

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ГЕЛЕВОГО РАСТВОРА С АГАРОМ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СРЕЗОВ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ИХ ДЛИТЕЛЬНОГО КРИОСОХРАНЕНИЯ

А.А. Мокрушин

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

Биотехнология криосохранения позволяет длительно сохранять и восстанавливать биологические объекты. Она необходима для создания криобанка. Мы разработали двухкомпонентный замораживающий раствор, состоящий из искусственной цереброспинальной жидкости и агара в различных концентрациях. Эффективность раствора для длительного криосохранения (-10°C , 52 сут.) была исследована на переживающих срезах обонятельной коры мозга негипернтрирующих животных — крыс. В качестве функциональных индикаторов успешного криосохранения жизнеспособности срезов мозга были изучены изменения активностей а-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты (АМПА) и N-метил-D-аспартата (НМДА) глутаматергических механизмов. Были использованы различные концентрации агара: 33%, 44% и 50%. При концентрации 33% наблюдалась гиперактивация АМПА и восстановление НМДА механизмов по сравнению со значениями до криосохранения. При концентрации агара 44% происходила гиперактивация обоих механизмов. Полное восстановление активностей АМПА и НМДА механизмов после длительного криосохранения было достигнуто при концентрации агара 50%. Разработанный и исследованный нами замораживающий раствор на основе агара не содержит «тяжёлых» протекторов (диметилсульфоксида), антибиотиков, а также катионов, таких как Ba^{2+} и Sr^{2+} , которые приводят к необратимой блокаде АМПА и НМДА механизмов. Таким образом, замораживающий раствор на основе агара способствует сохранению высокого уровня активности АМПА и НМДА механизмов в переживающих срезах при криосохранении. Разработанный раствор можно использовать для создания криобанка нервной ткани.

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

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности: автор выражает признательность Г.П. Смирновой за помощь при проведении экспериментов, С.Е. Боровикову — за техническую помощь в наладке и обслуживании электрофизиологической установки.

Для цитирования: Мокрушин А.А. Метод получения и изучения гелевого раствора с агаром для сохранения электрической активности срезов мозга крыс после их длительного криосохранения. *Биомедицина*. 2022;18(2):31–39. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-31-39>

Поступила 08.02.2022

Принята после доработки 25.04.2022

Опубликована 10.06.2022

A METHOD FOR OBTAINING AND STUDYING A GEL AGAR-BASED MEDIUM TO PRESERVE THE ELECTRICAL ACTIVITY OF RAT BRAIN SLICES AFTER THEIR LONG-TERM CRYOPRESERVATION

Anatoliy A. Mokrushin

*Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences
199034, Russian Federation, St. Petersburg, Makarova Embankment, 6*

Cryopreservation biotechnology allows a long-term preservation makes it possible to preserve and subsequent recovery of biological objects for a long time. This technology is used for creating is necessary to create a cryobanks. In this work, we have developed a two-component freezing solution consisting of an artificial cerebrospinal fluid and agar in different concentrations. The effectiveness of the solution in terms of long-term cryopreservation was investigated on surviving slices of the olfactory cortex of the brain of such non-hibernating animals – as rats. Changes Variations in the activities of AMPA and NMDA glutamatergic mechanisms in brain slices were studied as functional indicators of successful cryopreservation. The following agar Different concentrations of agar were used: 33%, 44% and 50%. At a concentration of 33% agar, AMPA hyperactivation and recovery of NMDA recovery mechanisms were observed. At a concentration of 44% agar, hyperactivation of both mechanisms occurred. A complete recovery of the activities of the AMPA and NMDA mechanisms after prolonged cryopreservation (-10°C , 52 days) was achieved at an agar concentration of 50%. The developed freezing agar-based freezing solution developed and studied by us does not contain no “heavy” protectors (DMSO), antibiotics, and cations, such as Ba^{2+} and Sr^{2+} , which normally lead to an irreversible blockade of AMPA and NMDA mechanisms. Thus, an the agar-based freezing developed solution helps contributes to maintaining a high level of activity of AMPA and NMDA activity mechanisms in slices during their cryopreservation. The developed solution can be used to create a cryobank of nervous tissue.

Keywords: rat brain slices, cryopreservation, agar, AMPA, NMDA mechanisms, freezing/thawing

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment: the author is grateful to G.P. Smirnova for her help with the experiments, S.E. Borovikov for technical assistance in installing and operating the electrophysiological setup.

