. 5). Как и при более коротких сроках криоконсервации отчетливо возникала фаза индукции. Далее она сменялась статистически достоверным кратковременным (3–5 мин) снижением амплитуды НМДА-потенциалов. Затем эта депрессия спонтанно трансформировалась в потенцированное состояние с амплитудой 160% ($U = 9$, $n = 5$, $p \leq 0.05$) в течение 10–25 мин. Такое же незначительное потенцированное состояние регистрировалось спонтанно после 45 мин (рис. 5, *5*). Сопоставляя развитие НМДА-зависимой ДПП после 90 сут криосохранения с развитием ДПП в контрольных нормотермических условиях до заморозки срезов, можно утверждать, что эта форма ДПП редуцированная (рис. 5).

Далее мы проанализировали восстановление суммарной активности волокон ЛОТ после различных сроков криосохранения. Амплитуды ПД ЛОТ после различных длительностей криоконсервации восстанавливались (рис. 6). Анализируя влияние длительностей криосохранения на степени

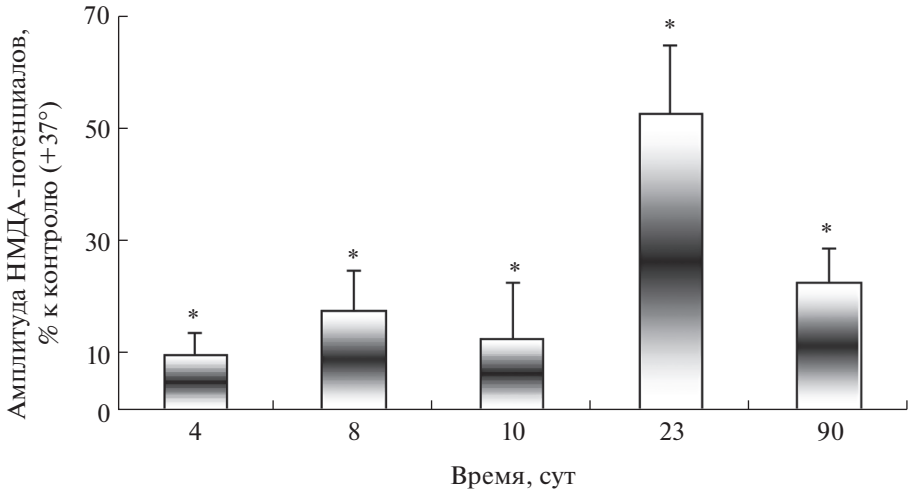

Рис. 4. Изменения амплитуды НМДА-потенциалов после криосохранения с различными длительностями при отогревании срезов до +37°С. Контрольные значения НМДА-потенциалов (100%) при +37°С до замораживания не показаны (n = 25 для каждой точки). * – достоверность различия с контрольными значениями при $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем до замораживания, U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

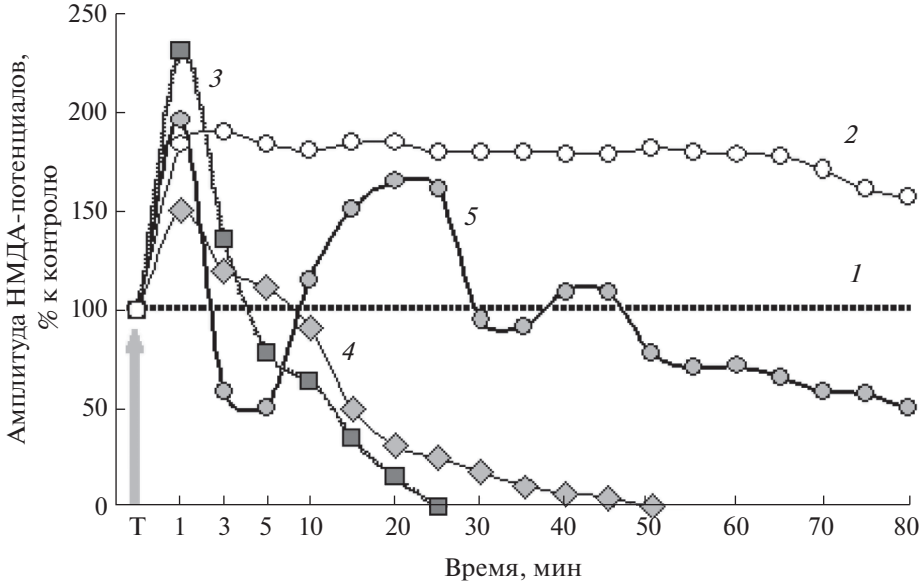

Рис. 5. Развитие НМДА-зависимой долговременной посттетанической потенциации (ДПП) в срезах обонятельной коры мозга крыс после криосохранения различной длительности при отогревании до +37°С. Т – тетанизация ЛОТ (частота 100 Гц, 15 с) при +37°С. *1* – контрольные амплитуды НМДА-потенциалов при +37°С до замораживания срезов; *2* – ДПП при +37°С; *3–5* – НМДА-зависимая ДПП в срезах после криосохранения длительностью 10, 23 и 90 сут соответственно.

