

## УЛУЧШЕНИЕ КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОГО СОСТАВА СРЕДЫ ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО И ОБРАТИМОГО КРИОСОХРАНЕНИЯ СРЕЗОВ МОЗГА КРЫС

© 2022 г. А. А. Мокрушин\*

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

\*E-mail: mok@inbox.ru

Поступила в редакцию 30.07.2021 г.

После доработки 25.08.2021 г.

Принята к публикации 27.08.2021 г.

Ранее было обнаружено, что активность глутаматергических ионотропных *N*-метил-D-аспаратных рецепторов (NMDAR) после длительного криосохранения срезов мозга при температуре  $-10^{\circ}\text{C}$  снижалась или блокировалась. Срезы обонятельной коры крыс использовали для изучения механизмов криповреждения NMDAR. Для восстановления активности NMDAR после криосохранения исследовали эффекты изменения внеклеточного pH замораживающей среды при регистрации NMDA-потенциалов, вызываемых электрической стимуляцией латерального обонятельного тракта. Обнаружено, что после криосохранения замораживающая среда закислялась до pH 6.5, при этом амплитуда NMDA-потенциалов снижалась по сравнению с амплитудами до криосохранения. Для сохранения активности NMDAR после криосохранения была усилена буферная емкость замораживающего раствора применением гибридной буферной системы, включающей карбонатный буфер ( $\text{NaHCO}_3$ ), фосфатный ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) и трис(гидроксиэтил)аминометан ( $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ ); солевой состав при использовании такой буферной системы не менялся. После криосохранения срезов в такой среде амплитуда NMDA-потенциалов составляла  $22 \pm 7\%$  по сравнению с амплитудой до криосохранения. Дополнительно использовали способ увеличения pH среды до 7.6–7.7 в процессе замораживания срезов в интервале температур 20–22 $^{\circ}\text{C}$ . Это сопровождалось восстановлением активности NMDAR. Таким образом, применение гибридной буферной системы в замораживающей среде и одновременное увеличение ее pH до 7.6–7.7 способствовало восстановлению NMDAR после криосохранения.

**Ключевые слова:** срезы мозга, NMDA-потенциалы, криосохранение, буферные системы

**DOI:** 10.31857/S0041377122010084

Криосохранение – перспективная биотехнология, позволяющая длительное время сохранять биологический материал в жизнеспособном состоянии при низких температурах и создавать криобанк для трансплантатов (Ichikawa et al., 2007; Morris, 2007; Raunter, 2008; Ma et al., 2010). Методы криосохранения сложноорганизованных органов и тканей, например, нервной системы, пока детально не разработаны. Срезы головного мозга являются оптимальными объектами для экспериментального изучения закономерностей длительного и обратимого криосохранения нервной ткани.

Ранее наши эксперименты показали, что при медленных скоростях охлаждения срезов обонятель-

ной коры ( $0.1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) активность глутаматергического ионотропного *N*-метил-D-аспаратного рецептора (NMDAR) сохранялась, однако при длительном криосохранении она блокировалась (Mokrushin et al., 2014; Мокрушин, 2016).

NMDAR относят к семейству ионотропных глутаматергических механизмов. Эти рецепторы являются ключевыми структурами возбуждающей глутаматергической медиаторной системы в мозге. Они участвуют в различных формах адаптивных реакций, таких как обучение, формирование следов памяти, а также при развитии патологий (инсульт, травма, эпилепсия) (Obrenovitch, Urenjak, 1997; Cull-Candy, Leszkiewicz, 2004; Traynelis et al., 2010). NMDAR являются наиболее уязвимыми структурами по сравнению с AMPAR и проводящими волокнами латерального обонятельного тракта (ЛОТ) при различных стрессорных воздействиях, включая замораживание (Мокрушин, 2016).

**Принятые сокращения:** ЛОТ – латеральный обонятельный тракт; Трис-HCl – трис(гидроксиэтил)аминометан; ФП – фокальные потенциалы; AMPA – альфа-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовая кислота; AMPAR – рецептор AMPA; CNQX – 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-дион; D-APV – D-2-амино-5-фосфоновалериат; NMDA – *N*-метил-D-аспарат; NMDAR – рецептор NMDA.

