

ЗАМОРАЖИВАЮЩИЙ РАСТВОР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АГАРА ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО КРИОСОХРАНЕНИЯ СРЕЗОВ МОЗГА НЕГИБЕРНИРУЮЩИХ ЖИВОТНЫХ

© 2023 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 13.12.2021 г.

После доработки 13.12.2021 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

Ранее нами было обнаружено, что функционирование глутаматергических ионотропных механизмов АМПА (α-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты) и НМДА (N-метил-D-аспартата) нарушались после длительного криосохранения срезов головного мозга крыс при –10°С в течение 30–50 сут. Для выяснения причин криоповреждения АМПА- и НМДА-зависимых механизмов мы исследовали криосохранение срезов обонятельной коры мозга крыс в растворах, состоящих из искусственной цереброспинальной жидкости и агара в различных концентрациях (33, 44 и 50%). После криосохранения срезы отогревались до 37°С и в них были проанализированы изменения амплитуд АМПА- и НМДА-потенциалов, которые отражают активности АМПА- и НМДА-механизмов, по сравнению с значениями до криосохранения. Обнаружено, что АМПА- и НМДА-потенциалы изменялись различно в зависимости от концентрации агара в искусственной цереброспинальной жидкости. В растворах, содержащих 33% агара, амплитуда АМПА-потенциалов увеличивалась на 60%, напротив, амплитуда НМДА-потенциалов была равна значениям до криосохранения. При концентрации агара 44% в растворе наблюдалось увеличение амплитуд АМПА и НМДА на 70 и 80% соответственно. Полное восстановление активностей АМПА- и НМДА-механизмов удалось получить после криосохранения в замораживающем растворе с концентрацией агара 50%. При этих условиях амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов соответствовали их значениям до криосохранения. Таким образом, полученные результаты показывают, что агар, добавленный в раствор искусственной цереброспинальной жидкости, является криопротектором, защищающий АМПА- и НМДА-зависимые механизмы от криоповреждений. Разработанный нами замораживающий раствор (искусственная цереброспинальная жидкость и агар) для криосохранения эксплантатов мозга негиббернирующих животных будет использован для создания криобанка нервной ткани.

Ключевые слова: срезы мозга крыс, криосохранение, агар, АМПА-зависимые механизмы, НМДА-зависимые механизмы, замораживание/отогревание.

DOI: 10.31857/S0006302923020151, EDN: CCKFGL

Известны протективные эффекты влияния низкой температуры на биологические объекты, и их криосохранение широко используется в биомедицине, в том числе в регенеративной медицине, трансплантации органов и разработке лекарств [1, 2]. В настоящее время доминирующим направлением криосохранения нервной ткани является низкотемпературное хранение первичной культуры нейронов [3, 4]. Однако в таких структурах отсутствуют синапсы, то есть нейронная сеть не сформирована. Очевидно, такие ней-

роны будут иметь ограниченное клиническое использование только для восстановления небольших структур мозга при трансплантации. В клинике для восстановления больших участков ткани головного мозга реципиента необходимо задействовать нервную ткань соответствующих структур мозга. Именно эти эксплантаты головного мозга необходимы для трансплантации при таких невропатологиях, как инсульт, эпилепсия и травма. Результаты исследований показали, что криосохраняемые эксплантаты мозга как целостная структура демонстрируют свойства, сравнимые с теми же тканями, полученными от донора [5–8]. Очевидно, что срезы головного мозга являются оптимальными экспериментальными объектами для разработки протоколов криосохране-

Сокращения: АМПА – α-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота; НМДА – N-метил-D-аспартат; ИЦЖ – искусственная цереброспинальная жидкость.

ния нервной ткани и последующего их применения в клинике. Их использование позволяет исследовать восстановление активности не только нейронов, но и ключевых синаптических механизмов.

В наших исследованиях была выявлена различная устойчивость глутаматергических ионотропных α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты (АМПА) и *N*-метил-D-аспартата (НМДА) рецептор-зависимых механизмов к замораживанию/повторному отогреванию срезов головного мозга при криосохранении (-10°C , 52 сут). Активности АМПА-механизмов не только сохранялись, но и увеличивались. Напротив, процессы НМДА-механизмов необратимо ингибировались, что указывает о нарушении их функции [9, 10]. Эти результаты важны, потому что НМДА-механизмы являются ключевыми в системе глутаматергической медиаторной системы мозга. Они являются адаптивными механизмами в головном мозге, участвуют в обучении, формировании следов памяти, а также в развитии различных нейропатологий [11, 12].

Таким образом, изучение особенностей криоповреждения АМПА- и НМДА-механизмов имеет исключительное значение для поддержания активности этих механизмов при криосохранении и создании криобанка трансплантатов. Возникает вопрос, каким образом сохранить активность АМПА и НМДА механизмов в ткани мозга в процессе длительного криосохранения?

Можно предположить, что криопротекторы могут быть использованы для устранения криоповреждений АМПА- и НМДА-механизмов. Однако, как показали результаты исследований, они оказывают выраженное негативное воздействие на нейроны и блокируют синаптические механизмы, поэтому их применение нецелесообразно [13].