восстановления активностей волокон ЛОТ, можно выявить определенную закономерность. Так, после 4 сут криоконсервации активность волокон ЛОТ восстанавливалась только до 76% и достоверно отличались от контрольных значений (U = 7, n = 5, $p \leq 0.05$). Пролонгация длительностей криосохранения до 8, 10 сут способствовала полному восстановлению волокон ЛОТ. Дальнейшее увеличение длительностей до 23 и особенно до 90 сут криосохранения вызывало значительное возрастание амплитуд ПД ЛОТ достоверно выше контрольных значений до замораживания срезов (U = 11, n = 5, $p \leq 0.05$) (рис. 6).

Таким образом, увеличение длительности криосохранения сопровождается не только восстановлением активностей волокон ЛОТ, но их гиперактивацией.

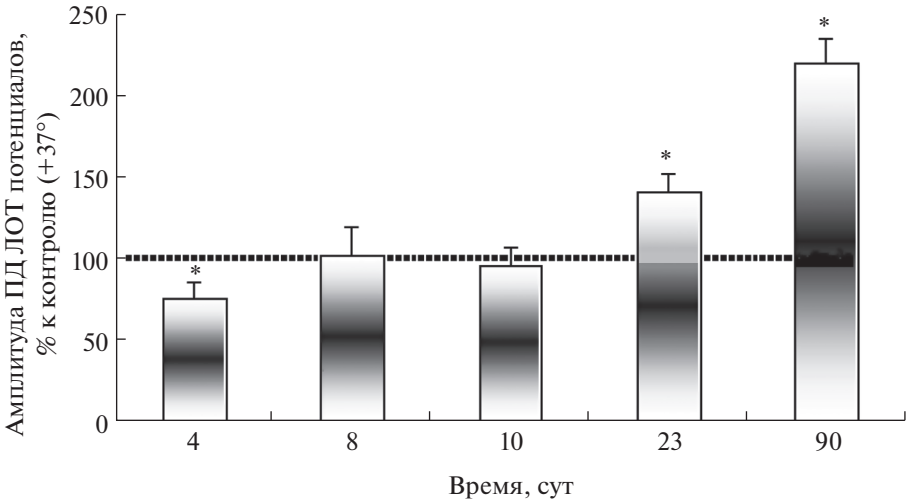

Рис. 6. Изменения амплитуды суммарного ПД ЛОТ после криосохранения с различными длительностями при отогревании срезов до +37°С. Горизонтальная штриховая линия – контрольные значения амплитуд суммарного ПД ЛОТ при +37°С до замораживания ($n = 25$ для каждой точки). * – достоверность различия с контрольными значениями при $p \leq 0.05$, U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований были получены данные, которые свидетельствуют о том, что после криоконсервации срезов мозга крыс активности ионотропных глутаматергических АМПА- и НМДА-зависимых механизмов, а также активность проводящих волокон ЛОТ восстанавливались. Важно отметить, что криоконсервации подвергались механизмы глутаматергической медиаторной системы доминирующей в мозге теплокровных. Таким образом, полученные данные будут способствовать разработке биотехнологии длительной криоконсервации нервной ткани для создания криобанка.

Протокол криоконсервации срезов мозга в наших исследованиях заключался в том, что мы использовали замораживания срезов при –20°С, поскольку, как установлено, метаболическая активность клеток ингибируется, но не блокируется (Bakhach, 2009). Мы применяли медленную скорость замораживания/отогревания срезов мозга (не более 0.125°С/мин). Такой выбор скоростей основан на результатах наших предыдущих исследований, в которых было показано, что скорости 0.1–0.125°С/мин замораживания/отогревания способствовали восстановлению активности АМПА- и НМДА-зависимых механизмов (Mokrushin *et al.*, 2014; Mokrushin, 2015). Анализ результатов проведенных экспериментов показал, что глутаматергические синаптические механизмы, а также активности проводящих волокон после всех интервалов длительности криоконсервации в срезах сохранялись и восстанавливались при отогревании. Однако резистентности исследованных механизмов к воздействию замораживания и последующего отогревания оказались различными. При сопоставлении толерантности глутаматергических механизмов к воздействию криосохранения выявилась закономерность, что АМПА-зависимые механизмы, а также активности проводящих волокон были более устойчивы к процедуре криосохранения. Функционирование АМПА-механизмов восстанавливались при отогревании, а активность волокон ЛОТ была гиперактивирована при длительных сроках криосохранения (23 и 90 сут).

