УДК 57.085.21

# УСТАНОВКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГИПОТЕРМИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НА ПЕРЕЖИВАЮЩИХ СРЕЗАХ МОЗГА ТЕПЛОКРОВНЫХ

**[1]Мокрушин А.А., [2]Боровиков С.Е.**

*[1]ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, e-mail: mok@inbox.ru;*
*[2]Клиника военно-морской терапии, Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург*

Описывается установка для исследований гипотермических воздействий в различных температурных диапазонах на механизмы электрогенеза переживающих срезов мозга теплокровных. Установка состоит из комплекса приборов, обеспечивающих жизнедеятельность срезов, микростимуляцию и регистрацию электрической активности биообъекта и системы приборов для изменения температуры биообъекта. Поддержание жизнедеятельности биообъекта осуществляется перфузией солевым питательным раствором с регулируемой скоростью. Для регулировки температуры биообъекта в диапазонах от + 4 до + 37 °С используется элемент Пельтье, пропорционально-интегральный регулятор температуры. Микростимуляция срезов осуществляется с помощью биполярных электродов. Регистрация электрической активности срезов производится стеклянными микроэлектродами и усилителем. На установке проведены исследования, которые показали, что при градуальном понижении температуры среза со скоростью 2 °С/мин отчетливо регистрировались снижение амплитуд отдельных компонентов электрогенеза. Данная установка позволяет проводить исследование влияния снижения температуры биообъектов в различных температурных диапазонах и их отогревания на отдельные механизмы электрогенеза в срезах мозга теплокровных.

**Ключевые слова: гипотермия, элемент Пельтье, механизмы электрогенеза**

# INSTALLATION FOR THE STUDY OF HYPOTHERMIC EFFECTS ON THE BRAIN SURVIVING SLICES OF WARM-BLOODED

**[1]Mokrushin A.A., [2]Borovikov S.E.**

*[1]Federal State Institution of Science named I.P. Pavlov Institute of Physiology of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, e-mail: mok@inbox.ru;*
*[2]Military Medical Academy named S.M. Kirov, Clinic of Naval therapy, Saint-Petersburg*

A setup for research hypothermic effects in different temperature ranges on mechanisms electrogenesis of brain slices is presented. The installation consists of a set devices, which ensure the functioning of slices, microstimulation and registration of the electrical activity of biological object also devices system for changing temperature of biological object. Maintaining the viability of the biological object is performed perfusion using saline nutrient solution at a controlled rate. To adjust temperature ranges from + 4 to + 37 °C of biological object used a Peltier element and proportional-integral temperature controller. Microstimulation of slices is carried by means of bipolar electrodes. Registration of electrical activity of slices is produced of glass microelectrodes and amplifier. On the installation conducted the studes, which showed that the gradual lowering temperature of slices at rate of 2 °C/min clearly detected decrease amplitudes individual mechanisms of electrogenesis. The given installation allows to study the temperature influence on individual mechanisms electrogenesis in brain slices of warm-blooded.

**Keywords: hypothermia, Peltier element electrogenesis mechanisms**

Разработка биотехнологий для длительного сохранения жизнеспособных клеток, тканей, органов в состоянии глубокого гипобиоза (криоконсервация) и создание криобанка трансплантатов для хирургических целей является перспективным направлением современной медицины [1, 2, 3]. Для успешной консервации нервной ткани, состоящей из высокоспециализированных клеток, для ее трансплантации в поврежденные структуры мозга (после инсульта, травмы) необходимы точные сведения о влиянии параметров замораживания: скорости охлаждения/отогревания, глубины замораживания, время криоконсервации. В данной работе для реализации программы криоконсервации описана установка для исследования влияния гипотермического воздействия на переживающие срезы мозга.

Установка предназначена для исследования эффектов гипотермии на электрофизиологические характеристики переживающих срезов мозга негибернирующих теплокровных.