Перспективный подход к устранению криоповреждений АМПА- и НМДА-механизмов – использование специальных замораживающих сред (Neurofreezing, CryoStor10 (CS10), Hibernat-A, Hibernat-E, HypoThermosol и др.). Действительно, недавние исследования показали улучшение криосохранения первичных нейронов за счет использования разработанных замораживающих сред. Однако жизнеспособность криосохраненных нейронных культур уменьшалась по сравнению с интактными нейронами, что указывает на снижение эффективности этих растворов [3, 4, 14].

Другим возможным способом сохранения активности АМПА- и НМДА-механизмов может быть использование альгинатных гидрогелей. Они успешно используются в качестве основы для создания криозащитной среды [15]. Для криосохранения клеток при использовании раз-

личных гелей продемонстрировано улучшение выживаемости и сохранение нормальных функций клеток [16, 17]. Однако существенным недостатком таких растворов является присутствие в их составе двухвалентных катионов Ca^{2+} и Sr^{2+} . Эти компоненты блокируют синаптическую активность в донорской ткани и не подходят для криосохранения эксплантатов мозга. Кроме того, использование таких растворов связано с добавлением криопротекторов, которые необратимо нарушают функции нейронов и синапсов, и, как следствие, такие эксплантаты мозга не подходят в качестве донорского материала.

Для успешного криосохранения активностей АМПА- и НМДА-механизмов в настоящем исследовании были изучены протективные эффекты криосохранения срезов обонятельной коры крыс с использованием замораживающих растворов с добавлением агара в различных концентрациях. Известно, что агар как природный полимер используется в биологии и медицине благодаря его биосовместимости и биоразлагаемости. Использование растворов на основе агара для криосохранения нервной ткани срезов представляется весьма перспективным, поскольку он обладает рядом уникальных свойств, связанных с гелеобразованием. Мы полагали, что такие свойства агара будут способствовать сохранению активности АМПА- и НМДА-механизмов при длительном криосохранении.

Таким образом, цель нашего исследования – разработать способ получения замораживающего раствора с агаром и исследовать его протективные свойства для сохранения активности глутаматергических ионотропных АМПА- и НМДА-зависимых механизмов при длительном криосохранении срезов мозга негибернирующих животных – крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали белых крыс-самцов линии Вистар массой 180–200 г (всего 29 животных). Все эксперименты были проведены на крысах из биокolleкции «Коллекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности» Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, поддержанной программой биоресурсных коллекций ФАНО России.

Из мозга крыс с помощью специальных инструментов изготавливали тангенциальные срезы обонятельной коры толщиной 400–500 мкм [18]. Приготовление срезов, их инкубация, состав искусственной цереброспинальной жидкости (ИЦЖ), внеклеточная регистрация АМПА- и НМДА-потенциалов в электрофизиологической установке [9] подробно описаны в предыдущей работе [19].

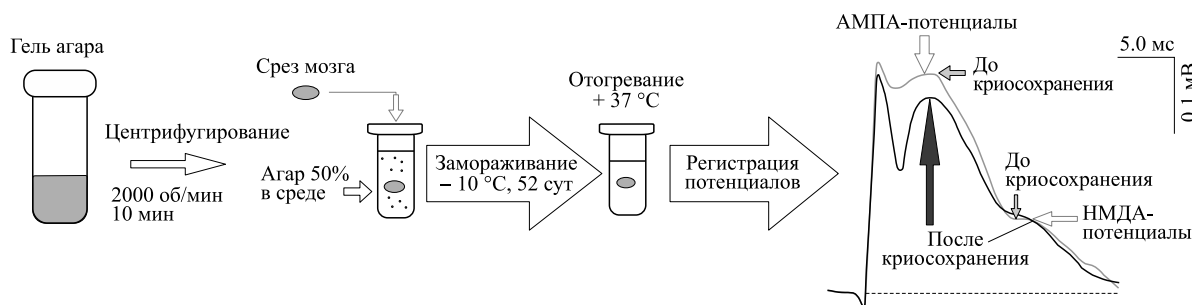


Рис. 1. Схема протокола приготовления замораживающей среды с легкой фракцией агара и регистрация АМПА- и НМДА-потенциалов после криосохранения.

В настоящей работе были исследованы протективные эффекты криосохранения срезов обонятельной коры в замораживающем растворе, состоящем из ИЦЖ и агара в различных концентрациях. Замораживающий раствор для криосохранения срезов готовили в следующей последовательности (рис. 1). Агар Difco Vactor (Difco, США) в количестве 3 г заливали 100 мл 1 М раствора NaCl и выдерживали 10 сут в термостате при 32–35°C. Полученный гелевый раствор центрифугировали на лабораторной центрифуге ЦЛМН-Р10-01 («Элекон», Россия) при скорости 2000 об/мин в течение 10 мин. Легкую фракцию отсасывали из раствора и использовали для приготовления среды для криосохранения срезов. Тяжелую фракцию агара не использовали.

Далее были приготовлены замораживающие растворы для криосохранения срезов следующего состава: 1) 0.5 мл легкой фракции агара и 1.0 мл ИЦЖ (конечная концентрация агара 33%); 2) 0.8 мл легкой фракции агара и 1.0 мл ИЦЖ (конечная концентрация агара 44%); 3) 1.0 мл легкой фракции агара и 1.0 мл ИЦЖ (конечная концентрация агара 50%). Срезы головного мозга помещали в стеклянные флаконы с этими средами. Затем флаконы со срезами постепенно медленно (со скоростью 0.1°C/мин) замораживали до –10°C при в морозильной камере с термостатом ThermoStat plus (Eppendorf, Германия). Через 52 сут флаконы со срезами отогревали до 37°C со скоростью 0.1°C/мин.