Нами была высказана гипотеза, что в процессе криосохранения и последующего отогревания клетки срезов мозга (без их электрической активации) выделяют во внеклеточную среду метаболиты, которые изменяют внеклеточное значение pH и, соответственно, активность рецепторных структур. Очевидно, что для устранения нарушений функций NMDAR во время криосохранения необходимо оптимизировать состав замораживающей среды и, прежде всего, ее кислотно-щелочные показатели.

Цель нашей работы заключалась в сохранении активности NMDAR после долговременного криосохранения (30 сут) при низкотемпературном замораживании ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) при помощи изменения pH замораживающей среды.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Животные.** Все эксперименты проводили на белых крысах-самцах линии Wistar массой 180–200 г. Использовано 29 животных. Они содержались в помещении вивария (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН) при свободном доступе к воде и пище с 12-часовым циклом ночь/день. Эксперименты с животными проводили в соответствии с рекомендациями по этике, предложенными Директивой Совета Европейских сообществ (86/609 ЕЕС).

**Приготовление срезов.** Исследования проведены на тангенциальных срезах обонятельной коры головного мозга крыс-самцов толщиной 400–500 мкм. Срезы мозга включают нейроны пириформной коры, глутаматергические синапсы и проводящие нервные волокна латерального обонятельного тракта (ЛОТ). Приготовление срезов происходило следующим образом. Крыс декапитировали при помощи гильотины (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН). Хирургическими инструментами извлекали головной мозг и помещали его на фильтровальную бумагу, покрывающую металлический столик, охлажденный до  $4^{\circ}\text{C}$ . При помощи специального резака (Митюшов и др., 1986; Мокрушин, 1997) готовили срезы обонятельной коры мозга. Кисточкой срез переносили во флакон с искусственной цереброспинальной аэрированной жидкостью (состав см. ниже) объемом 1 мл. Длительность всей процедуры приготовления среза от момента декапитации до его помещения в среду составляла 1–1.5 мин.

После помещения среза во флакон газовую атмосферу над жидкостью со срезом в течение 1 мин продувания заменяли на кислород. Флакон со срезом устанавливали в аппарат Варбурга (Германия) с частотой качаний 120 в 1 мин при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  в месте нахождения среза до его перемещения в регистрирующую камеру электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017). Искусственный церебральный раствор для поддержания жизнедеятельности срезов и последующего их замораживания имел следующий состав (мМ): 124.0 NaCl; 5.0 KCl;

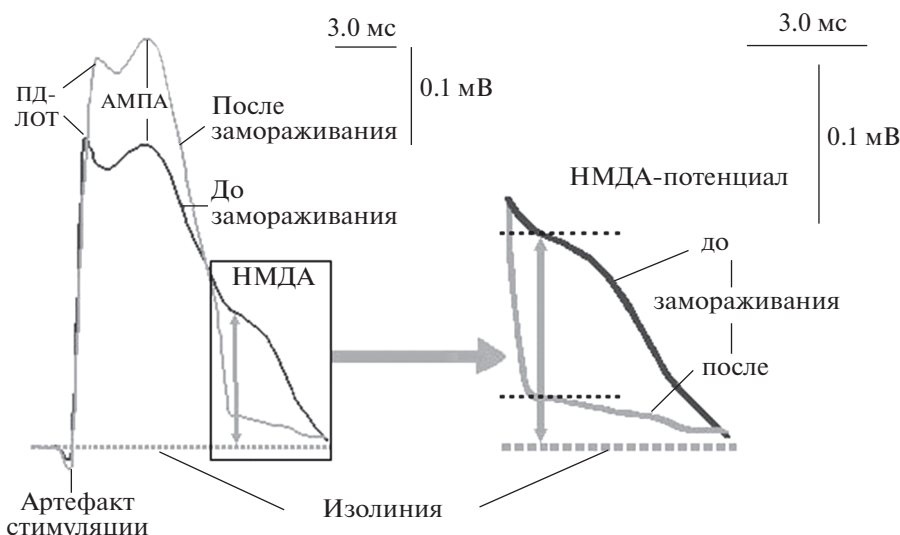
2.6 CaCl<sub>2</sub>; 1.24 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.2 MgSO<sub>4</sub>; 3.0 NaHCO<sub>3</sub>; 10.0 глюкозы; pH 7.3 при  $37^{\circ}\text{C}$ .

