

Тезиков Е.Б., Пирожков С.В., **Каратеев С.Л.**, Литвицкий П.Ф.

Показатели оксидативного стресса и содержание антиоксидантных факторов при перфузии головного мозга крыс *in situ* раствором с высоким напряжением кислорода

ФГАОУ ВО «Первый Московский Государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая д. 8, стр. 2

Цель: оценить интенсивность перекисного окисления липидов и содержание антиоксидантных факторов в ткани изолированного головного мозга в условиях перфузии *in situ* раствором, не содержащим переносчиков O_2 . **Методика.** Предложена оригинальная модель перфузии головного мозга крыс *in situ* раствором с повышенным напряжением кислорода без его переносчиков и без помещения препарата в барокамеру, т.е. при внешнем нормальном барометрическом давлении. **Результаты.** Выживаемость перфузируемого мозга (по критериям: — амплитуда электрокортикограммы не менее 35 мкВ и быстрый рост перфузионного давления более 60 мм рт. ст.) при давлении в оксигенационной камере 900 мм рт. ст. и 2400—2600 мм рт. ст. составляли более 3 ч и 4 ч соответственно. Установлено, что при напряжении кислорода в перфузионном растворе, равном 2400—2600 мм рт. ст., содержание перекисей липидов и диеновых конъюгатов в ткани мозга не превышает нормальных значений или даже ниже, чем при перфузии мозга раствором с напряжением кислорода 970 мм рт. ст. В этих условиях содержание в мозге, витамина Е и SH-групп белков не изменяется. Таким образом, при напряжении кислорода в 2400—2600 мм рт. ст. в перфузионном растворе признаки оксидативного стресса в мозге отсутствуют. **Заключение.** Предлагаемая методика перфузии головного мозга крыс *in situ* обеспечивает его функционирование без переносчиков кислорода в условиях нормального внешнего барометрического давления, такое же, как и при использовании перфузии с переносчиками кислорода. Данный метод представляет собой удобную и экономичную модель для исследования функций изолированного мозга.

Ключевые слова: изолированный мозг крыс; гипербарическая оксигенация, перфузия, оксидативный стресс.

Для цитирования: Тезиков Е.Б., Пирожков С.В., Каратеев С.Л., Литвицкий П.Ф. Показатели оксидативного стресса и содержание антиоксидантных факторов при перфузии головного мозга крыс *in situ* раствором с высоким напряжением кислорода. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(3): 113—119.
DOI: 10.25557/0031-2991.2018.03.113-119

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Тезиков Евгений Борисович, доктор мед. наук, проф., каф. патофизиологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), e-mail: Tezikov.mma@gmail.com

Поступила 26.07.2017

Tezikov E.B.¹, Pirozhkov S.V.¹, **Karateev S.L.**, Litvitskiy P.F.¹

Oxidative stress and the content of antioxidative factors in THE isolated brain perfused *in situ* USING A solution with A high oxygen tension

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya Str 8, Bldg. 2, Moscow 119991, Russia

The aim. To evaluate intensity of lipid peroxidation and content of antioxidative factors in the isolated brain perfused with a solution without oxygen carriers. **Methods.** We used an original model of *in situ* rat brain perfusion using a solution with a high oxygen tension. Neither O_2 carriers nor a barometric chamber were used, i.e., the brain was perfused under normal external barometric pressure. **Results.** Survival time of the perfused brain (criteria: electrocorticogram amplitude $\geq 35 \mu V$ and rapid elevation of the perfusion pressure to >60 mm Hg) at the oxygenation chamber pressure of 900 mm Hg and 2400—2600 mm Hg was 3 h and 4 h, respectively. At the O_2 tension of 2400—2600 mm Hg in the perfusion solution, contents of lipid peroxides and conjugated dienes in the brain were not higher or even lower than at the perfusion solution O_2 tension of 970 mm Hg, while the content of ascorbic acid was slightly increased and contents of vitamin E and protein SH-groups were not significantly changed. Therefore, at the O_2 tension of 2400—2600 mm Hg in the perfusion solution, there were no signs of oxidative stress in the brain tissue. **Conclusion.** The proposed model of *in situ* brain perfusion provides the brain functioning under normal external barometric pressure without oxygen carriers similar to perfusion with ox-

ygen carriers. This method represents a suitable and simple model to study functions of the isolated brain.