Для тестирования жизнеспособности срезов использовали метод оценки электрической активности АМПА- и НМДА-механизмов по значениям амплитуд АМПА- и НМДА-потенциалов. Для этого срезы по одному извлекали из флаконов и помещали в регистрационную камеру электрофизиологической установки для регистрации АМПА- и НМДА-потенциалов [9]. В течение 15 мин срезы перфузировали ИЦЖ без агара. В срезах регистрировали АМПА- и НМДА-потенциалы, значения их амплитуды считали контрольными и принимались за 100%. За это время срезы полностью отмывались от агара. Каждый

срез сначала оценивали визуально с помощью бинокулярного микроскопа МБС–9 («ЛОМО», Россия). Отсутствие разрушения в структурах срезов оценивали как их хорошее состояние. Основным критерием оптимального криосохранения срезов было наличие АМПА- и НМДА-потенциалов, равных по амплитуде потенциалам до криосохранения.

В данном исследовании криопротекторы не использовали, так как они необратимо блокируют активность нейронов и синапсов [13], в том числе активности АМПА- и НМДА-механизмов.

Химические реактивы, использованные для получения замораживающих растворов, были приобретены в фирмах «Химреактив» (Россия) и Difco (США).

Для статистической обработки данных применяли непараметрический *U*-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни. Числовые данные были выражены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Уровень статистической значимости был выбран на уровне $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Данные по криосохранению активности АМПА- и НМДА-механизмов в замораживающем растворе с различной концентрацией агара приведены на рис. 2–4. Представлены протективные эффекты в диапазонах концентраций агара на криосохранение срезов: 33% (10–35%), 44% (37–46%) и 50% (48–55%). Было обнаружено, что активности АМПА- и НМДА-механизмов сохранились на 100% после криосохранения срезов в течение 52 сут при –10°C в замораживающем растворе, состоящем из агара и ИЦЖ. Во-вторых, было обнаружено, что степень восстановления активности АМПА- и НМДА-механизмов после криосохранения зависела от концентрации агара в замораживающем растворе. Эти данные показали, что добавление агара в замораживающий раствор вызывает протективный эффект при криосохранении срезов мозга.

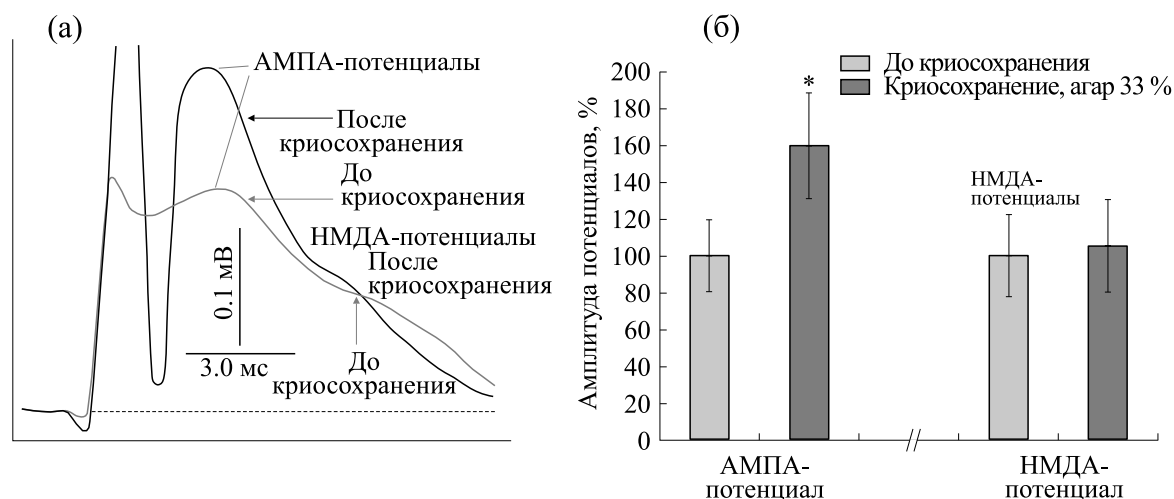


Рис. 2. Изменения АМПА- и НМДА-потенциалов, регистрируемых в срезах мозга до и после криосохранения (-10°C , 52 сут) в замораживающем растворе с агаром в концентрации 33%. Горизонтальная пунктирная линия на рис. 2а – уровень потенциалов, записанный в срезах без стимуляции. Регистрацию проводили при отогревании срезов до 37°C . Калибровка на рис. (а): 3.0 мс, 0.1 мВ. По оси ординат на рис. (б) – амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов при отогревании в % к значениям до криосохранения (контроль – 100%, $n = 7$). * – Различия данных с $p \leq 0.05$ по U -критерию Вилкоксона–Манна–Уитни по отношению к значениям до криосохранения (контроль).