For citation: Mokrushin A.A. A Method for Obtaining and Studying a Gel Agar-Based Medium to Preserve the Electrical Activity of Rat Brain Slices after their Long-Term Cryopreservation. *Journal Biomed.* 2022;18(2):31–39. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-2-31-39>

Submitted 08.02.2022

Revised 25.04.2022

Published 10.06.2022

Введение

В настоящее время в криобиологии разрабатываются замораживающие среды для успешного и длительного низкотемпературного криосохранения биологических объектов. Особенная сложность создания таких сред возникает при криосохранении нервной ткани. Это связано с тем, что нервные структуры гетерогенны (нейроны, синапсы, мембранные рецепторы) и неодинаково реагируют на криосохране-

ние и последующее отогревание. Различие также проявляется в химических процессах, которые могут быть неодинаково уязвимы к действию низкотемпературного воздействия, которые приводят к повреждению нервной ткани. Для устранения таких криоповреждений необходим особый подход к созданию замораживающих сред.

Существуют коммерчески доступные замораживающие препараты для хранения биологических сред в нервных клетках. Такие среды,

как «CryoStor10 (CS10)», «Hibernate-A», «Hibernate-E», применяются для замораживания гепатоцитов, клеточных элементов крови, стволовых и раковых клеток. Однако их серьёзным недостатком является наличие в них 10% диметилсульфоксида (ДМСО). Установлено, что ДМСО является «тяжёлым» протектором и необратимо блокирует активность нервных клеток срезов мозга [4]. Другим недостатком является глубокое замораживание (-80°C , -196°C) биологических объектов. Такая глубина замораживания приводит к необратимому изменению конформаций внутриклеточных белковых структур и блокаде клеточных функций [7]. Таким образом, по характеристикам эти замораживающие р-ры не являются оптимальными для длительного криосохранения нервной ткани мозга.

Замораживающие р-ры «Neurostore» («Sigma-Aldrich», США), «CryoStor10» («Thermo Fisher», США) специально разработаны для замораживания и криосохранения эмбриональных нейронов из гиппокампальных и кортикальных структур мозга крыс. При использовании такого р-ра было обнаружено, что жизнеспособность криосохранённых нейронных культур уменьшалась по сравнению с активностью нейронов до замораживания, что указывает на невысокую эффективность этих р-ров [9, 12, 13]. Причина заключается в том, что в них содержится «тяжёлый» протектор ДМСО, а также антибиотики пенициллин и стрептомицин. Последние, как известно, вызывают гиперовозбудимость в нервной ткани, приводящую к возникновению эпилептических разрядов. Кроме того, глубина криосохранения составляет -80°C , что вызывает необратимые конформационные изменения внутриклеточных ферментов [7]. Следовательно, использование таких р-ров для криосохранения эксплантатов (срезов) мозга теплокровных является нецелесообразным.

Для повышения эффективности криосохранения нервных механизмов в последнее время применяются альгинатные гидрогели в качестве основы для создания криозащитной среды [8, 15]. Существенным недостатком таких р-ров является наличие в их составе двухвалентных катионов Ba^{2+} и Sr^{2+} . Известно, что эти компоненты замораживающих р-ров необратимо блокируют синаптическую активность и, следовательно, после цикла замораживания/отогревания не способствуют сохранению активности синаптических механизмов в эксплантатах мозга. Кроме того, использование таких р-ров связано с добавлением «жёстких» криопротекторов (ДМСО), которые необратимо нарушают функции нейронов, синапсов и уменьшают протективный потенциал таких замораживающих р-ров.

Для устранения недостатков существующих криозамораживающих р-ров в настоящей работе мы разработали замораживающие р-ры с добавлением агара в солевой р-р, имитирующий искусственную цереброспинальную жидкость (ИЦЖ). Агар является природным полимером, который используется в биологии и медицине, благодаря его биосовместимости с живыми объектами. Агар в качестве криопротектора нервной ткани ранее не использовался. Мы полагаем, что создание замораживающего р-ра на основе агара будет способствовать сохранению активности нервных структур мозга. Для изучения эффективности таких р-ров мы использовали переживающие срезы обонятельной коры мозга крыс. В срезах мы тестировали эффективность замораживающего р-ра на сохранение активностей глутаматергических ионотропных α -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты (АМПА) и N-метил-D-аспартата (НМДА) рецепторных механизмов [11]. Длительность криосохранения срезов мозга при температуре -10°C составляла 52 сут.