**Определение активности NMDAR.** В ответ на электрическую стимуляцию ЛОТ в нормотермических условиях внеклеточно регистрируются фокальные потенциалы (ФП), которые отражают суммарную активность нейронов пириформной коры и волокон ЛОТ. Без стимуляции ЛОТ спонтанная активность в срезах не регистрируется. ФП является многокомпонентным потенциалом и состоит из пресинаптического компонента, который отражает активность проводящих волокон ЛОТ – суммарный потенциал действия ЛОТ (ПД-ЛОТ), и постсинаптических компонентов, которые отражают активацию глутаматергических ионотропных механизмов – AMPAR и NMDAR (рис. 1). В настоящей работе изучали изменения только активности NMDAR. Эти потенциалы были идентифицированы ранее (Мокрушин, 1997; Mokrushin, Pavlinova, 2013). Выявление NMDA-компонента в ФП в нормотермических условиях производили при воздействии специфического антагониста D-APV (50 мкМ) (рис. 1).

**Измерение pH среды.** Измерение pH замораживающей среды осуществляли с помощью pH-метра Seven Compact S220 (Mettler Toledo, США). Значения pH определяли с точностью до 0.1. Температуру среды со срезами до и после замораживания при регистрации NMDA-потенциалов измеряли с помощью прибора “Измеритель пид-регулятор ТРМ12” (Россия). Модификацию pH замораживающей среды и регистрацию NMDA-потенциалов до и после криосохранения проводили в параллельных экспериментах. Одновременное измерение этих параметров на срезах приводило к неконтролируемому искажению данных как pH, так и NMDA-потенциалов.

**Протокол криосохранения** срезов заключался в следующем. Искусственный цереброспинальный раствор с ионным составом (описан выше) приготавливали на гибридной буферной системе: карбонатный буфер (NaHCO<sub>3</sub>), фосфатный буфер (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) и Трис-HCl.

В срезах до замораживания регистрировали амплитуды NMDA-потенциалов (мкВ) стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl, с сопротивлением 1–5 МОм. Эти потенциалы регистрировали в ответ на одиночные электрические импульсы (ЭСУ-1, Россия) ЛОТ прямоугольной формы, длительностью 0.1 мс, интенсивностью 1–3 В и частотой 0.003 Гц при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 20 мин. Регистрацию проводили в проточной камере электрофизиологической установки (Мокрушин, Боровиков, 2017) с использованием усилителя (НТО, Россия). Потенциалы оцифровывали на аналого-цифровом приборе (Е 20–10, Россия) и обрабатывали с помощью компьютерной программы “Анализ электрической активности нейронов” (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Россия). Полученные значения амплитуд NMDA-потенциалов (мкВ) рассматривали как контрольные перед замораживанием и



**Рис. 1.** Потенциалы, регистрируемые в нейронах срезов обонятельной коры крыс в ответ на электрическую стимуляцию латерального обонятельного тракта (ЛОТ). На потенциалах даны обозначения всех компонентов. Артефакт стимуляции отражает нанесение электрического стимулирующего импульса; пресинаптический суммарный потенциал действия (ПД-ЛОТ) — активацию проводящих волокон ЛОТ; постсинаптические компоненты: ранний АМРА-потенциал и поздний NMDA-потенциал. Проанализированы изменения только NMDA-потенциалов. Потенциалы зарегистрированы до (*серая линия*) и после (*черная линия*) криосохранения (КС) (30 сут при  $-10^{\circ}\text{C}$ ). *Вертикальная серая стрелка* — амплитуда NMDA-потенциалов в точке 8 мс от артефакта стимуляции. На *вставке* в увеличенном масштабе показаны амплитуды NMDA-потенциалов до и после КС. *Черные штриховые горизонтальные линии* — амплитуды NMDA-потенциалов до и после КС. Калибровка указана.