Далее были проанализированы протективные эффекты агара при криосохранении срезов в замораживающем растворе с различными концентрациями агара. При концентрации агара 33% обнаружено, что при повторном нагревании амплитуда АМПА-потенциалов увеличивалась (рис. 2а). Амплитуда суммарного потенциала действующих волокон латерального обонятельного тракта также возрастала. В отличие от амплитуд АМПА-потенциалов амплитуда НМДА-потенциалов полностью восстанавливалась после криосохранения при концентрации агара 33% в замораживающем растворе (рис. 2а).

Из рис. 2 видно, что после криосохранения в замораживающем растворе с концентрацией агара 33% амплитуда АМПА-потенциалов увеличивалась в среднем на $59 \pm 7\%$ ($n = 7$; $p \leq 0.05$, $U = 5$) по сравнению с амплитудой АМПА-потенциалов в контроле (до криосохранения). Это указывает на гиперактивацию АМПА-механизмов после криосохранения (рис. 2б).

Амплитуда НМДА-потенциалов при концентрации агара 33% в замораживающей среде после криосохранения статистически не отличалась от значений до криосохранения и составляла по отношению к контролю (до криосохранения, 37°C) $105 \pm 7\%$ ($n = 7$, $p \leq 0.05$, $U = 4$) (рис. 2б). Однако снижение НМДА-потенциала происходило быстрее, чем до криосохранения (рис. 2а). Это указывает на то, что продолжительность восстановления НМДА-механизмов снижалась. Таким образом, криосохранение срезов в замораживающем растворе с 33%-м агаром разнонаправлено воздействует на АМПА- и НМДА-зависимые ме-

ханизмы: АМПА-механизмы гиперактивируются, тогда как НМДА-механизмы восстанавливаются. На основании полученных данных можно утверждать, что агар в концентрации 33% не является оптимальным для сохранения активности АМПА и НМДА механизмов в процессе длительного криосохранения.

При увеличении концентрации агара в замораживающем растворе до 44% амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов значительно возрастали (рис. 3а). Отметим, что и амплитуда пресинаптического компонента потенциала действия проводящих волокон латерального обонятельного тракта также увеличивалась (рис. 3а).

Анализ изменений АМПА- и НМДА-потенциалов выявил их статистически значимое увеличение на $74 \pm 8\%$ и $87 \pm 9\%$ соответственно ($n = 7$, $p \leq 0.05$, $U = 5$) (рис. 3б). Эти данные указывают на гиперактивацию АМПА- и НМДА-механизмов.

Следовательно, замораживающий раствор с концентрацией агара 44% также не является оптимальным для длительного криосохранения срезов мозга.

Далее концентрация агара в замораживающем растворе была увеличена до 50%. При криосохранении срезов в этих условиях амплитуда АМПА-потенциалов восстанавливалась, но степень восстановления была меньше, чем до криосохранения (рис. 4а). Следует отметить, что амплитуда НМДА-потенциалов после криосохранения при концентрации агара 50% была равна значениям до криосохранения. Амплитуда потенциала действия проводящих волокон латерального обоня-

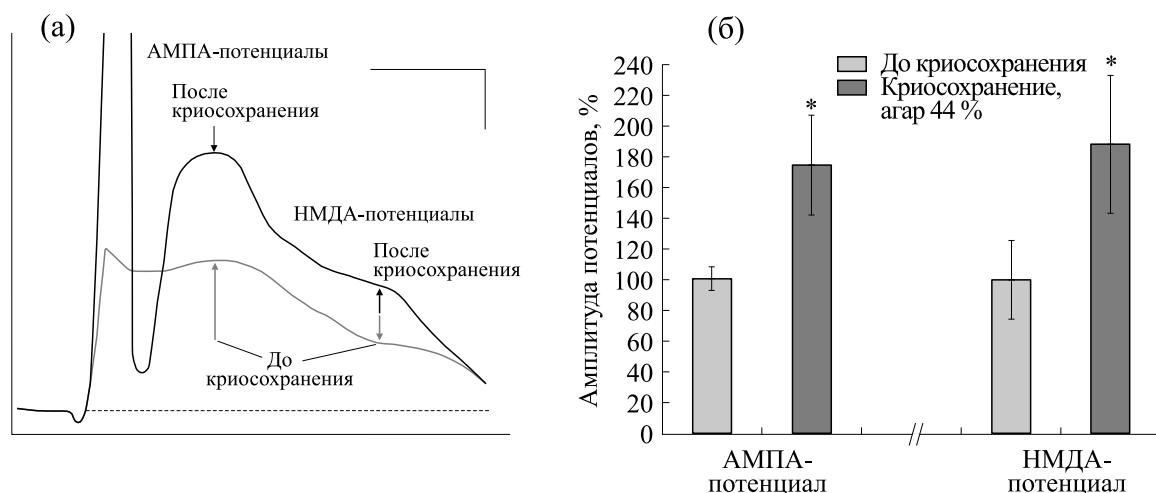


Рис. 3. Изменения АМПА- и НМДА-потенциалов, регистрируемых в срезах мозга до и после криосохранения (-10°C , 52 сут) в замораживающем растворе с агаром в концентрации 44% (а, б). Обозначения те же, что на рис. 2.

тельного тракта также восстанавливалась до исходных значений (рис. 4а).