Материалы и методы

В исследованиях использовались белые крысы-самцы Wistar массой 180–200 г. Все эксперименты проведены на крысах из биocolлекции «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, предложенными European Communities Council Directive (86/609 EEC). Опыты с животными были проведены в строгом соответствии с Руководством Совета Федерации по уходу и использованию лабораторных животных (1994 г.) и с руководящими принципами этического кодекса Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (1996 г.).

В настоящей работе были исследованы протективные эффекты криосохранения срезов обонятельной коры (клеточная культура) в замораживающем р-ре, состоящем из ИЦЖ и агара в различных концентрациях. Такой р-р для криосохранения срезов был двухкомпонентным и готовился в следующей последовательности (рис. 1).

В качестве исходного компонента для изготовления замораживающего р-ра была ИЦЖ. Её состав (мМ): NaCl — 124,0; KCl — 5,0; CaCl₂ — 2,6; KH₂PO₄ — 1,24; MgSO₄ — 1,2; NaHCO₃ — 3,0; глюкоза — 10,0; трис-HCl — 23,0; pH 7,2–7,3. В неё входят необходимые ионы и катионы (аналогично *in vivo*) для поддержания электри-

ческой активности нейронов срезов мозга, а также глюкоза для энергетического обеспечения их активности. Концентрация ионов была оптимизирована для длительной (10 ч и более) жизнедеятельности срезов мозга [10]. Важным компонентом ИЦЖ является буферная ёмкость р-ра. Она образована из гибридной буферной системы: карбонатный буфер, NaHCO₃; фосфатный буфер, KH₂PO₄; трис(гидроксиметил)аминометан, (HOCH₂)₃CNH₂. Такая буферная система обеспечивает электрическую активность нейронов в диапазоне pH 7,2–7,4. Среда с такими характеристиками способствует длительному поддержанию активности нейронов срезов мозга крыс [3].

Другим компонентом для приготовления замораживающей среды был естественный полимер агар. Первоначально для получения агара были использованы водоросли Белого моря (Россия). Однако получить и очистить агар в лабораторных условиях в достаточном количестве было сложно. Далее в наших опытах был использован порошкообразный агар Difco Bactor (США). Выбор этого типа агара был основан тем, что в нём отсутствуют токсические катионы (Cu²⁺, Ba²⁺), которые могут ингибировать функционирование нейронов и синапсов.

Замораживающий р-р был приготовлен в два этапа. На первом этапе получали гелевый р-р агара. Для этого агар-порошок (3 г) заливали 100 мл 1 М NaCl и выдерживали 10 дней в термостате при темпе-



Рис. 1. Приготовление раствора для криосохранения срезов обонятельной коры головного мозга.

Fig. 1. Preparation of a solution for cryopreservation of sections of the olfactory cortex of the brain.

ратуре $+32...+35^{\circ}\text{C}$. Полученный гелевый р-р центрифугировали (Электрон П10-0.1, Россия) при скорости 2000 об./мин в течение 10 мин. Лёгкую фракцию отсасывали из р-ра и использовали для последующего приготовления замораживающей среды для криосохранения срезов. Тяжёлая фракция агара не использовалась из-за неоднородности её состава.

На втором этапе были приготовлены замораживающие р-ры для криосохранения срезов в следующей последовательности. Для получения этих р-в с разной концентрацией агара использовалась его лёгкая фракция с добавлением ИЦЖ. Р-р с концентрацией агара 33% состоял из 0,5 мл лёгкой фракции агара и 1,0 мл ИЦЖ. Р-р с концентрацией агара 44% состоял из 0,8 мл лёгкой фракции агара и 1,0 мл ИЦЖ. Р-р с концентрацией агара 50% состоял из 1,0 мл лёгкой фракции агара и 1,0 мл ИЦЖ.

Срезы головного мозга помещали в стеклянные флаконы с этими р-рами. Затем флаконы со срезами постепенно замораживали до -10°C при медленной скорости ($0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) в морозильной камере с термостатом ThermoStat plus («Eppendorf», Германия) в течение 52 сут. Через 52 сут. флаконы со срезами отогревали до $+37^{\circ}\text{C}$ с медленной скоростью $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Исследования протективных эффектов замораживающего р-ра проводились на тангенциальных срезах толщиной 400–500 мкм, которые изготавливали устройством Емельянова (Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН) из мозга крыс-самцов Wistar (13 животных). Каждый срез преинкубировали отдельно в стеклянных виалах ИЦЖ (без агара) объёмом 1 мл в аппарате Варбурга (Модель ВА 01 10, Германия) при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ с частотой качания 120/мин в течение 2 ч, что имитирует кровообращение в мозге.