Комплекс приборов в установке представлен на рис. 1 и включает следующие элементы: рабочая камера (показана в виде шестиугольника), в которой располагается срез мозга; система подачи перфузионного раствора и кислорода; микроскопа МБС-10; стимулятора ЭСУ1; изолирующего блока и измерителя импульса раздражения (6); предварительного и основного усилителей сигнала и регистратора импульсов (5); из-

мерителя температуры ОВЕН ТРМ202 (1); регулятора температуры (ОВЕН ТРМ12) (3); система охлаждения с элементом Пельтье (4); устройство принудительной циркуляции теплоносителя (2).

Подробно остановимся на работе установки. В рабочей камере, изготовленной из оргстекла, располагаются исследуемый объект (переживающий срез коры мозга) и системы обеспечивающие его жизнедеятельность (снабжение кислородом, перфузионным раствором). Система терморегуляции, осуществляет поддержание определенной температуры и обеспечивает ее измерение для визуального контроля. Для регулировки температуры в широких пределах (от + 4 до + 37 °С) используется элемент Пельтье (ТВ-199-1,4-1,15, Россия), пропорционально-интегральный регулятор температуры ТРМ12 (ОВЕН, Россия), датчик температуры Pt100 (Honeywell Sensing & Control, США), который расположен в непосредственной близости от среза мозга.

Регистрации температуры объекта осуществляется при помощи датчика температуры Pt1000 (Honeywell Sensing & Control, США), и измерителя температуры ТРМ202 (ОВЕН, Россия) с точностью до 0,1 °С.