принимали за 100%. Затем срезы замораживали при медленной скорости ( $0.1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) до  $-10^{\circ}\text{C}$  и хранили в морозильнике термостата “ThermoStat plus” (Eppendorf, Германия). Через 30 сут криосохранения срезы отогревали до  $37^{\circ}\text{C}$  с такой же скоростью, при этом солевой состав среды не менялся. Вновь регистрировали NMDA-потенциалы (мкВ) и выражали в % по отношению к значениям до замораживания.

**Химические реактивы** предоставлены компанией Химреактив (Россия).

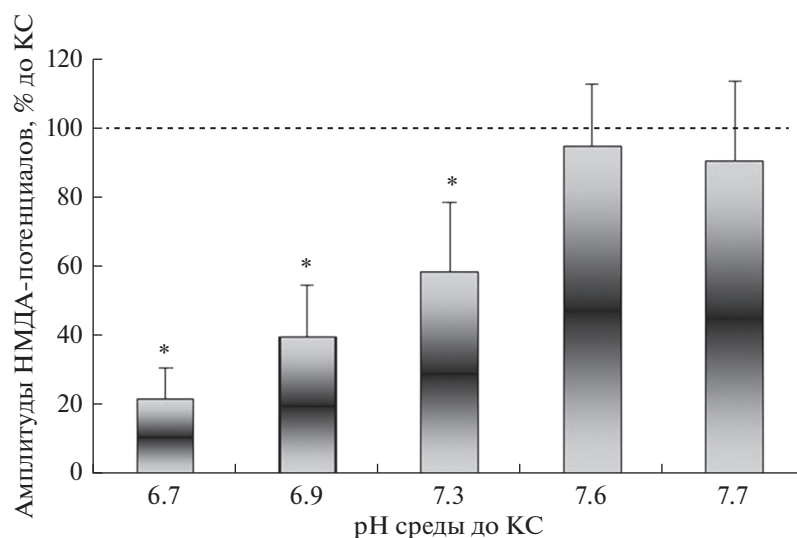
**Статистическую обработку** изменения амплитуд NMDA-потенциалов проводили с использованием непараметрического параметра Вилкоксона—Манна—Уитни (*U*-критерия). Цифровые данные выражали как среднее значение и его стандартная ошибка. Уровень статистической значимости составлял  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для устранения нарушений функций NMDAR при криосохранении и последующем отогревании были исследованы эффекты гибридной буферной системы, состоящей из трех компонентов: карбоната ( $\text{NaHCO}_3$ ), фосфата ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) и Трис-НСI в замораживающей среде для криосохранения срезов мозга. Солевой состав среды до и после криосохранения и последующего отогревания не изменялся.

На рис. 1 представлены ФП, записанные после 30 сут криосохранения и последующего отогревания до температуры  $37^{\circ}\text{C}$  в среде такого же состава, как при замораживании. Амплитуда NMDA-потенциала (рис. 1, *вставка*) уменьшалась после отогревания и составляла  $28 \pm 7$  против  $130 \pm 11$  мкВ до замораживания ( $p \leq 0.05$ ,  $U = 7$ ,  $n = 12$ ). Среднее снижение амплитуд NMDA-потенциалов составило 78% по сравнению с амплитудой до криосохранения. При исследовании ранее эти потенциалы отсутствовали, что указывает на ингибирование активности NMDAR (Mokrushin, 2016; Мокрушин, Боровиков, 2017). Следовательно, усиление буферной емкости замораживающей среды при помощи Трис-НСI, который играет ключевую роль в долгосрочном поддержании кислотно-щелочного баланса в срезах мозга, не способствует полному восстановлению активности NMDAR после криосохранения.