После преинкубации срезов в течение 2 ч (без агара) их по одному извлекали из флаконов, помещали в проточную регистри-

рующую камеру электрофизиологической установки [1] и перфузировали со скоростью 2 мл/мин ИЦЖ (солевой состав указан выше). В течение 15 мин срезы перфузировали ИЦЖ без агара. В срезах экстракционно регистрировали АМПА и НМДА потенциалы стеклянными микроэлектродами, заполненными 1 М NaCl сопротивлением 1–5 МОм в ответ на электрическую стимуляцию одиночными импульсами (ЭСУ-1, Россия) латерального обонятельного тракта [2]. Потенциалы оцифровывали аналогоцифровым интерфейсом (Е 20-10, Россия) с частотой квантования 25 кГц и обрабатывали на компьютере с помощью специальной программы. Полученные значения амплитуд АМПА и НМДА потенциалов были контрольными до криосохранения срезов без агара.

Затем, после регистрации в срезах контрольных значений АМПА и НМДА потенциалов, их переносили в виалы с замораживающими р-ми с агаром при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в различных концентрациях: 33%, 44% и 50%. Далее виалы со срезами помещали в морозильную камеру с термостатом ThermoStat plus («Eppendorf, Германия») и замораживали с медленной ($0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) скоростью до температуры -10°C . При этой температуре срезы сохраняли в течение 52 сут. Спустя это время виалы со срезами отогревали с медленной скоростью $0,1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $+37^{\circ}\text{C}$. Затем в каждом срезе регистрировали АМПА и НМДА потенциалы. Значение их амплитуд выражали в процентах по отношению к контрольным потенциалам (до криосохранения).

В данном исследовании криопротекторы — такие, как диметилсульфоксид, этиленгликоль, глицерин, 1,2-пропандиол, диметилформамид и др., — не использовали, поскольку они необратимо блокируют активность нейронов и синапсов [4], в т. ч. активности АМПА и НМДА механизмов.

Химические реактивы для получения замораживающих растворов были прио-

бренены в фирмах «Химреактив» (Россия) и «Difco Vactor agar» (США).

Для статистической обработки данных применяли непараметрический U-критерий Уилкоксона–Манна–Уитни. Числовые данные были выражены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (S.E.M.). Уровень статистической значимости был на уровне $p \leq 0,05$.

Результаты исследований

Протективные эффекты замораживающего р-ра, состоящего из ИЦЖ и лёгкой фракции агара с различными концентраци-

ями, были проанализированы на сохранение и восстановление активностей АМПА и НМДА потенциалов в срезах после их длительного криосохранения и последующего отогревания до $+37^\circ\text{C}$.

После криосохранения срезов в замораживающем р-ре с концентрацией агара 33% было выявлено, что амплитуда АМПА потенциалов увеличивалась в среднем на $59 \pm 7\%$ ($n=7$) по сравнению с амплитудой АМПА потенциалов до криосохранения (контроль): температура $+37^\circ\text{C}$ — 100% *vice versa* после криосохранения $159 \pm 12\%$, $p \leq 0,05$, $U=5$, $n=7$ (рис. 2А). Такие измене-