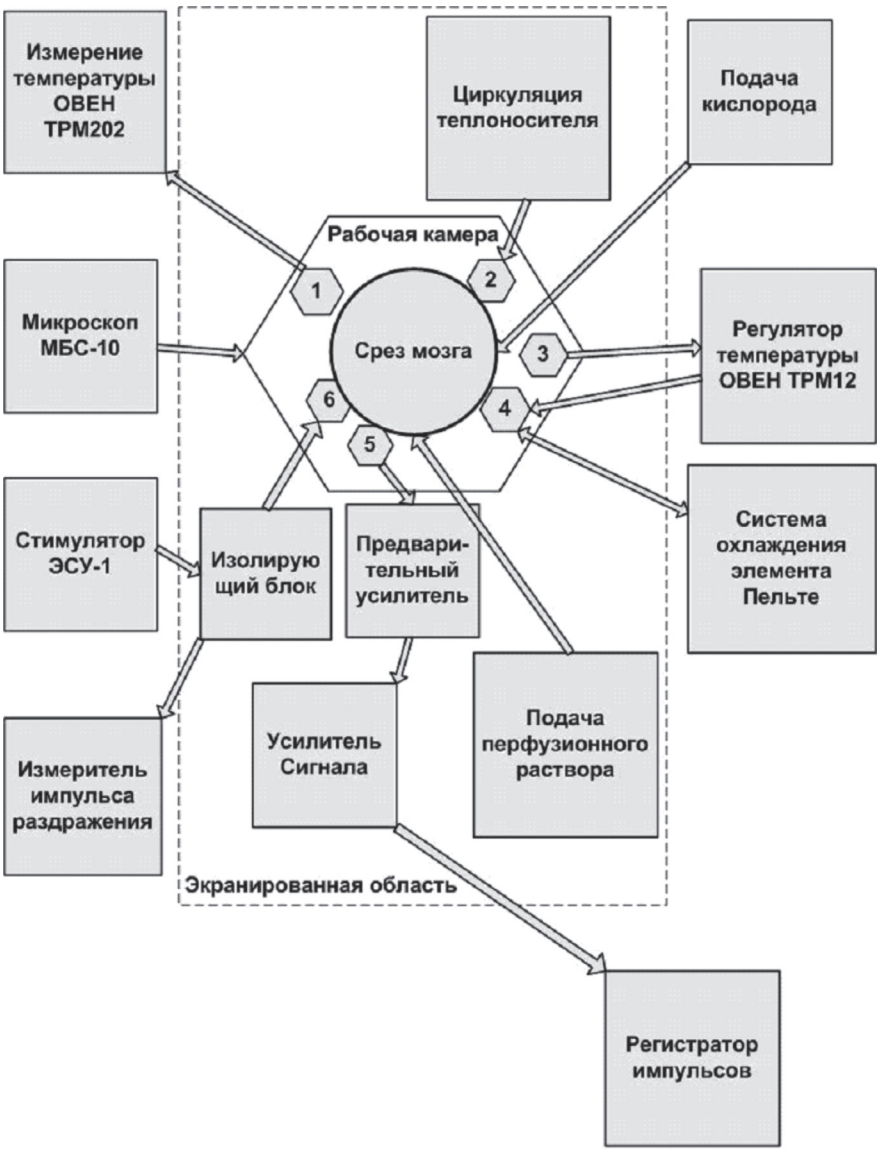


*Рис. 1. Принципиальная схема установки для проведения исследований влияния гипотермии на механизмы электрогенеза в переживающих срезах мозга. Подробное пояснение элементов установки – в тексте*

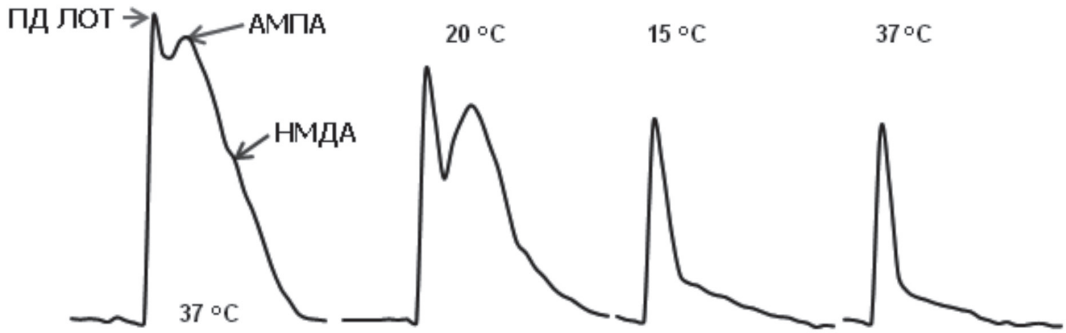


*Рис. 2. Фокальные потенциалы, зарегистрированные в срезах обонятельной коры при градуальном охлаждении до + 15 °C и отогревании до + 37 °C*

С целью отвода тепла, выделяемого от элемента Пельтье при его работе, используется двухконтурная система водяного охлаждения. В первом контуре циркулирует дистиллированная вода с использованием термостата U-10 (Германия). Во втором контуре циркулирует вода централизованного источника водоснабжения. Передача тепла осуществляется через погруженный в воду первого контура теплообменник (змеевик), выполненный из нержавеющей стали.

Для теплообмена между элементом Пельтье и объектом используется камера, заполненная специальным (стерильным) раствором. В ней осуществляется принудительная циркуляция раствора при помощи крыльчатки, приводимой в движение малогабаритным двигателем постоянного тока через понижающий редуктор и магнитную муфту. Такая конструкция обеспечивает надежное перемешивание раствора и необходима для выравнивания градиента температур и предотвращения образования льда на дне камеры.

Обеспечение жизнедеятельности биообъекта осуществляется за счет протекания (перфузии) питательного солевого раствора с регулируемой скоростью, который непосредственно омывает исследуемый биообъект, а также подачи в камеру увлажненного и подогретого до + 37 °C кислорода.

Для исследования активности синапсов и нейронов при изменении температуры и состава перфузионного раствора используются системы микростимуляции и регистрации электрической активности. Для раздражения объекта используется биполярный платиновый электрод, на который подается раздражающий импульс от стимулятора ЭСУ-1 (Россия) через изолирующий блок. Контроль амплитуды и длительности импульса осуществляется осциллографом С1-70 (Россия) через измерительный усилитель.

Регистрация электрических ответов нейронов и синапсов осуществляется стеклянным микроэлектродом, заполненный 1М раствором NaCl с сопротивлением 5 мОм. Электрод присоединяется к высокоомному (входное сопротивление ~ 10 ГОм, Ку = 10) интерфейсу (предусилителю сигнала), размещенному в непосредственной близости от электрода. Затем электрический ответ от срезов поступает в усилитель, коэффициент усиления которого изменяется в пределах от 10 до 1000 и контролируется ждущим осциллографом GDS71022 (GW Instek, Тайвань).