Keywords: isolated brain, hyperbaric oxygenation, oxidative stress.

For citation: Tezikov E.B., Pirozhkov S.V., Karateev S.L., Litvitskiy P.F. Oxidative stress and the content of antioxidative factors in the isolated brain perfused *in situ* by solution with a high oxygen tension. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(3): 113—119. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.03.113-119

For correspondence: Evgeniy B. Tezikov, Dr. Sci. Med., professor of the Pathophysiology Department, FSAEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the MH (Sechenovskiy University, E-mail: Tezikov.mma@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Tezikov E.B., <http://orcid.org/0000-0003-0517-3448>
Pirozhkov S.V., <http://orcid.org/0000-0002-7116-3398>
Litvitskiy P.F., <http://orcid.org/0000-0003-0151-9114>

Поступила 26.07.2017

Введение

Головной мозг животных при его перфузии как *in vitro*, так и *in situ* является удобным объектом для изучения транспорта различных веществ, в том числе и лекарственных препаратов, через гематоэнцефалический барьер, оценки его проницаемости, изучения механизмов эпилептиформной активности, ишемического повреждения [1—5].

Препарат мозга *in situ* и *in vitro*, в отличие от мозга *in vivo*, позволяет осуществить быструю отмывку тестируемых веществ из межклеточной среды при условии отсутствия рециркуляции перфузионного раствора. Таким образом, на одном и том же препарате мозга можно тестировать различные вещества в разных концентрациях и дозах. Кроме того отсутствует влияние гормонов, цитокинов и метаболитов, а также взаимодействие исследуемых веществ с белками крови и клетками.

Нами предлагается оригинальная модель перфузии головного мозга крыс *in situ* раствором с повышенным напряжением кислорода без его переносчиков и без помещения препарата в барокамеру, т.е. при внешнем нормальном барометрическом давлении. Поскольку кислород может обладать токсическим эффектом, связанным с генерацией избытка свободных радикалов, были исследованы продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) и факторы антиоксидантной защиты ткани мозга в условиях *in situ* при гипербарической оксигенации, то есть при повышенном напряжении O_2 в перфузионной жидкости.

Методика

Техника приготовления препарата. У крыс самцов ACI x Wistar массой 200—250 г под уретано-

вым наркозом (1,2 г/кг внутривенно) делали 2 отверстия в черепе до твердой мозговой оболочки (координаты 3 мм от сагиттального шва и 2 мм дорсальнее брегмы), через которые вводили электроды для регистрации электрокортикограммы (ЭКОГ). Затем перевязывали обе а. carotis externa, вскрывали грудную клетку, с целью перевязки а. toracica interna. Через надрез верхушки левого желудочка сердца вводили в него четырехходовый катетер Swan-Ganz, продвигали его в восходящую часть дуги аорты и фиксировали лигатурой на уровне отхождения левой общей сонной артерии от дуги аорты. Сразу после этого начинали перфузию сосудов мозга крысы раствором при температуре 18—22°C (комнатная температура), содержащим уретан. Скорость инфузии уретана в поток перфузионного раствора подбиралась так, чтобы конечная концентрация уретана составляла 2—3 г/л. Затем перевязывали аорту дистальнее правой а. carotis communis и перерезали обе v. jugularis communis. Далее последовательно перевязывали билатерально а. subclavia и а. pterygopalatine. В v. jugularis interna вводили катетер для взятия проб раствора с целью определения содержания лактата. Время операции обычно не превышало 30 мин, а период ишемии мозга после торакотомии — 1 мин. После перевязки сосудов и повышения температуры перфузионного раствора до 32—33°C введение уретана прекращали. В процессе перевязки сосудов и соответственно повышения сопротивления току раствора скорость перфузии уменьшали, для поддержания перфузионного давления в диапазоне 45—60 мм рт. ст. Перфузионное давление устанавливали на величине, при которой его дальнейшее увеличение не приводило к повышению средней амплитуды ЭКОГ. Это давление составляло 40—50 мм рт. ст.