Анализ суммарных изменений АМПА- и НМДА-потенциалов выявил восстановление активностей этих механизмов: АМПА в контроле (до криосохранения, 37°C) – 100%, после криосохранения – $88 \pm 6\%$ ($p \geq 0.05$, $U = 10$, $n = 7$), т.е. различия статистически недостоверны (рис. 4б). Важно отметить, что амплитуда НМДА-потенциалов после отогревания при концентрации агара 50% была равна значениям до криосохранения: контроль (до криосохранения, 37°C) – 100%, после криосохранения – $97 \pm 9\%$ ($p \geq 0.05$, $U = 12$, $n = 7$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что криосохранение срезов в замораживающем растворе с концентрацией ага-

ра 50% способствует полному сохранению активности как АМПА-, так и НМДА-механизмов. Следовательно, концентрация агара в замораживающем растворе, равная 50%, не вызывает повреждений обоих глутаматергических ионотропных механизмов, выявляемых электрофизиологическим тестированием, и является оптимальной для их длительного криосохранения.

На основании полученных данных были вычислены концентрационные зависимости протективных эффектов агара в замораживающем растворе на изменения амплитуд АМПА и НМДА потенциалов после длительного криосохранения (-10°C , 52 сут) (рис. 5). При сопоставлении данных при разных концентрациях агара с данными при отсутствии агара отчетливо видно многократное усиление протективного эффекта агара в за-

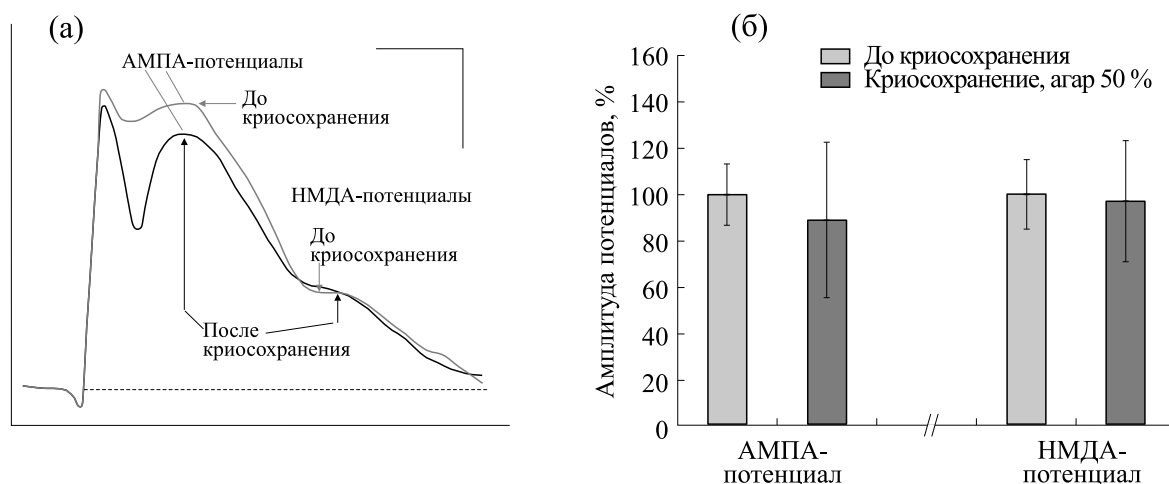


Рис. 4. Изменения АМПА- и НМДА-потенциалов, регистрируемых в срезах мозга до и после криосохранения (-10°C , 52 сут) в замораживающем растворе с агаром в концентрации 50% (а, б). Обозначения те же, что на рис. 2.

мораживающем растворе (рис. 5, стрелки). При этом для АМПА-потенциалов наблюдается снижение гиперактивации. Так, при 0% агара в растворе амплитуда АМПА-потенциалов составляет $480 \pm 22\%$ ($n = 12$), а при 33% агара – $160 \pm 15\%$ ($p \leq 0.05$, U -критерий, $n = 7$). В отличие от АМПА-механизмов, криосохранение с агаром для НМДА-механизмов индуцировало восстановление активности: при 0% агара в растворе амплитуда НМДА-потенциалов составляет $10 \pm 3\%$ ($n = 12$), тогда как при 33% агара – $98 \pm 16\%$ ($p \geq 0.05$, U -критерий, $n = 7$).

Протективные эффекты агара для АМПА- и НМДА-механизмов в диапазонах концентраций 33–50% носят немонокотный куполообразный вид с максимальными значениями при содержании агара 44%. Для АМПА-кривой это возрастание достоверно не отличалось: при концентрации агара 33% – $160 \pm 15\%$, при 44% агара – $170 \pm 18\%$ ($p \geq 0.05$, U -критерий, $n = 7$). При увеличении концентрации агара до 50% амплитуды АМПА-потенциалов снижались до $95 \pm 15\%$ и были близки к значениям до криосохранения – $100 \pm 12\%$ ($p \geq 0.05$, U -критерий, $n = 7$) (рис. 5).