Для визуального контроля объекта и точного размещения стимулирующего и регистрирующего электродов используется микроскоп МБС-10 (Россия). Рабочая камера, система подачи перфузионного раствора и кислорода, а также предварительный и основной усилители расположены на виброзащитной платформе для исключения влияния вибрации от внешних источников. Заземленный экран, окружающий перечисленные выше приборы, защищают каналы усилителей от электромагнитных помех.

Работа установки была испытана в ходе проведения экспериментов. На рис. 2 представлены записи электрической активности (фокальные потенциалы – ФП) переживающих срезов обонятельной коры мозга крыс линии Вистар при изменении температур. Регистрация ФП осуществлялась стеклянными микроэлектродами с сопротивлением 5 мОм. Скорость перфузии питательного солевого раствора составляла 2 мл/мин.

В контрольных нормотермических условиях (+ 37 °C) стимуляция афферентных волокон латерального обонятельного

тракта (ЛОТ) осуществлялась электрическими импульсами длительностью 0,3 мс и амплитудой 40 В. В составе ФП отчетливо идентифицируются отдельные пре- и постсинаптические компоненты ответа: пресинаптический компонент, суммарный потенциал действия волокон ЛОТ (ПД ЛОТ), возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП): АМПА (α-амино-3-гидрокси-5-метилизоксалон-4-пропионовая кислота) и НМДА (*N*-метил-D-аспартат) (рис. 2).

Проведенные исследования показали, что при градуальном понижении температуры среза со скоростью 2ºС/мин отчетливо регистрировались изменения амплитуд отдельных компонентов ФП. Так, при + 20 °С наблюдалось уменьшение амплитуды ПД ЛОТ, АМПА ВПСП по сравнению с соответствующими значениями в контроле при нормотермических условиях. Редукция амплитуды НМДА ВПСП по сравнению с контролем составляла в среднем 50 % (рис. 2).

Слева на ФП указаны отдельные компоненты: ПД ЛОТ – потенциал действия латерального обонятельного тракта; АМПА и НМДА компоненты возбуждающего постсинаптического потенциала. Записи ФП произведены при температурах, отмеченных сверху. Калибровка: 3 мс; 0,5 мВ.

При достижении температуры среза + 15 °С наблюдалось значительное уменьшение амплитуд АМПА и НМДА ВПСП (10 % по сравнению с нормотермическим контролем). Активность проводящих волокон ЛОТ сохранялась, но редуцировалась на 40 % (рис. 2).

Представляло интерес изучить возможность восстановления активности отдельных механизмов электрогенеза в процессе отогревания среза до + 37 °С в течение 1 ч. Как показали результаты проведенных исследований, восстановление активности постсинаптических механизмов (АМПА и НМДА) не наблюдалось (рис. 2). По нашему мнению, эти данные указывают на их необратимое блокирование. Вместе с тем, удалось выявить, что активность проводящих волокон ЛОТ сохранялась на таком же значении, как и при + 15 °С (рис. 2).

Проведенные исследования обнаружили, что резистентность пресинаптических (активность проводящих волокон ЛОТ) к глубокой гипотермии выше, чем активность глутаматергических постсинаптических механизмов (АМПА и НМДА).

Таким образом, представленная выше установка позволяет проводить исследования гипотермических воздействий на отдельные механизмы электрогенеза в переживающих срезах мозга в различных температурных диапазонах. В качестве биообъектов в ней могут быть использованы культуры нервных клеток и ганглии беспозвоночных.

**Список литературы**

1. Sørensen T., Jensen S., Møller A., Zimmer J. Intracephalic transplants of freeze-stored rat hippocampal tissue // J Comp Neurol. – 1986. Vol. 252, № 4. – P. 468-482.

2. Redmond D.E., Roth R.H., Spencer D.D., Naftolin F., Leranth C., Robbins R.J., et al. Neural transplantation for neurodegenerative diseases: past, present, and future // Ann N Y Acad Sci. – 1993. Vol. 695. – P. 258-266.

3. Mokrushin A. Effects cryopreservation of ionotropic glutamatergic receptor mechanisms in vitro // CryoLetters. – 2015. Vol. 36, № 6. – P. 367-377.