Состав перфузионного раствора (ммоль/л): NaCl 118; KCl 4,7; MgSO₄ 1,64; NaHCO₃ 24,0; KН₂РO₄ 1,18; глюкоза 11,0; D-маннитол 11,0; мочевины 25,00, желатин (препарат «ЖЕЛАТИНОЛЬ»). Концентрация Ca²⁺ в растворе после добавления препарата «ЖЕЛАТИНОЛЬ» находилась в пределах 1,87—2,15 ммоль/л. Все маточные растворы фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Дистиллированную воду для приготовления раствора пропускали через фильтр Milli-Q50 с диаметром пор 0,2 мкм. Качество очистки воды и маточных растворов существенно влияло на выживаемость мозга. Состав раствора разработан у нас и защищен авторским свидетельством¹.

Устройство для перфузии мозга. Устройство для перфузии мозга состояло из оксигенационной камеры, водного термостата, магнитной мешалки, перистальтического насоса (Туре 372.С, Польша) и 2 насосов для жидкостной хроматографии высокого давления (model 303, head — 10 WSC, фирма Gilson, Франция). Оксигенационной камерой служила вакуумная колба емкостью 500 мл. Перед экспериментом колбу полностью заполняли водой, которую затем вытесняли газовой смесью под давлением (O₂ — 95%, CO₂ — 5%). Раствор в колбу через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,2 мкм подавал 1-й насос высокого давления. Через резиновую пробку вакуумной колбы, фиксированную специальным металлическим держателем, вводили 4 металлические иглы с целью: 1 — подачи газовой смеси, 2 — перемещения перфузионного раствора в четырехходовый катетер Swan-Ganz для перфузии мозга, 3 — возврата излишка раствора для регулирования перфузионного давления, 4 — регистрации барометрического давления в камере. Отдельным датчиком регистрировали температуру раствора в колбе. Под действием давления в колбе раствор через катетер Swan-Ganz поступал в сосуды мозга крысы. Для точной регулировки перфузионного давления катетер Swan-Ganz через тройник (первый тройник) отдельного канала был соединен со входом второго насоса высокого давления, который возвращал излишек раствора в колбу. Для устранения пульсации давления, создаваемого 2-м насосом высокого давления, второй тройник, отходящий от первого, соединяли с силиконовой трубкой (диаметр 4 мм, толщиной 0,4 мм и длиной 2,5 м) заполненной водой. Подачу раствора в сосуды мозга осуществляли через канал катетера Swan-Ganz, имеющий наибольший диаметр. Другие 3 канала катетера

Swan-Ganz служили для регистрации: 1 — перфузионного давления (электронометр фирмы Statham, США), 2 — напряжения O₂ в растворе, 3 — инфузии уретана и других веществ с помощью инфузора (Pump 22, фирмы Harvard apparatus, Великобритания). Барометрическое давление в колбе устанавливали на уровне 900 мм рт. ст. (контроль — I группа) или 2400—2600 мм рт. ст. (гипербарический режим — II группа).

Обработка ЭКoГ. Электрический сигнал от электродов через усилитель S71 Coulborn instruments (США) поступал в аналого-цифровой преобразователь L2508, затем в компьютер для последующей обработки. С помощью специальной компьютерной программы (разработана С.Л. Каратеевым), рассчитывали амплитуду и мощности ритмов ЭКoГ (быстрое преобразование Фурье) в режиме on line. Эти данные представлялись в графическом изображении на экране компьютера. Энергетический спектр ЭКoГ оценивали для частот: 0,98—4; 4—7,6; 7,6—13,2; 13,2—32 Гц. Средняя амплитуда ЭКoГ по peak-to-peak определялась на основе метода Saunders [6]. Регистрацию мощности частот ЭКoГ и ее амплитуды производили за период в 50 с.