Для выяснения причин снижения активности NMDAR после криосохранения и отогревания мы исследовали изменение внеклеточного pH замораживающей среды. Результаты выявили, что после продолжительного криосохранения ( $-10^{\circ}\text{C}$  при медленной скорости замораживания  $-0.1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) и последующего отогревания с той же скоростью происходит закисление pH среды при отогревании до значений pH 6.5–6.7. Мы полагали, что такое снижение pH среды приводит к редукции амплитуд NMDA-потенциалов. Действительно при этих значениях pH



**Рис. 2.** Амплитуда NMDA-потенциалов до криосохранения (КС) при 37°C в зависимости от значения рН замораживающей среды.  $n = 5$  (при рН 6.7 и 7.7);  $n = 7$  (рН 6.9);  $n = 12$  (рН 7.3);  $n = 9$  (рН 7.6). Амплитуда NMDA-потенциалов выражена в % от значения до КС, принятого за 100% (горизонтальная штриховая линия). Различия амплитуд NMDA-потенциалов по сравнению с значениями до КС определяли с помощью непараметрического  $U$ -критерия Вилкоксона–Манна–Уитни,  $p \leq 0.05$  (\*).

амплитуда NMDA-потенциалов снижалась. Так, до замораживания амплитуда NMDA-потенциала составляла 140 мкВ, а при отогревании снижалась и становилась равной 36 мкВ ( $p \geq 0.05$ ,  $U = 11$ ,  $n = 12$ ), то есть редукция NMDA-потенциалов составляла 75% по отношению к значениям до замораживания. Отметим, что при этом солевой состав замораживающей среды не менялся.

Для проверки изменения активности NMDAR и устранения криповреждения их функций мы исследовали эффекты замораживающих сред с различными значениями рН. Эксперименты проводили в следующей последовательности. Перед замораживанием срезы содержали в средах с различными значениями рН. В каждой среде измеряли амплитуды NMDA-потенциалов при 37°C (рис. 2). Было выявлено, что амплитуда NMDA-потенциала возрастала с увеличением рН среды перед криосохранением. Важно отметить, что амплитуда NMDA-потенциалов при рН 7.6–7.7 в среде после отогревания статистически не отличалась от значений до криосохранения (рис. 2). Следовательно, интервал значений рН среды 7.6–7.7 является оптимальными для длительного криосохранения и последующего отогревания срезов.

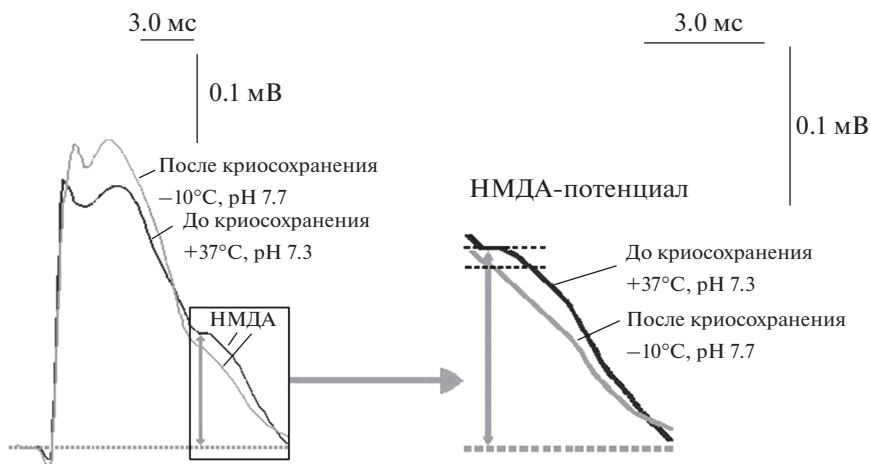
Однако необходимо учитывать, что срезы до замораживания находятся в среде, у которой рН 7.3 (оптимальный для функционирования NMDAR), поэтому для защиты активности NMDAR мы использовали метод увеличения значения рН до 7.6–7.7 при достижении температуры 20–22°C в процессе замораживания срезов от 37°C.