Напротив, резистентность НМДА-зависимых механизмов к воздействию различных длительностей криосохранения была ниже, чем АМПА-зависимых механизмов. Активность этих процессов восстанавливалась в среднем до 33% по отношению к нормотермическому контролю до криосохранения.

Торможение активностей НМДА-механизмов после криоконсервации, на наш взгляд, можно рассматривать как протективный эффект криосохранения. Деактивация НМДА-механизмов связана с торможением интенсивного входа ионов кальция внутрь нейронов и, соответственно, блокированием развития эксайтотоксичности. Такой вывод подтверждается результатами, полученными на культуре гиппокампа (Takadera, Ohyashiki, 2007; Bickler *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2013). В таком функциональном состоянии НМДА-механизмы устойчивы к действию цитотоксических стресс-факторов.

Очевидно, для оптимизации процесса криоконсервации гетерогенных структур эксплантантов мозга, особенно для полного восстановления НМДА-механизмов после криосохранения, необходимо использование криопротекторов. Однако

Таблица 1. Сравнение степени восстановления АМПА- и НМДА-механизмов и амплитуды ПД ЛОТ после криоконсервации в течение 8 сут при температурах замораживания срезов –10 и –20°С

Амплитуда при +37° (% к нормотермическому контролю до замораживания)	–10°С	–20°С
АМПА-потенциалов	90 ± 9	143 ± 6*
НМДА-потенциалов	66 ± 11	18 ± 14*
ПД ЛОТ	119 ± 21	103 ± 15

Примечание. * – $p \leq 0.05$, *U*-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

применение традиционных криопротекторов, таких как диметилсульфоксид, этиленгликоль, глицерин и другие, вызывает нарушение функционирования синаптических механизмов в мозговых структурах (Fang, Zhang, 1992; Ивличева, 2013; Пичугин, 2013).

Для изучения восстановления сложных свойств нервной ткани, которые проявляются в виде синаптической пластичности после криоконсервации, были протестированы срезы на развитие ДПП при отогревании после различных сроков криосохранения. Анализ данных проведенных исследований выявил, что АМПА-зависимые ДПП в срезах не развивались после всех тестированных интервалов криоконсервации по сравнению с контрольными нормотермическими условиями. Было обнаружено развитие фазы индукции ДПП, которая затем трансформировалась в ДПД. Эти факты свидетельствуют, что использованный нами протокол криоконсервации срезов мозга не влиял на восстановление более сложных функций нейрональной сети срезов – способность к неассоциативной форме обучения АМПА-зависимым ДПП.

Особое внимание в наших исследованиях было обращено на восстановление функциональной пластичности НМДА-зависимых механизмов. Результаты экспериментов показали, что пластичность этих механизмов отличалась от пластичности АМПА-механизмов. При меньших сроках криоконсервации (4, 8, 10 и 23 сут) развивалась только фаза индукции ДПП. Полученные данные свидетельствуют о том, что кратковременное криосохранение и последующее отогревание их не восстановливают синаптическую пластичность. Обнаруженные факты о развитии ДПП коррелировали с восстановлением базовых характеристик НМДА-рецепторов, которые были ингибированы при этих сроках криосохранения. Однако следует отметить, что использование более длительного срока криосохранения срезов (90 сут) способствовало частичному сохранению и восстановлению синаптической пластичности и, соответственно, неассоциативному обучению – ДПП. Этот факт не коррелирует с неполным восстановлением базовых характеристик НМДА-механизмов после этого же срока криосохранения (рис. 5). После этого интервала криосохранения их активность была заторможена. Наиболее вероятные интерпретации этого противоречия – различные виды активации НМДА-механизмов. Так, в тесте на восстановление активности НМДА-зависимых механизмов после криосохранения их активация осуществлялась одиночными электрическими стимулами, тогда как при тетанизации проводилась стимуляция импульсами с высокой частотой. Это подтверждается фактами о чувствительности НМДА-механизмов к различной степени их активации (Mayer, 2011).