Спектрофотометрическим методом с помощью наборов Boehringer, Mannheim (ФРГ) определяли концентрацию лактата в перфузионной жидкости, поступающей из катетера, находящегося во внутренней яремной вене. В ткани мозга исследовали содержание аскорбиновой кислоты [7], SH-групп белков [8], витамина E [9], малонового диальдегида [10] и диеновых конъюгатов [11]. Указанные показатели регистрировались на 90-й мин перфузии препаратов. В качестве группы сравнения использовали интактных крыс, мозг которых не перфузировали.

Обработку результатов проводили с помощью статистических программ Microstat или Statistica. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Напряжение O₂ в растворе при барометрическом давлении газовой смеси в оксигенационной камере 900 мм рт. ст. (контроль — 1-я группа, n = 5) составляло 970 ± 5 мм рт. ст. Более высокое напряжение O₂ в растворе, чем ожидаемое при барометрическом давлении в оксигенационной камере, объяснялось недостаточной точностью датчика (цена деления 1 атм). При давлении 2400—2600 мм рт. ст. (гипер-

¹ Тезиков Е.Б., Каспаров С.А. Состав для перфузии изолированного мозга млекопитающих. Авторское свидетельство №1635997 с приоритетом от 23 ноября 1988 г. (зарегистрировано 22 ноября 1990 г.).

бария — II группа) измерить напряжение PO_2 в растворе полярографическим методом не представлялось возможным, так как это ограничивалось возможностями прибора. Однако напряжение O_2 в соответствии с законом Генри должно было быть примерно равным этим величинам.

При перфузии мозга только через внутренние сонные артерии и при перфузионном давлении 40—50 мм рт. ст. внешние признаки жизнедеятельности (сокращения дыхательных мышц, мышц головы, корнеальный рефлекс) отсутствовали. Спонтанные дыхательные движения и корнеальный рефлекс наблюдались только при перфузионном давлении свыше 55 мм рт. ст.

Выживаемость перфузируемого мозга (по критериям: — амплитуда ЭКоГ не менее 35 мкВ и быстрый рост перфузионного давления более 60 мм рт. ст.) при давлении в оксигенационной камере 900 мм рт. ст. и 2400—2600 мм рт. ст. составляли 188 ± 29 ($n = 5$) и 288 ± 28 ($n = 5$) мин соответственно. Амплитуда и мощность ритмов ЭКоГ при оксигенации в режимах 900 и 2400—2600 мм рт. ст. представлена в табл. 1 и на рисунке.

Из таблицы видно, что во II группе амплитуда ЭКоГ была почти в 2 раза выше, чем в I группе. При

этом мощность высокочастотного ритма (бета-ритма) была в 3,5—4,7 раза выше, чем при перфузии мозга при давлении в оксигенационной камере 900 мм рт.ст.

У некоторых препаратов мозга скорость потока составляла 2—3 мл/мин, что характерно для перфузии раствором, содержащим эритроциты или фторуглероды.