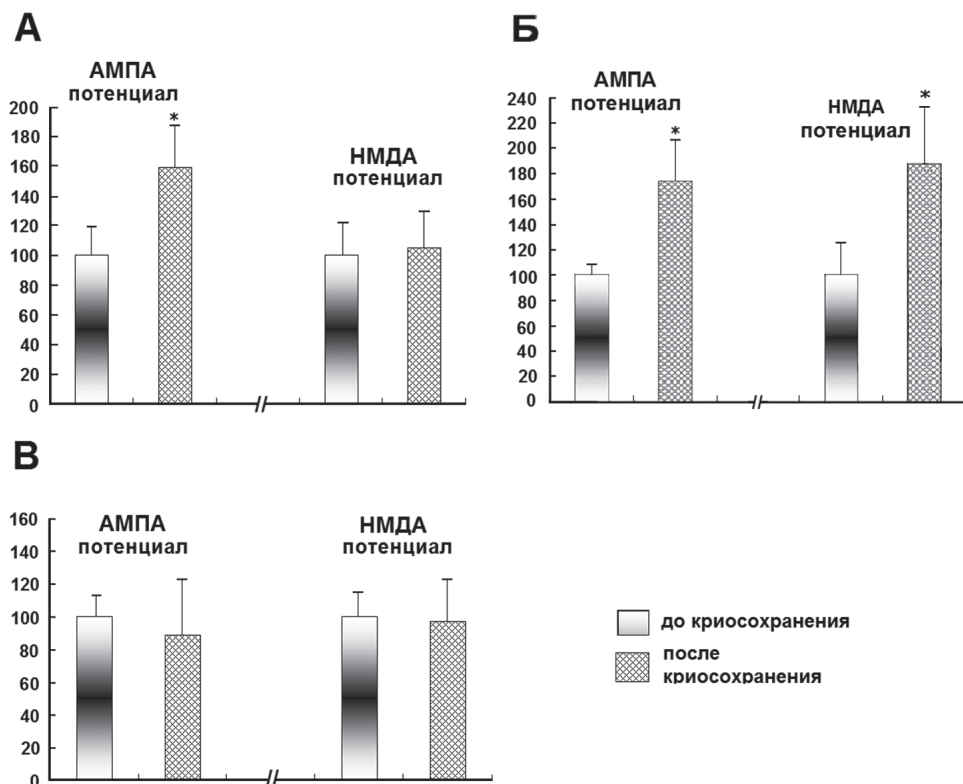


Рис. 2. Значения АМПА и НМДА потенциалов до и после криоконсервации срезов обонятельной коры головного мозга крыс.

Fig. 2. Values of AMPA and NMDA potentials before and after cryopreservation of sections of the olfactory cortex of the rat brain.

ния АМПА потенциалов свидетельствуют о гиперактивации АМПА механизмов после криосохранения (рис. 2А).

При концентрации агара 33% в замораживающей среде амплитуда НМДА потенциалов, в отличие от амплитуды АМПА потенциалов, статистически не отличалась от значений до криосохранения: контроль (до криосохранения, температура $+37^{\circ}\text{C}$) — 100% *vice versa* после криосохранения $105\pm 7\%$, $p\leq 0,05$; $U=4$, $n=7$ (рис. 2А). Полученные данные указывают, что АМПА и НМДА механизмы восстанавливаются после длительного криосохранения. Однако степени восстановления этих механизмов различны: АМПА механизмы усиливаются, НМДА — восстанавливаются. Очевидно, криосохранение срезов в замораживающем р-ре в концентрации 33% не является оптимальным для сохранения активности АМПА, но способствует восстановлению НМДА механизмов.

Для достижения равноценного восстановления АМПА и НМДА механизмов был исследован замораживающий р-р с концентрацией агара 44%. Было обнаружено, что амплитуды АМПА и НМДА потенциалов статистически достоверно увеличивались на $74\pm 8\%$ и $87\pm 9\%$ соответственно, $p\leq 0,05$; $U=5$, $n=7$ (рис. 2Б). Эти данные свидетельствуют о гиперактивации как АМПА, так и НМДА механизмов после криосохранения. Следовательно, несмотря на то, что активности АМПА и НМДА механизмов восстанавливаются после криосохранения в замораживающем р-ре с концентрацией агара 44%, но уровни их активностей чрезмерны и не являются оптимальными.

Для получения полного сохранения активностей АМПА и НМДА потенциалов, равных по их значениям до криосохранения, концентрация агара в замораживающем р-ре была увеличена до 50%. В результате проведённых исследований было выявлено восстановление активностей этих механизмов. АМПА: контроль (до криосохране-

ния, температура $+37^{\circ}\text{C}$) — 100% *vice versa* после криосохранения — $88\pm 6\%$, $p\geq 0,05$; $U=10$, $n=7$, т. е. различия статистически недостоверны (рис. 2В). Амплитуда НМДА потенциалов после отогревания была равна значениям до криосохранения: контроль (до криосохранения, температура $+37^{\circ}\text{C}$) — 100% *vice versa* после криосохранения — $97\pm 9\%$, $p\geq 0,05$; $U=12$; $n=7$ (рис. 2В).

Таким образом, сопоставляя полученные результаты восстановления активности как АМПА, так и НМДА механизмов после криосохранения в замораживающем р-ре с концентрацией агара 50%, можно утверждать, что он способствует защите этих механизмов.