Важный аспект наших исследований – влияние различных длительностей криоконсервации на восстановление активностей волокон ЛОТ. Отметим, что ЛОТ – группа нервных волокон с разными степенями миелинизации и скоростями проведения. В результате проведенных исследований обнаружено, что при всех сроках криосохранения происходит полное восстановление этих волокон. Более того, при больших сроках криоконсервации они гиперактивировались. Мы полагаем, что такое явление связано с гиперактивацией немиелинизированных волокон группы В. Отсутствие миелиновой оболочки этих нервных волокон индуцирует нарушение функционирования их мембран и натриевых каналов в них, тогда как миелиновые оболочки волокон ЛОТ группы Aδ защищают мембраны и оптимизируют функции натриевых каналов.

Сопоставляя характеристики протоколов криоконсервации с протоколами проведенных ранее исследований, можно отметить некоторые расхождения. В частности, имеются различия по степени восстановления АМПА- и НМДА-механизмов при разной температуре криосохранения (Mokrushin, 2015) (табл. 1).

Так, амплитуды потенциалов АМПА, НМДА и ПД ЛОТ, восстанавливались после криоконсервации при –10°С в течение 8 сут (табл. 1). После криоконсервации при –20°С в течение 8 сут амплитуда ПД ЛОТ восстанавливалась до исходных значений до замораживания (119 ± 21% при –10°С *vice verse* 103 ± 15% при –20°С). Напротив, восстановление АМПА- и НМДА-зависимых механизмов

при –20°С отличалось от восстановления при –10°С. При замораживании –20°С АМПА-механизмы не только восстанавливались, но и гиперактивировались. Восстановление активности НМДА-механизмов, в отличие от АМПА-механизмов, было ингибировано (табл. 1).

Такие различия в степени восстановления АМПА- и НМДА-механизмов после криоконсервации можно объяснить тем, что замораживание при –20°С по-разному воздействует на гетерогенные структуры АМПА- и НМДА-механизмов, образованные различными белковыми субъединицами. В частности, AMPA-рецепторы образованы белковыми субъединицами GluR1, GluR2 и GluR3 и реже субъединицей GluR4. Эти рецепторы передают быстрые возбуждающие сигналы в синапсах нервной системы (Nakagawa, 2010). НМДА-рецепторы состоят из других белковых субъединиц GluN1 и двух субъединиц GluN2 или GluN3. Эти субъединицы формируют ионные каналы, способные к проникновению внутрь клеток внеклеточных ионов Ca^{2+} во время возбуждения, обучения и формирования следов памяти (Salussolia *et al.*, 2010; Traynelis *et al.*, 2010; Mayer, 2011). Описанные структурные отличия белковых молекул, формирующих АМПА- и НМДА-рецепторы, вероятно, по-разному восстанавливаются после длительного криосохранения.

Таким образом, изучение особенностей криосохранения и криоповреждения глутаматергических механизмов в срезах мозга теплокровных как целой интегральной структуры позволило выявить степени восстановления не только базовых свойств, но и свойств нервной системы более высокого порядка (обучения и памяти). Получены данные, которые свидетельствуют о том, что после криоконсервации базовые активности глутаматергических ионотропных механизмов в срезах мозга восстанавливались, однако восстановления функциональной пластичности (ДПП) после криоконсервации не происходило.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Дмитриева Е.В. Структурно-функциональные изменения нейронов моллюска после криоконсервации: Автореф. дис. канд. биол. наук. Пущино: Ин-т биофизики клетки РАН, 2004. 21 с.

Ивличева Н.А. Функциональная и регенеративная активность нейронов после криоконсервации изолированного мозга моллюска *Lymnaea stagnalis* L: Автореф. дис. канд. биол. наук. Пущино: Ин-т биофизики клетки РАН, 2013. 22 с.

Ивличева Н.А., Чистопольский И.А., Крамарова Л.И., Гахова Э.Н. Электрофизиологическая активность мозга моллюска *Lymnaea stagnalis* L после криоконсервации в жидком азоте (–196°С) // Биол. мембраны. 2014. Т. 31. № 5. С. 342–351.

Митюшов М.И., Емельянов Н.А., Мокрушин А.А., Войнер И.А., Багаева Т.Р. Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрохимического исследования. Л.: Наука, 1986. 127с.

Мокрушин А.А., Боровиков С.Е. Установка для изучения гипотермических эффектов на переживающих срезах мозга теплокровных // Междунар. журн. прикл. фундамент. исследований. 2017. № 2 (Ч. 2). С. 214–217.

Пичугин Ю.И. Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. М.: Науч.-техн. центр криобиологии и анабиоза, 2013. С. 60–62.

Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues // Organogenesis. 2009. V. 5. P. 119–126.