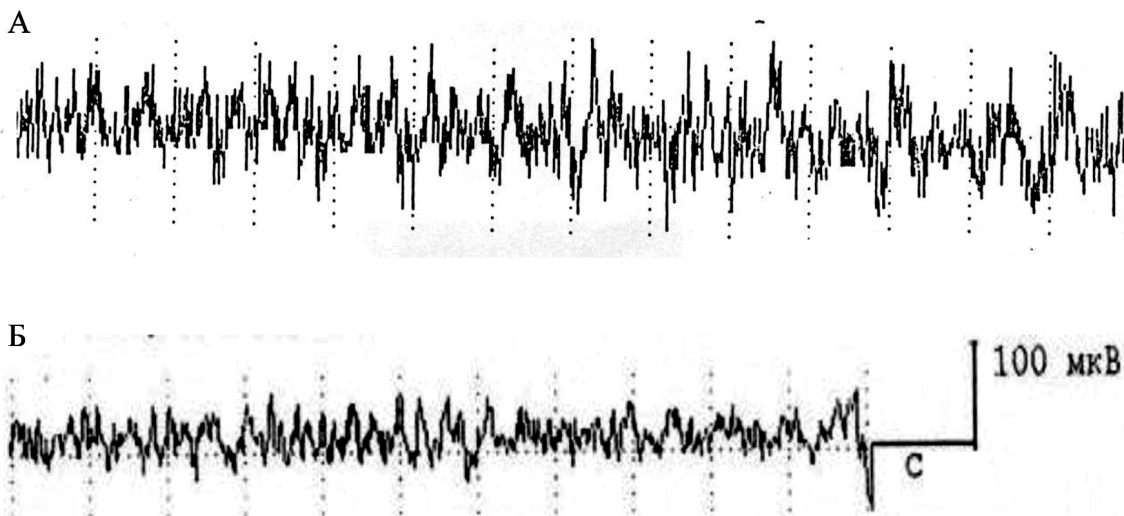
Через 90 мин перфузии мозга во II группе содержание витамина С было статистически значимо выше (на 21%), чем в I группе, а значения параметров SH-групп белков и витамина Е в ткани мозга существенно не различались (табл. 2). Аналогично, содержание перекисей липидов и первичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — диеновых конъюгатов в ткани мозга в группах I и II было одинаковым. В то же время концентрация перекисей липидов в ткани мозга при нормобарическом (I группа) режиме перфузии оксигенации была несколько выше, чем у интактных крыс. Высвобождение лактата из мозга на 90-й мин перфузии при гипербарическом режиме (2400—2600 мм рт. ст.) было в 2,6 раза ниже, чем при нормобарическом. Обнаружена также статистически значимая положительная корреляция высокой степени ($r = 0,741$, $p < 0,001$) между уровня

Таблица 1

Мощность ритмов и амплитуда ЭКоГ при нормобарическом (900 мм рт. ст.) и гипербарическом (2400—2600 мм рт. ст.) режимах оксигенации

Время перфузии (мин)	Группы	n	Амплитуда ЭКоГ	Мощность ритмов ЭКоГ (условные единицы)			
				1—4 Гц	4—7 Гц	7—13 Гц	13—32 Гц
120	I	5	41 ± 2	$8,5 \pm 5,3$	$3,2 \pm 1,8$	$1,7 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,3$
120	II	7	$79 \pm 5^*$	$16,5 \pm 3,7$	$4,5 \pm 0,8$	$2,9 \pm 0,7$	$4,2 \pm 0,9^*$

Примечание. I группа — перфузия раствором с давлением газовой смеси 900 мм рт. ст.; II группа — перфузия раствором с давлением газовой смеси 2400—2600 мм рт. ст.; n — количество препаратов в группе; * — $p < 0,05$ в сравнении с I группой.



ЭКоГ мозга *in situ* на 180-й мин перфузии при барометрическом давлении: А — 2400—2600 мм рт. ст. (II группа) и Б (I группа, контроль).

ми высвобождением лактата из мозга и скорости потока раствора через мозг при одинаковом перфузионном давлении. Таким образом, при более низком потоке раствора у препаратов мозга II группы наблюдалось значительное снижение высвобождения лактата, по сравнению с I группой.

Главным лимитирующим фактором выживаемости и электрической активности мозга *in situ* и *in vivo* является обеспечение мозга кислородом. Именно поэтому для его перфузии используются буферные растворы, содержащие переносчики кислорода — эритроциты или их искусственные заменители [12—16]. Однако приготовление таких растворов сопряжено с высокой трудоемкостью и дороговизной, что лимитирует возможность перфузии ими органов и тканей без рециркуляции. Как фторуглероды и эритроциты взаимодействуют с веществами также не ясно. Адекватное обеспечение кислородом головного мозга, прежде всего корковых нейронов, при перфузии растворами без его переносчиков, может сохраняться только в условиях гипотермии ($t < 31^\circ\text{C}$) или увеличенной в 3 раза скорости потока перфузионного раствора по сравнению с перфузией кровью [17]. Вместе с тем, несмотря на увеличение скорости доставки кислорода и снижение потребности в нем, нейроны мозга, тем не менее, испытывают гипоксию. Это подтверждается тем фактом, что при добавлении в перфузионный раствор небольших количеств перфлюоробутиламина происходило улучшение электрофизиологических характеристик нейронов мозга и пролонгирование их выживаемости [18, 19]. С.М. Varatti и сотрудники пришли к заключению, что без переносчиков кислорода, гипоксия мозга не возникает только при температуре в диапазоне от 18 до 24°C [20].