Для НМДА-кривой возрастание амплитуд при концентрации агара 44% составляло $180 \pm 19\%$ и достоверно отличалось как от значений при 33% агара ($95 \pm 18\%$), так при 50% агара ($105 \pm 16\%$, $p \leq 0.05$, U -критерий, $n = 7$). Двукратное увеличение значений амплитуд НМДА-потенциалов при 44% агара в замораживающем растворе свидетельствует об активации НМДА-механизмов в процессе криосохранения с агаром (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе представлен протокол длительного криосохранения срезов головного мозга негипернрирующих животных. Целью исследования было достижение сохранения активности АМПА- и НМДА-механизмов после длительного низкотемпературного криосохранения. Для успешного сохранения активности этих механизмов мы использовали замораживающий раствор, приготовленный из искусственной цереброспинальной жидкости и агара в различных концентрациях. Агар используется в биологических и медицинских исследованиях из-за его свойств биосовместимости и биоразлагаемости и считается подходящим биоматериалом для имитации каркасов внеклеточного матрикса с пористой структурой. В качестве индикаторов активностей АМПА- и НМДА-механизмов мы регистрировали АМПА- и НМДА-потенциалы, вызванных электростимуляцией латерального обонятельного тракта, и анализировали изменения их амплитуд.

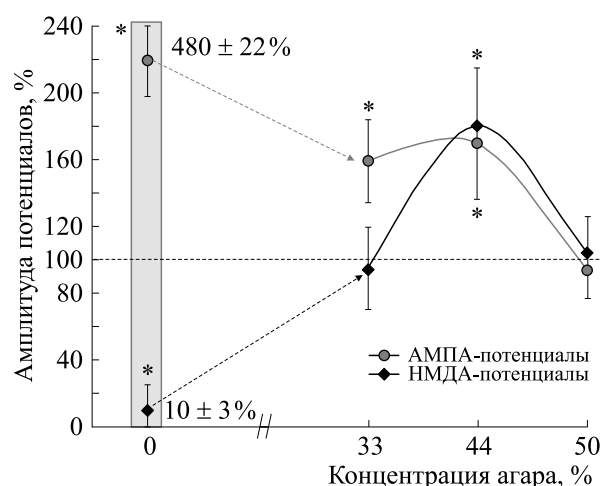


Рис. 5. Протективные эффекты агара в разных концентрациях на амплитуды АМПА- и НМДА-потенциалов после длительного криосохранения (-10°C , 52 сут). По оси абсцисс – концентрация агара в замораживающей среде в %. По оси ординат – амплитуда АМПА- и НМДА-потенциалов в % по отношению к значениям до криосохранения (100%, пунктирная линия). При концентрации агара 0% в замораживающем растворе точка амплитуд АМПА-потенциалов расположена условно, поскольку ее значения не соответствуют шкале ординат. Серые пунктирные стрелки демонстрируют усиление протективного эффекта при добавлении агара в замораживающий раствор. * – Данные отличаются с $p \leq 0.05$ по отношению к значениям до криосохранения (контроль) для АМПА- и НМДА-потенциалов, U -критерий Вилкоксона–Манна–Уитни; $n = 12$ для 0%, $n = 7$ для 33, 44 и 50%.

Полученные данные доказывают, что криосохранение срезов в замораживающем растворе с агаром способствовало 100%-му сохранению активности АМПА- и НМДА-механизмов в процессе длительного криосохранения (-10°C , 52 сут). Отметим, что при криосохранении срезов в ИЦЖ (без агара) сохранялись только активности АМПА-механизмов, напротив, активности НМДА-механизмов необратимо блокировались.

Мы использовали различные концентрации агара в замораживающем растворе, чтобы получить полное восстановление этих механизмов после криосохранения. В результате проведенных исследований было выявлено, что степень восстановления АМПА- и НМДА-механизмов после криосохранения срезов в замораживающем растворе была наиболее оптимальной при концентрации агара 50%. При этой концентрации агара активности АМПА и НМДА механизмов полностью сохранялись.

Представленные данные свидетельствуют о протективном свойстве агара при криосохранении срезов мозга. Известно, что криопротекторы бывают двух основных типов – проникающие и непроникающие [20, 21].

К первым относят криопротекторы, проникающие внутрь клетки. Их молекулярная масса не превышает 100 Да. Проникающие криопротекторы препятствуют формированию кристаллов льда в процесс замораживания [22]. Наиболее распространенные проникающие криопротекторы – это диметилсульфоксид, глицерин, пропиленгликоль, этиленгликоль и др. Все они являются токсичными при воздействии на нервные клетки и синапсы [13] и в наших исследованиях по этой причине не использовались.

Ко второму типу относят криопротекторы с молекулярными весами в десятки-сотни кДа, не проникающие внутрь клеток. Они менее токсичны, чем проникающие криопротекторы при равных концентрациях [21]. Предполагают, что они притягивают и абсорбируют воду извне мембраны, тем самым снижая ее вязкость, способствуют возрастанию скорости обезвоживания и препятствуют образованию внутриклеточных кристаллов льда и осмотических изменений [23, 24]. К непроникающим криопротекторам относят две группы веществ – олигосахариды (наиболее часто используют сахарозу и трегалозу) и высокомолекулярные соединения (фиколл, альбумин, поливинилпирролидон).

В соответствии с представленными выше данными агар по величине молекулярного веса (32–200 кДа) агар следует отнести к непроникающему типу криопротекторов, подобно олигосахаридам, например трегалозе (342 кДа). По химической природе агар является биополимером, макромолекулы которого образованы двумя полисахаридами – агарозой и агаропектином. Агароза, входящая в состав агара (50–80%), представляет собой линейный полисахарид и рассматривается как менее высокомолекулярная фракция полимера, тогда как агаропектин имеет сетчатую структуру с большей молекулярной массой [25–31].