Bickler P.E., Warren D.E., Clark J.P., Gabatto P., Greqersen M., Brosnan H. Anesthetic protection of neurons injured by hypothermia and rewarming: roles of intracellular Ca^{2+} and excitotoxicity //Anesthesiology. 2012. V. 117. № 2. P. 280–292.

Bliss T.V.P., Collingridge G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation on in the hippocampus // Nature. 1993. V. 361. P. 31–39.

Fang F., Zhang Z.-X. Cryopreservation of embryonic cerebral tissue of rat // Cryobiology. 1992. V. 29. P. 267–273.

Koshinaga M., Katayama Y., Takahata T., Suma I., Tsubokawa T. Temporal pattern of synaptophysin expression in cryopreserved fetal hippocampal cells transplanted into ischemically damaged adult rat hippocampus // Cell Transplant. 1995. V. 4. Suppl. 1. P. S9–S11.

Mayer M.L. Structure and mechanism of glutamate receptor ion channel assembly, activayion and modulation // Curr. Opin. Neurobiol. 2011. V. 21. № 2. P. 283–290.

Mokrushin A., Pavlinova L. Neurotropic and protective effects of L-carnosine: studies in vitro. Carnosine: Physiological effects and research insights / Ed. Wells D. N.Y.: Nova Sci. Publ., 2016. P. 113–158.

Mokrushin A.A. Effects cryopreservation of ionotropic glutamatergic receptor mechanisms *in vitro* // CryoLetters. 2015.V. 36. № 6. P. 367–377.

Mokrushin A.A., Pavlinova L.I. Effects of the blood components on the AMPA and NMDA synaptic responses in brain slices in the onset of hemorrhagic stroke // Gen. Physiol. Biophys. 2013. V. 32. P. 489–504.

Mokrushin A.A., Pavlinova L.I., Borovikov S.E. Influence of cooling rate on activity of ionotropic glutamate receptors in brain slices at hypothermia // J. Therm. Biol. 2014. V. 44. P. 5–13.

Nakagawa T. The biochemistry, ultrastructure, and subunit assembly mechanism of AMPA receptors // Mol. Neurobiol. J. 2010. V. 42. P. 161–184.

Paynter S.J. Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells // Brain Res. Bull. 2008. V. 75. P. 1–14.

Pichugin Y., Fahy G.M., Morin R. Cryopreservation of rat hippocampal slices by vitrification // Cryobiology. 2006. V. 52. № 2. P. 228–240.

Phillips K.F., Deshpande L.S., DeLorenzo R.J. Hypothermia reduces calcium entry via the N-methyl-D-aspartate and ryanodine receptors in cultured hippocampal neurons // Eur. J. Pharmacol. 2013. V. 698. P. 186–192.

Rebola N., Srikmuar B.N., Mulle C. Activity-dependent synaptic plasticity of NMDA recepotors // J. Physiol. 2010. V. 588. P. 93–99.

Salussolia C.L., Prodromou M.L., Borker P., Wollmuth L.P. Arrangement of subunits in functional NMDA receptors // J. Neurosci. 2010. V. 31. № 31. P. 11295–11304.

Swett J.W., Paramore C.G., Turner D.A. Quantitative estimation of cryopreservation viability in rat fetal hippocampal cells // Exp. Neurol. 1994. V. 129. № 2. P. 330–334.

Takadera T., Ohyashiki T. Temperature dependent N-methyl-D-aspartate receptor mediated cytotoxicity in cultured rat cortical neurons // Neurosci. Lett. 2007. V. 423. P. 24–28.

Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Manniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J., Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function // Pharmacol. Rev. 2010. V. 62. № 3. P. 405–496.

The Influence of Duration Cryopreservation on Activity of Ionotropic Glutamatergic Mechanisms *in vitro* Study

A. A. Mokrushin[#]

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

[#]*e-mail: mok@inbox.ru*

The effects of cryopreservation with different durations on the amplitudes of AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) and NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) glutamatergic ionotropic mechanisms, as well as the action potential of the lateral olfactory tract (AP LOT) at –20°C and subsequent warming to +37°C were investigated. Experiments were carried out on slices of the brain of nonhybernating animals – Wistar rats. It was noted that after cryopreservation, glutamatergic ionotropic mechanisms were preserved and restored using the electrophysiological method of recording the AMPA- and NMDA-potentials and the total AP LOT. It was established that after cryopreservation, AMPA-dependent mechanisms and the activity of conductive LOT fibers were restored to normothermal values, the recovery of NMDA-dependent mechanisms was incomplete and averaged 34% compared to normothermal values, and the long–term posttetanic potentiation after cryopreservation was not restored.