При перфузионном давлении выше 50 мм рт. ст. нередко развивается отек мозга и повреждение гематоэнцефалического барьера [21—23]. При обычных способах оксигенации парциальное напряжение O_2 в перфузионном растворе составляет не более 700 мм рт. ст. или, как в данной работе — 970 мм рт. ст. Увеличивать скорость перфузии

с целью повышения доставки кислорода можно только до определенного предела, так как рост перфузионного давления способствует развитию отека мозга.

В наших экспериментах кислородная емкость раствора была несопоставима с кислородной емкостью крови или раствора, содержащего фторуглероды. Кислородная емкость солевого раствора при его полном насыщении O_2 в условиях нормобарии (760 мм рт. ст.) составляет $0,024 \text{ O}_2$ мл/мл раствора, тогда как в крови или в растворе, содержащем фторуглероды, этот показатель равен соответственно $0,46$ и $0,39 \text{ O}_2$ мл/мл [24]. Таким образом, для увеличения кислородной емкости раствора, сопоставимой с потребностью мозга в кислороде (величина экстракции кислорода), необходимо напряжение кислорода в растворе при температуре 37°C , не менее $2,5$ — 3 атмосфер. Это означает, что все препараты мозга, перфузируемые без переносчиков кислорода, находились в состоянии гипоксии и для продолжительных исследований не приемлемы.

Предложенный нами принцип гипербарической оксигенации перфузионного раствора основывался на следующих теоретических предположениях:

1 — при напряжении кислорода около 2 — 3 атмосфер кислородная емкость раствора приближается к величине экстракции O_2 мозгом из крови (около $6 \text{ V}\%$);

2 — если мозг перфузировать раствором с таким напряжением кислорода его давление в капиллярах и венолах снизится до внешнего барометрического давления и газовой эмболии не будет.

Таким образом, увеличивать напряжение кислорода в перфузионной жидкости можно, как минимум, до $2,5$ — $3,0$ атмосфер. Дальнейшее повышение напряжения O_2 в растворе возможно при данной технологии, но это может усилить его токсический эффект и, возможно, даже развитие газовой эмболии. Также нужно учитывать фактор температуры раствора, который определяет скорость потребления O_2 мозгом.

Кислородная емкость крови у людей при кратковременном вдыхании чистого кислорода в барокамере

Таблица 2

Показатели интенсивности перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в ткани мозга крыс и содержание лактата в перфузионной жидкости при перфузии растворами с высоким напряжением кислорода

Группы	n	Витамин С, мкмоль/г	SH-группы белков, мкг/г	Витамин Е, мкмоль/г	Перекиси липидов, нмоль/г	Диеновые конъюгаты, нмоль/г	Концентрация лактата, ммоль/л	
							60-я мин	90-я мин
Интактные	6	390 ± 18	$6,1 \pm 0,2$	240 ± 33	257 ± 7	$3,38 \pm 0,51$	—	—
I	6	401 ± 21	$7,0 \pm 0,3^*$	241 ± 6	$350 \pm 9^*$	$2,06 \pm 0,30$	$0,62 \pm 0,09$	$0,63 \pm 0,11$
II	6	$486 \pm 23^*\#$	$6,3 \pm 0,2$	278 ± 12	319 ± 30	$1,33 \pm 0,23$	$0,24 \pm 0,06\#$	$0,23 \pm 0,05\#$

Примечание. Данные представлены в единицах на 1 грамм сырой массы мозга; * — $p < 0,05$ в сравнении с интактными животными; # — $p < 0,05$ в сравнении с I группой.