Обнаружено, что агар в водных растворах образует сложную многоуровневую структуру. При ее формировании полимер проявляет высокую гидратационную способность, позволяющую создавать устойчивые структуры с молекулами воды даже при низких концентрациях полимера [25, 32, 33]. Благодаря большой поверхности агара при его контакте с водным раствором происходит быстрая диффузия в полимерную структуру как молекул воды, так и растворенных в ней веществ [34]. Очевидно, что такие свойства индуцируют абсорбцию полимером молекул воды из внеклеточного пространства срезом. Полагаем, что благодаря этому свойству агара проявляется защита мембран нервных клеток от осмотических напряжений, уменьшение образования кристаллов льда и их разрушительного воздействия на мембраны в процессе криосохранения.

Другой защитный механизм агара проявляется в образовании межмолекулярных связей между сульфатными группами полимерных цепей агара и ионами кальция [35]. Это важное свойство, поскольку в процессе замораживания нервных клеток может многократно усиливаться вход кальция внутрь клеток, что вызывает нарушение их функционирования и даже гибель. Кроме ионов кальция агар взаимодействует с другими ионами [31], что способствует защите нейронов от осмотических изменений, вызываемых перераспределением катионов между внутриклеточным содержанием клеток и внеклеточным пространством.

В наших опытах был выявлен нелинейный характер зависимостей протективных эффектов АМПА- и НМДА-активностей от концентраций агара в замораживающем растворе. Такая зависимость, по-видимому, отражает различные взаимодействия молекул полимера с рецепторными структурами. Полагают, что такие (протективные) свойства агара, как абсорбция воды и связывание ионов агаром, существенно зависят от его концентрации в водном растворе. При малых концентрациях агара наибольшее число межмолекулярных связей приводит к взаимодействию агара с водой, что усиливает абсорбцию молекул воды из срезов. Повышение концентрации агара создает условия для усиления образования цепочек «агар–агар». Это способствует переходу раствора полимера в более однородную структуру, усилению диффузии воды и отрицательных и положительного заряженных ионов в полые структуры агара [32]. Следует принять во внимание, что процессы формирования структуры агара и его взаимодействия с АМПА- и НМДА-рецепторами будут меняться в различных фазах процесса криосохранения (замораживание–хранение–отогревание). Эти физические воздействия на АМПА- и НМДА-рецепторы, очевидно, будут отражаться на их функционировании в зависимости от используемых концентраций агара.

В практическом плане использования агара для криосохранения срезов следует обратить внимание на удаление полимера от срезов. Этот процесс имеет существенное значение для защиты структур срезов от механических воздействий. При этом следует учитывать, что в агаре присутствуют низко и высокомолекулярные фракции, которые могут по-разному влиять на функционирование нейронов и синапсов. В результате проведенных исследований было обнаружено, что при плавном медленном отогревании (0.1°C/мин) и отмывании срезов со скоростью 1 мл/мин с ламинарным характером течения протекающего солевого раствора (ИЦЖ) гелевый раствор агара удаляется без негативных (механических) влияний на функционировании срезов. При достижении 37°C АМПА- и НМДА-потенциалы стабильно регистрировались в срезах. Оп-

тимальность использования нашего приема была подтверждена результатами других исследователей. Было установлено, что гелевая структура агара при отмывании разрушается поэтапно: сначала удаляются низкомолекулярные, а затем высокомолекулярные фракции. При этом повышение температуры раствора ускоряет данный процесс [31].

Представленные выше данные свидетельствуют о выраженных протективных свойствах агара, разумеется, необходимы дальнейшие исследования механизмов его действия, повышению их эффективности для использования в процессах криосохранения эксплантатов мозга эндодермов.