Обсуждение результатов

В настоящей работе представлены результаты получения и исследования замораживающего р-ра, состоящего из ИЦЖ и агара в различных концентрациях, для длительного криосохранения эксплантатов (срезов) мозга. Считается, что агар является подходящим биоматериалом для имитации каркасов внеклеточного матрикса с пористой структурой. Учитывая эти свойства агара, мы надеялись получить протективный эффект сохранения активности АМПА и НМДА механизмов. В качестве функциональных индикаторов успешного криосохранения были изучены изменения активностей АМПА и НМДА глутаматергических механизмов.

Хотя были использованы различные концентрации агара, полное восстановление активностей АМПА и НМДА механизмов после длительного криосохранения (-10°C , 52 сут.) было достигнуто при концентрации агара 50%. Эти данные свидетельствуют о зависимости протективных свойств замораживающего р-ра от концентраций агара. Следовательно, при последующем составлении замораживающих р-ров на основе агара и их исследовании следует учитывать концентрационные характеристики.

Рассмотрим протективный потенциал агара. Принимая во внимание величину молекулярного веса агара (32–200 кДа), его следует отнести к непроницающему типу криопротекторов. По химической природе агар является биополимером, макромолекулы которого образованы двумя полисахаридами — агарозы и агаропектина. 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 [5, 6, 14]. Установлено, что агар при формировании геля проявляет высокую гидратационную способность, позволяющую создавать устойчивые структуры с молекулами воды. Вероятно, что абсорбция агаром молекул воды из внеклеточного пространства срезов создаёт защиту мембран нервных клеток от осмотических напряжений, уменьшению образованию кристаллов льда и их разрушительного воздействия на мембраны в процессе криосохранения [5].

Сопоставляя эффективность разработанного нами замораживающего р-ра на основе агара с характеристиками существующих замораживающих р-ров, например, «CryoStor10 (CS10)», «Hibernat-A», «Hibernat-E», «Neurostore» и др., следует

отметить, что они проявляли бы существенные негативные воздействия на активности синаптических глутаматергических ионотропных механизмов (АМПА, НМДА), поскольку в их составе содержатся «тяжёлый» криопротектор (ДМСО), антибиотики (пенициллин и стрептомицин), а также катионы, такие как Ba^{2+} и Sr^{2+} , приводящие к необратимой блокаде АМПА и НМДА механизмов.

Закключение

Таким образом, представленные данные доказывают, что замораживающий р-р, состоящий из искусственной цереброспинальной жидкости и агара в различных концентрациях, защищает АМПА и НМДА механизмы от криповреждений при их длительном криосохранении (–10°C, 52 сут.). Исследованные механизмы демонстрируют восстановление электрической активности (до 100%) по сравнению со значениями до криосохранения. Эти данные, впервые полученные, доказывают, что агар является эффективным нейрорепротектором. Мы полагаем, что разработанный нами замораживающий р-р для криосохранения эксплантатов головного мозга (срезов) негибернирующих теплокровных животных будет использован для создания биобанка нервной ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Мокрушин А.А., Боровиков С.Е. Установка для изучения гипотермических эффектов на переживающих срезах мозга теплокровных. *Международный журнал прикладных фундаментальных исследований*. 2017;2(2):214–217. [Mokrushin A.A., Borovikov S.E. Ustanovka dlya izucheniya gipotermicheskikh effektivov na perezhivayushchih srezah mozga teplokovnykh [Installation for the study of hypothermic effects on the brain surviving slices of warm-blooded]. *Mezhdunarodny zhurnal prikladnykh fundamental'nykh issledovaniy [International Journal of Applied Fundamental Research]*. 2017;2(2):214–217. (In Russian)].
2. Мокрушин А.А. Криосохранение срезов мозга крыс с различной длительностью и восстановлением их электрической активности. *Биомедицина*. 2019;15(4):98–106. [Mokrushin A.A. Kriosokhraneniye srezov mozga krys s razlichnoy dlitel'nost'yu i vosstanovleniye ih elektricheskoy aktivnosti [Cryopreservation of rat brain slices with different duration and restoration of their electrical activity]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;15(4):98–106. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-15-4-98-106.
3. Мокрушин А.А. Оптимизация кислотно-щелочного состава инкубационной среды для длительной и обратимой криоконсервации срезов мозга негибернирующих животных. *Биофизика*. 2021;66(5):954–963. [Mokrushin A.A. Optimizatsiya kislotno-shchelochno-go sostava inkubatsionnoy sredy dlya dlitel'noy i obratimoy kriokonservatsii srezov mozga negiberniruyushchih zhivotnykh [Optimization of the acidic-alkaline composition of the incubation medium for a long-term and reversible cryopreservation of brain slices of non-hibernating animals]. *Biofizika [Biophysics]*.