при барометрическом давлении 3,5 атмосферы составляет 26 об% (более 2,5 избыточных атм. — PO_2 — 2300 мм рт. ст. в артериальной крови) [25, 26]. В этих условиях кислородная емкость плазмы при барометрическом давлении 3,5 атмосферы составляла 4 об%. Потребление кислорода мозгом при дыхании воздухом в условиях нормального барометрического давления составляет 6,1 об%. Таким образом, при напряжении кислорода в плазме 2300 мм рт. ст. потребность мозга в кислороде за счет его фракции, не связанной с гемоглобином, составляет 66%. Такаока и соавт. [18] показали, что при перфузии кровью головного мозга крысы артерио-венозная разница по кислороду достигала $4,3 \pm 2$ об%. Экстраполируя эти данные на условия наших экспериментов, следует учитывать температуру ($32-33^\circ C$) и увеличенную примерно в 1,5—3,0 раза скорость протока перфузионного раствора по сравнению с током крови. При гипотермии ($32^\circ C$) потребность мозга в O_2 снижается в 2 раза.

При барометрическом давлении газовой смеси в оксигенационной камере 2400—2600 мм рт. ст. выживаемость мозга возрастала в 1,5 раза, по сравнению с I группой, и составляла около 5 ч. В отдельных случаях выживаемость мозга превышала 6 ч (дальнейшая перфузия прекращалась, несмотря на нормальную ЭКОГ и перфузионное давление).

Согласно полученным данным, перфузия мозга крыс *in situ* при использовании описанной технологии не вызывает развитие оксидативного стресса. Аналогично, в экспериментах на мышцах в условиях гипербарической оксигенации (100% O_2 в барокамере при давлении от 1,0 до 3,5 атмосфер в течение от 11 мин до 4 ч) не обнаружено накопления в ткани мозга продуктов перекисного окисления липидов — малонового диальдегида и карбонильных белковых производных [27].

Таким образом, разработанная нами технология перфузии мозга крыс *in situ* обеспечивает функционирование головного мозга без переносчиков кислорода в условиях нормального внешнего барометрического давления, как и при использовании переносчиков кислорода.

References

1. Librizzi L., Noe F., Vezzani A., de Curtis M., . Seizure-induced brain-borne inflammation sustains seizure recurrence and blood brain barrier damage. *Ann. Neurol.* 2012; 72(7): 82-90.
2. de Curtis M., Librizzi L., Uva L. The *in vitro* isolated whole guinea pig brain as a model to study epileptiform activity patterns. *J. Neurosci. Meth.* 2016; 260: 83-90.
3. Carriero G., Uva L., Gnatkovsky V., Avoli M., de Curtis M. Independent epileptiform discharge patterns in the olfactory and limbic areas of the *in vitro* isolated guinea pig

brain during 4-aminopyridine treatment. *J. Neurophysiol.* 2010; 103(5): 2728-36.

4. Alyautdin R.N., Tezikov E.B., Kharkevich D.A., Begley D.J., Kreuter J., Ramage P. Significant entry of tubocurarine into the brain of rats by absorption to polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles: an *in situ* brain perfusion study. *J. Microencapsulation* 1998; 15(1): 67-74.

5. Tezikov E.B., Litvicki P.F. Electrophysiological features (EEG) of ethanol withdrawal syndrome on isolated perfused rat brain. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya.* 2015; 59(2):116-22. (in Russian)

6. Saunders M.G. Amplitude probability density studies on alpha and alpha-like patterns. // *Electroencephalog. Clin. Neurophysiol.* 1963; 15(5): 761-67.

7. Omaye S.T., Turnbull D.J., Sauberlich H.E. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids. *Method Enzymol.* 1979; 62(3): 3-10.

8. Wayner D.D.M., Burton G.W., Ingold K.U. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochem. Biophys. Acta* 1987; 924(3): 408-19.

9. Duggan D.E. Spectrofluorometric determination of tocopherols. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 84(5): 116-22.

10. Gorog P., Kotak D.C., Kovacs I.B. Simple and specific test for measuring lipid peroxides in plasma. *J. Clin. Pathol.* 1991; 44(9): 765-67.