Используя прием смены замораживающей среды, мы обнаружили, что амплитуда NMDA-потенциалов составляла  $131 \pm 9$  мкВ, а после криосохранения и последующего отогревания была  $121 \pm 10$  мкВ (рис. 3). Статистически эти значения не отличались от значений до криосохранения ( $p \geq 0.05$ ,  $U = 29$ ,  $n = 12$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы изучали действие кислотно-щелочных характеристик замораживающей среды на сохранение активности NMDAR при длительном криосохранении. На функционирование NMDAR влияет множество факторов, к которым относятся скорость замораживания/отогревания, состав замораживающей среды и наличие в ней криопротекторов. В настоящей работе было обнаружено, что после криосохранения срезов значение рН замораживающей среды снижалось ниже оптимального уровня сохранения активности NMDAR.

Известно, что активность NMDAR избирательно ингибируется протонами при нормотермических значениях рН. Протоны снижают частоту открытия NMDA-каналов, и это приводит к редуцированию амплитуды NMDA-потенциалов (Traynelis, Cull-Candy, 1990). Кроме того, обнаружено, что протонный сенсор находится в N-концевом домене (NTD) субъединицы GluN2A рецептора NMDAR и аллостерически связан с воротами канала. В результате, протоны подавляют активность субъединиц GluN1–GluN2A рецептора NMDAR (Zhang et al., 2018). Очевидно, что такой механизм также вовлекается в ин-



**Рис. 3.** Потенциалы, регистрируемые в нейронах срезов обонятельной коры в ответ на электрическую стимуляцию ЛОТ и NMDA-потенциалы до и после КС при изменении pH замораживающей среды с 7.3 до 7.6–7.7 в интервале 22–24°C в процессе КС (слева). Справа показаны NMDA-потенциалы в увеличенном масштабе; горизонтальные черные штриховые линии – амплитуды NMDA-потенциалов до и после КС. Вертикальная серая стрелка – амплитуда NMDA-потенциалов.

гибирование активности NMDAR после криосохранения и последующего отогревания.

Принимая во внимание приведенные выше данные о протонной регуляции активности NMDAR и значительное закисление pH замораживающей среды после криосохранения срезов, мы увеличили ее буферную емкость. Это было достигнуто применением гибридной буферной системы замораживающего раствора при неизменном солевом составе среды. В результате исследований было получено повышение активности NMDAR после криосохранения, однако достичь полного восстановления активности NMDAR этим приемом не удалось. С целью сохранения активности NMDAR после криосохранения мы применили дополнительный способ для минимизации ингибирования активности NMDAR, вызываемого протонами – увеличили pH замораживающей среды для срезов с 7.3 до 7.6–7.7 с помощью добавления в среду 0.1 н раствора NaOH объемом 0.3 мл и контролировании pH.

Замену замораживающей среды со значением pH 7.6–7.7 производили в процессе замораживания срезов в интервалах положительных температур 20–22°C в начале процесса замораживания. Этот способ основан на результатах наших предыдущих исследований, что в этом диапазоне температур NMDAR становились нечувствительными к воздействиям гипоксии (Мокрушин, 2016). В результате было выявлено, что активность NMDAR после криосохранения оставалась на уровне, равной активности до замораживания. Следовательно, использование гибридной буферной системы и повышение значения pH до 7.6–7.7 при замораживании срезов были оптимальными условиями для восстановления активности NMDAR

при отогревании после длительного криосохранения (–10°C, 30 сут).

Рассматривая способы защиты активности NMDAR в процессе криосохранения и последующего отогревания необходимо отметить другие механизмы. Прежде всего, это вовлечение астроглиального механизма, который способствует защите внеклеточной среды от увеличения концентрации протонов. Эксперименты *in vivo* и *in vitro* показали, что астроциты поддерживают локальный гомеостаз внеклеточного pH в ткани мозга от перегрузок протонами при помощи высвобождения бикарбоната глиальными клетками (Theparambil et al., 2020). Однако в настоящей работе, как мы полагаем, в процессе криосохранения астроглиальный механизм в срезах обонятельной коры, по-видимому, ингибируется и не способствует сохранению активности NMDAR.