- 2021;66(5):954–963. (In Russian)]. DOI: 10.31857/S0006302921050136.
4. Пичугин Ю.И. *Теоретические и практические аспекты современной криобиологии*. М.: Научно-технический центр криобиологии и анабиоза, 2013:60–62. [Pichugin Yu.I. *Teoreticheskie i prakticheskie aspekty sovremennoj kriobiologii [Theoretical and practical aspects modern cryobiology]*. Moscow: Nauchno-tehnicheskij centr kriobiologii i anabioza Publ., 2013:60–62. (In Russian)].
 5. Шипунов Б.П., Коптев В.Е., Маркин В.И. Особенности реологии растворов агар-агара. *Химия растительного сырья*. 2018;1:53–60. [Shipunov B.P., Koptev V.E., Markin V.I. Osobennosti reologii rastvorov agar-agara [Rheology features of agar-agar solutions]. *Himiya rastitel'nogo syr'ya [Chemistry of vegetable raw materials]*. 2018;1:53–60. (In Russian)].
 6. Усов А.И. Проблемы и достижения в структурном анализе сульфатированных полисахаридов красных водорослей. *Химия растительного сырья*. 2001;2:7–20. [Usov A.I. Problemy i dostizheniya v strukturnom analize sul'fatirovannyh polisaharidov krasnyh vodoroslej [Problems and achievements in the structural analysis of sulfated polysaccharides of red algae]. *Himiya rastitel'nogo syr'ya [Chemistry of vegetable raw materials]*. 2001;2:7–20. (In Russian)].
 7. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*. 2009;5:119–126. DOI: 10.4161/org.5.3.9583.
 8. Benson E.E., Harding K., Ryan M., Petrenko A., Petrenko Y. Alginate encapsulation to enhance biopreservation scope and success: A multidisciplinary review of current ideas applications in cryopreservation and non-freezing storage. *Cryoletters*. 2018;39(1):14–38.
 9. Day A.G.E., Bhangra K.S., Murray-Dunning C., Stevanato L., Phillips J.B. The effect of hypothermic and cryogenic preservation on engineered neural tissue. *Tissue engineering. Part C: Methods*. 2017;23(10):575–582. DOI: 10.1089/ten.TEC.2017.0244.
 10. 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;32(4):489–504. DOI: 10.4149/gpb_2013038.
 11. Mokrushin A.A. Effects cryopreservation of ionotropic glutamatergic receptor mechanisms in vitro. *CryoLetters*. 2015;36(6):367–377.
 12. Parker S.S., Moutal A., Cai S., Chandrasekaran S., Roman M.R., Koshy A.A., Khanna R., Zinsmaier K.E., Mouneimne G. High fidelity cryopreservation and recovery of primary rodent cortical neurons. *eNeuro*. 2018;5(5):Eneuro 0135-18. DOI: 10.1523/ENEURO.0135-18.2018.
 13. Pischedda F., Montani C., Obergasteiger J., Frapporti G., Corti C., Rosato Siri M., Volta M., Piccoli G. Cryopreservation of primary mouse neurons: The benefit of neurofreezing cryoprotective medium. *Front. Cell. Neurosci.* 2018;12:81. DOI: 10.3389/fncel.2018.00081.
 14. Sousa A.M., Borges J., Silva A.F., Gonçalves M.P. Influence of the extraction process on the rheological and structural properties of agars. *Carbohydr. Polym.* 2013;96(1):163–171. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.03.070.
 15. Zhang C., Zhou Y., Zhang L., Wu L., Chen Y., Xie D., Chen W. Hydrogel cryopreservation system: An effective method for cell storage. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(11):3330. DOI: 10.3390/ijms19113330.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Мокрушин Анатолий Александрович, д.б.н.,
ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова
РАН;

e-mail: mok@inbox.ru

Anatoliy A. Mokrushin, Dr. Sci. (Biol.), Pavlov
Institute of Physiology of the Russian Academy
of Sciences;

e-mail: mok@inbox.ru