11. Placer Z. Lipoperoxygenation systems in biological material. 2. Mitt. bestimmung der lipoperoxydation im saudetierorganismus. *Nahrung* 1968; 12(5): 679-84.

12. Andjus R.K., Suhara K., Sloviter H. An isolated, perfused rat brain preparation, its spontaneous and stimulated activity. *J. Appl. Physiol.* 1967; 22(5): 1033-39.

13. Dirks B., Kriegelstein J., Lind H.H., Rieger H., Schutz H. Fluorocarbon perfusion medium applied to the isolated rat brain. *J. Pharmacol. Methods* 1980; 4(3): 95-108.

14. Kriegelstein J., Stock R. The isolated perfused rat brain as a model for studying drugs actions on the CNS. *Psychopharmacologia* 1974; 35(3): 169-77.

15. Rakic L.M., Zlokovic B.V., Davson H. et al. Chronic amphetamine intoxication and the blood-brain barrier permeability to inert polar molecules studied in the vascularly perfused guinea pig brain. *J. Neurological Sci.* 1989; 94: 41-50.

16. Takaoka Y., White R.J., Likavec M.J. A high performance isolated rat brain preparation part II: Cerebral blood flow in relation to perfusion pressure and cerebral hypothermia. *Resuscitation.* 1985; 12(4): 261-64.

17. Llinas R., Muhlethaler M. An electrophysiological study of the *in vitro*, perfused brain stem-cerebellum of adult guinea-pig. *J. Physiol.* 1988; 404(2): 215-40.

18. Hawkins R.A., Williamson D.H., Krebs H.A. Ketone bodies are selectively used by individual brain regions. *Science* 1979; 205(3): 325-27.

29. Llinas R. Yarom Y., Sugimori M. Isolated mammalian brain *in vitro*: new technique for analysis of electrical activity of neuronal circuit function. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 1981; 40(8): 2240-45.

20. Baratti C.M., Rubio M.C., Peres C.J., Tiscornia O.M. Effect of chronic alcohol feeding on adrenergic and cholinergic neurotransmission mechanism. *Am. J. Gastroenterol.* 1980; 73(1): 21-7.

21. Hayashi F., Jiang C., Lipski J. Intracellular recoding from respiratory neurones in the perfused '*in situ*' rat brain. *J. Neurosci. Meth.* 1991; 36(1): 63-70.

22. Mayhan W.G., Heistad D.D. Role of veins and cerebral venous pressure in disruption of the blood-brain barrier. *Circ. Res.* 1986; 59(2): 216-20.

23. Richerson G.B., Getting P.A. Maintenance of complex neural function during perfusion of the mammalian brain. *Brain Res.* 1987; 409(1):128-32.

24. Sloviter H.A. Perfluorochemical emulsions and perfusion of isolated organs. *Intern. Anesthesiol. Clinics.* 1985; 23(1): 37-46.

25. Lambertsen C.J. Oxygen toxicity. Arterial and internal jugular blood gas composition in man during inhalation

of air, 100 % O₂ and 2% CO₂ in O₂ at 3.5 atmospheres ambient pressure. *J. Appl. Physiol.* 1955; 8(8): 255-61.

26. Lambertsen C.J. Comparison of relationship of respiratory minute volume to PCO₂ and pH of arterial and internal jugular blood in normal and during hyperventilation produced by low concentrations of CO₂ at 1 atmosphere and by O₂ at 3.0 atmospheres. *J. Appl. Physiol.* 1953; 5(2): 803-11.

27. Liua S., Shirachid D.Y., Quock R.M. The acute antinociceptive effect of hyperbaric oxygen is not accompanied by an increase in markers of oxidative stress. *Life Sci.* 2014; 98(1): 44-8.

Сведения об авторах:

Тезиков Евгений Борисович, доктор мед. наук, проф., каф. патофизиологии, e-mail: Tezikov.mma@gmail.com

Пирожков Сергей Викторович, доктор мед. наук, проф., каф. патофизиологии

Каратеев Сергей Львович, математик

Литвицкий Петр Францевич, доктор мед. наук, проф., чл.-корр. РАН, зав. каф. патофизиологии