ВЫВОДЫ

Представленные данные доказывают, что агар в замораживающем растворе можно рассматривать как криопротектор, который защищает АМПА- и НМДА-механизмы от криоповреждений. Мы полагаем, что наш протокол криосохранения эксплантатов головного мозга (срезов) негиберирующих теплокровных животных в замораживающем растворе с агаром будет способствовать созданию биобанка, который станет постоянным и надежным источником нервной ткани для клинического использования в терапии нейропатологий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает признательность Г.П. Смирновой за помощь при проведении экспериментов, а также С.Е. Боровикову за техническую помощь в наладке и обслуживании электрофизиологической установки.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты на животных проводили с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенных European Communities Council Directive (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 этического кодекса Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (1996 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. J. Paynter, *Brain Res. Bull.*, **75**, 1 (2008).
2. S. Bojic, A. Murray, and B. L. Bentley, *BMC Biol.*, **19** (1), 56 (2021).
3. S. S. Parker, A. Moutal, and S. Cai, *eNeuro*, **5**, 0135 (2018).
4. F. Pischedda, C. Montani, and J. Obergasteiger, *Front. Cell Neurosci.*, **12**, 81 (2018).
5. J. Fang and Z. X. Zhang, *Cryobiology*, **29**, 267 (1992).
6. D. Petite and M. C. Calvet, *Brain Res.*, **747**, 279 (1997).
7. T. J. Collier, M. J. Gallagher, and C. D. Sladek, *Brain Res.*, **623**, 249 (1993).
8. S. Jensen, T. Sorensen, and J. Zimmer, *Cryobiology*, **24**, 120 (1987).
9. А. А. Мокрушин и С. Е. Боровиков, *Международ. журн. прикл. фонд. исслед.*, **2** (2), 214 (2017).
10. А. А. Mokrushin, *Biol. Bull.*, **47**, 71 (2020).
11. T.P. Obrenovitch and J. Urenjak, *Progr. Neurobiol.*, **51**, 39 (1997).
12. S. F. Traynelis and S. D. Cull-Candy, *Nature*, **345**, 347 (1990).
13. Ю. И. Пичугин, *Теоретические и практические аспекты современной криобиологии* (Москва, 2013).
14. A. G. E. Day, K. S. Bhangra, and C. Murray-Dunning, *Tissue Engineering: Part C Methods*, **23**, 575 (2017).
15. C. Zhang, Y. Zhou, and L. Zhang, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3330 (2018).
16. E. E. Benson, K. Harding, and M. Ryan, *Cryoletters*, **39**, 14 (2018).
17. S. Schneider and H. H. Klein, *Eur. J. Med. Res.*, **16**, 396 (2011).
18. М. И. Митюшов, Н. А. Емельянов, А. А. Мокрушин и др., *Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрохимического исследования* (Наука, Л., 1986).
19. А. А. Мокрушин, *Биофизика*, **66** (5), 954 (2021).
20. B. Wowk, <https://www.alcor.org> (2007).
21. K. Matsumura, F. Hayashi, and T. Nagashima, *Commun. Mater.*, **2**, 15 (2021).
22. D. Pegg, *Cryopreservation in Essentials of Tissue Banking*, Ed. by G. Galea (Springer Netherlands, 2010).
23. P. J. Stiff, A. J. Murgu, and C. G. Zaroulis, *Cryobiology*, **20**, 17 (1983).
24. A. Stolzing, Y. Naaldijk, and V. Fedorova, *Transfus. Apher. Sci.*, **46**, 137 (2012).
25. Б. П. Шипунов и В. И. Маркин, *Химия растительного сырья*, № 1, 73 (2020).
26. А. И. Усов, *Химия растительного сырья*, № 2, 7 (2021).
27. A. I. Usov, *Adv. Carbohydrate Chem. Biochem.*, **65**, 115 (2011).
28. C. Delattre, T. A. Fenoradosoa, and P. Michaud, *Brazil. Arch. Biol. Technol.*, **54** (6), 1075 (2011).
29. A. M. Sousa, J. Borges, and A. F. Silva, *Carbohydrate Polymers*, **96** (1), 163 (2013).

30. T. Matsuhashi, *Agar/Food Gels*, Ed. by Harris (Dordrecht, 1990).
31. В. А. Евтушенко и Г. В. Варфаломеева, *Высокомолекуляр. соединения*, **5**, 1867 (1963).
32. Б. П. Шипунов, В. Е. Коптев, и В. И. Маркин, *Химия растительного сырья*, № 1, 53 (2018).
33. А. И. Usov, *Food Hydrocolloids*, **12** (3), 301 (1998).
34. Е. А. Анциферов, Е. В. Кудрявцева и А. А. Соболева, *Вестн. Иркутского гос. техн. ун-та*, **6** (46), 171 (2010).
35. О. А. Максимова и В. В. Митин, *Пищевая промышленность*, **7**, 45 (2013).

Agar Freezing Solution for Long-Term Cryopreservation of Brain Slices from Non-Hibernating Animals

A.A. Mokrushin*

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

Our previous studies have shown that function of ionotropic glutamate receptors such as AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid) and NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) was impaired after long-term cryopreservation of brain slices at -10°C within 30–50 days. To elucidate the reasons for cryo-damage to AMPA- and NMDA-dependent mechanisms, artificial cerebrospinal fluid (aCSF) solutions that contain agar at different concentrations (33, 44, and 50%) were used for cryopreservation of the rat olfactory cortex slices. After cryopreservation, the slices were warmed to 37°C and the amplitudes changes of AMPA and NMDA potentials, which reflected the activities of the AMPA and NMDA mechanisms, were evaluated; the results were compared with those obtained before cryopreservation. It was found that AMPA and NMDA potentials changed differently depending on the concentration of agar in artificial cerebrospinal fluid. In solutions with 33% agar, the amplitude of AMPA potentials increased by 60%, whereas, in contrast, the amplitude of NMDA potentials was equal to the values before cryopreservation. At agar concentration of 44% in the solution, the AMPA and NMDA amplitudes were increased by 70% and 80%, respectively. A complete recovery of the activities of AMPA and NMDA mechanisms was obtained after cryopreservation in a freezing solution with an agar concentration of 50%. Under these conditions, the amplitudes of the AMPA and NMDA potentials corresponded to those seen before cryopreservation. Thus, the results obtained indicate that agar added to the artificial cerebrospinal fluid solution is a cryoprotectant that protects AMPA- and NMDA-dependent mechanisms from cryoinjury. The freezing solution (artificial cerebrospinal fluid and agar) developed by us for cryopreservation of brain explants of non-hibernating animals will be used to create a cryobank of nervous tissue.

Keywords: rat brain slices, cryopreservation, agar, AMPA-dependent mechanisms, NMDA-dependent mechanisms, freezing/warming