Другой возможный способ защиты активности NMDAR – применение криопротекторов. Однако выявлено, что традиционно используемые криопротекторы оказывают побочное негативное воздействие на активность нейронов (Пичугин, 2013). Полагаем, что это связано с применением препаратов, не имеющих эндогенного происхождения. При поиске эндогенных протекторов обнаружено, что эндогенный дипептид *L*-карнозин способствовал сохранению активности NMDAR при криосохранении срезов обонятельной коры мозга. Защитный эффект *L*-карнозина усиливался с увеличением концентрации эндогенного дипептида (Mokrushin, Pavlinova, 2016). Можно надеяться, что *L*-карнозин самостоятельно или в комбинации с другими веществами может быть использован в качестве нетоксичного криопротектора для длительного криосохранения.

Таким образом, нами предложен новый метод протекции активности NMDAR после длительного криосохранения. Метод не использует криопротекторы, вызывающие блокаду активности NMDAR. Мы полагаем, что этот метод криосохранения можно использовать для создания криобанка нервной ткани.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор признателен Г.П. Смирновой за помощь в проведении экспериментов и С.Е. Боровикову за техническую помощь в настройке и обслуживании электрофизиологической установки.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе с животными были соблюдены все международные и национальные инструкции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН по уходу и использованию животных в эксперименте, а также рекомендации по этике, предложенные Директивой Советом Европейских сообществ (86/609 ЕЕС).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Митюшов М.И., Емельянов Н.А., Мокрушин А.А., Войнер И.А., Багаева Т.Р.* 1986. Переживающий срез мозга как объект нейрофизиологического и нейрхимического исследования. Л.: Наука. 127 с. (*Mityushov M.I., Emelyanov N.A., Mokrushin A.A., Voiner I.A., Bagaeva T.R.* 1986. The surviving slice of the brain as an object of neurophysiological and neurochemical research. L.: Science. 127 p.).
- Мокрушин А.А.* 1997. Пептид-зависимые механизмы нейрональной пластичности в обонятельной коре. Дис. ... д-ра биол. наук Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН. СПб. 397 с. (*Mokrushin A.A.* 1997. Peptide-dependent mechanisms of neuronal plasticity in the olfactory cortex. Diss. Dr. Biol. Sci Institute of Physiology. I.P. Pavlova RAS. St. Petersburg. 397 p.).
- Мокрушин А.А.* 2016. Эффекты глубокого замораживания и отогревания на ионотропные глутаматергические рецепторные механизмы *in vitro*. Бюлл. экспер. биол. мед. Т. 161. С. 36. (*Mokrushin A.A.* 2016. Effects of deep freezing and rewarming on ionotropic glutamatergic receptor mechanisms *in vitro*. Bull. Exper. Biol. Med. V. 161. P. 28).
- Мокрушин А.А., Боровиков С.Е.* 2017. Установка для изучения гипотермических эффектов на переживающих срезах мозга теплокровных. Междунар. журн. прикладных фундам. исслед. Т. 2. С. 214. (*Mokrushin A.A., Borovikov S.E.* 2017. Device for the study of hypothermic effects on the surviving brain slices of homeotherms. Int. J. Applied Basic Res. V. 2. P. 214).
- Пичугин Ю.И.* 2013. Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. М.: Научно-технический центр криобиологии и анабиоза. С. 60. (*Pichugin Y.I.* 2013. Theoretical and practical aspects of modern cryobiology. Moscow: Nauchno-Tekhn. Tsentr Kriobiol. Anabioz. P. 60.)
- Cull-Candy S.C., Leszkiewicz D.N.* 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. SciSTKE. V. 255. <https://doi.org/10.1126/stke.2552004re16>
- Ichikawa J., Yamada R.X., Muramatsu R., Ikegaya Y., Matsuki N., Koyama R.* 2007. Cryopreservation of granule cells from the postnatal rat hippocampus. J. Pharmacol. Sci. V. 104. P. 387.
- Ma X.H., Shi Y., Hou Y., Liu Y., Zhang L., Fan W.-X.* 2010. Slow-freezing cryopreservation of neural stem cell spheres with different diameters. Cryobiology. V. 60. P. 184.
- Mokrushin A.A., Pavlinova L.I.* 2013. Effects of the blood components on the AMPA and NMDA synaptic responses in brain slices in the onset of hemorrhagic stroke. Gen. Physiol. Biophys. V. 32. P. 489.
- Mokrushin A.A., Pavlinova L.I., Borovikov S.E.* 2014. Influence of cooling rate on activity of ionotropic glutamate receptors in brain slices at hypothermia. J. Therm. Biol. V. 44. P. 5.
- Mokrushin A., Pavlinova L.* 2016. Neurotropic and protective effects of *L*-carnosine: studies *in vitro*. In: Carnosine: Physiological effects and research insights. N.-Y.: Nova Science Publishers. P. 113.
- Morris C.B.* 2007. Cryopreservation of animal and human cell lines. Methods Mol. Biol. V. 368. P. 227.
- Obrenovitch T.P., Urenjak J.* 1997. Altered glutamatergic transmission in neurological disorders: from high extracellular glutamate to excessive synaptic efficacy. Progress Neurobiol. V. 51. P. 39.
- Paynter S.J.* 2008. Principles and practical issues for cryopreservation of nerve cells. Brain Res. Bull. V. 75. P. 1.
- Theparambil S.M., Hosford P.S., Ruminot I., Kopach O., Reynolds J.R., Sandoval P.Y., Rusakov D.A., Barros L.F., Gourine A.V.* 2020. Astrocytes regulate brain extracellular pH via a neuronal activity-dependent bicarbonate shuttle. Nature Commun. V. 11. P. 1.
- Traynelis S.F., Cull-Candy S.G.* 1990. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. Nature. V. 345. P. 347.
- Traynelis S.E., Lonni P.W., Chris J.Mc.B., Frank S.M., Katie M.V., Kevin K.O.* 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. Pharmacol. Rev. V. 62. P. 40.
- Zhang J.B., Chang S., Xu P., Miao M., Wu H., Zhang Y., Zhang T., Wang H., Zhang J., Xie C., Song N., Luo C., Zhang X., Zhu S.* 2018. Structural basis of the proton sensitivity of human GluN1–GluN2A NMDA receptors. Cell Rep. V. 25. P. 3582.

## Improvement of the Acid-Alkaline Composition of the Medium for Prolonged and Reversible Cryopreservation of Rat Brain Slices

A. A. Mokrushin\*

*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, 199034 Russia*

*\*e-mail: mok@inbox.ru*

Previously, it was found that the activity of glutamatergic ionotropic *N*-methyl-*D*-aspartate receptors (NMDAR) after long-term cryopreservation of brain slices at a temperature of  $-10^{\circ}\text{C}$  decreased or blocked. The slices of the olfactory cortex of rats were used to study the mechanisms of NMDAR cryodestruction. To recover after cryopreservation NMDAR activity examined the effects of pH changes in extracellular freezing media during registration NMDA-potentials induced by electrical stimulation of the lateral olfactory tract. It was found that, after cryopreservation, the freezing medium was acidified to pH 6.5, while the amplitude of the NMDA potentials decreased in comparison with the amplitudes before cryopreservation. To preserve the NMDAR activity after cryopreservation, the buffer capacity of the freezing medium was increased by using a hybrid buffer system: carbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ), phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) tris(hydroxymethyl)aminomethane ( $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ ), the salt composition did not change when using such a buffer system. After cryopreservation of the slices in such a medium, the amplitude of the NMDA potentials was  $22 \pm 7\%$  compared to the amplitude before cryopreservation. Additionally, a method was used to increase the pH of the medium to 7.6–7.7 in the process of freezing the slices in the temperature range  $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$ . This was followed by recovery NMDAR activity. Thus, the use of a hybrid buffer system in a freezing medium and a simultaneous increase in its pH to 7.6–7.7 promoted the recovery of NMDAR after cryopreservation.

*Keywords:* brain slices, NMDA potentials, cryopreservation, buffer systems