

УДК 591.111.01

П.Н. Малин¹, С.А. Абдрашев¹, Е.В. Фролова¹, В.Я. Гуськова², Н.В. Шеголова², В.Р. Сартсян³, Д.И. Маслова³
¹ Луганський державний медичинський університет, ² Луганська обласна станція переливання крові, ³ Луганська діагностична лабораторія

РАЗМНОЖАЮТСЯ ЛИ ТРОМБОЦИТЫ IN VITRO?

Данные проведенных исследований показали, что существует возможность размножения тромбоцитов *ex vivo* при условии помещения их в суспендирующую среду аутоплазмы или официального дополнительного раствора для хранения тромбоцитов.

Ключевые слова: размножение, тромбоцит, морфометрические показатели.

Исследования последних лет доказали, что тромбоциты обладают способностью к размножению. Этот процесс отличается от процесса деления клеток, имеющих ядро: проведя ряд экспериментов, ученые обнаружили, что тромбоциты размножаются путем а) почкования, б) удлинения клеток с их поперечным делением и образованием цепочек (рис. 1).

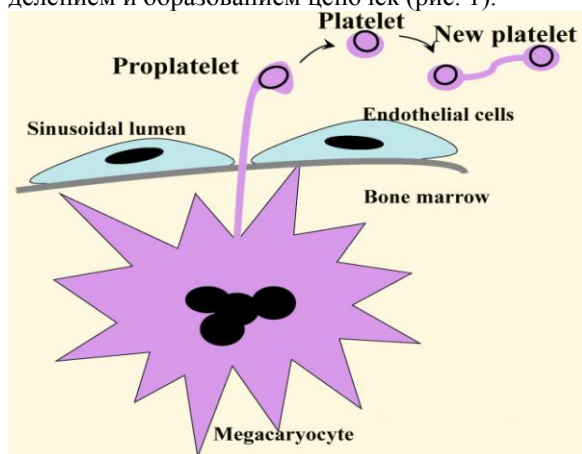


Рис. 1. Размножение тромбоцитов. По Schwertz H. et al. [19].

Изучение полученных новых структур показало их полную идентичность родительским клеткам, как по морфологии, так и по функциональной активности [7, 15, 18, 19]. Кроме того, исследователи наблюдали процессы образования цепочек тромбоцитов в компонентах донорской крови, где клетки сохраняли способность к размножению в течение нескольких суток после заготовки [18]. Это открывает новые возможности для трансфузионной медицины, поскольку эффективность применения содержащих тромбоциты компонентов донорской крови зависит от количества клеток в дозе, а также удельного веса функционально полноценных («юных», «зрелых») форм. Способность тромбоцитов к размножению проявляется при наличии определенных условий, в том числе наличии в окружающей среде материала для построения новых клеток [6,17,19].

Целью работы было определение возможности размножения тромбоцитов *in vitro* во взвеси, приготовленной с использованием аутологичной плазмы и суспендирующего раствора SSP+, без создания дополнительных условий для их культивирования.

Материал и методы исследования. Исследовали взвесь тромбоцитов, выделенную из венозной крови группы 0(I) 26-ти доноров-мужчин в возрасте 20-36 лет. Взвесь готовили в асептических условиях с учетом минимизации адгезии кровяных пластинок: был исключен контакт последних с лабораторным стеклом. Использованы контейнеры из поливинилхлорида с гемоконсервантом «CPDA-1» производства ZPSM «RAVIMED», Польша; суспендирующий раствор SSP+ производства «MacoPharma Mouvaux», Франция; изготовленные из полистирола стерилизованные радиационным методом пробирки (Spektar, Сербия) и наконечники к микродозаторам (Thermo Electron Oy, Финляндия). Взятые в опыт: группа образцов 1 – тромбоциты, взвешенные в 100%-ной аутологичной плазме; группа образцов 2 – тромбоциты во взвешивающем растворе SSP+ с 20% аутологичной плазмы. Тестирование образцов, хранившихся при температуре $(20 \pm 2)^{\circ}\text{C}$, осуществлялось в течение 5-ти суток с момента заготовки, ежедневно. Морфометрический контроль тромбоцитов в обеих группах образцов осуществлялся на основании показателей автоматических гематологических анализаторов: Micros 60 OT (HORIBA ABX Diagnostics Inc., Франция) и HB-7021 (SINNOWA Medical Science & Technology Co., LTD, Китай), включающих параметры: среднее количество тромбоцитов (PLT), средний объем тромбоцитов (MPV), относительная ширина распределения тромбоцитов по объёму (PDW). Уровень холестерина во взвешивающей тромбоциты среде определяли при помощи автоматического биохимического анализатора Cobas Integra 400 plus (ROCHE Diagnostics Ltd., Швейцария).

Морфологические исследования тромбоцитов осуществлялись с использованием микроскопа для морфологических исследований MICROmed XS-3330 (Ningbo Shenghend Optics & Electronics Co., LTD, Китай), цветной цифровой видеокамеры SAMSUNG SCC-B1011 (Samsung Electronics, Корея), увеличение в 1600 крат. Окраска тромбоцитов в мазках производилась по А. Фолио [8]. Снимки были сделаны на 3-и сутки наблюдения.

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета программы Statistica v.8. Для оценки достоверности различий в сравниваемых показателях использовали критерий Стьюдента-Фишера. Статистическую связь между рядами признаков определяли при помощи коэффициента ранговой корреляции

Спирмена по Л.Е. Полякову (1971). Условные обозначения статистических параметров в тексте и таблицах представили следующим образом: М - средняя арифметическая, m- ошибка репрезентативности (средняя ошибка для средних или относительных величин), r - коэффициент корреляции, р - доверительная вероятность.

Результаты исследования и их обсуждение. В момент заготовки среднее значение PLT в группах образцов 1 и 2 составило $(239,3 \pm 29,33) \cdot 10^9/\text{л}$ (группа образцов 1) и $(240,7 \pm 27,03) \cdot 10^9/\text{л}$ (группа образцов 2), что соответствует параметрам тромбоконцентрата, применяющегося для оказания трансфузиологического пособия больным, а именно от $200 \cdot 10^9$ до $800 \cdot 10^9$ тромбоцитов [12,13]. При исследовании образцов как 1-й, так и 2-й группы выявлена устойчивая тенденция к росту числа клеток в течение первых 3-х суток (рис. 2,3).

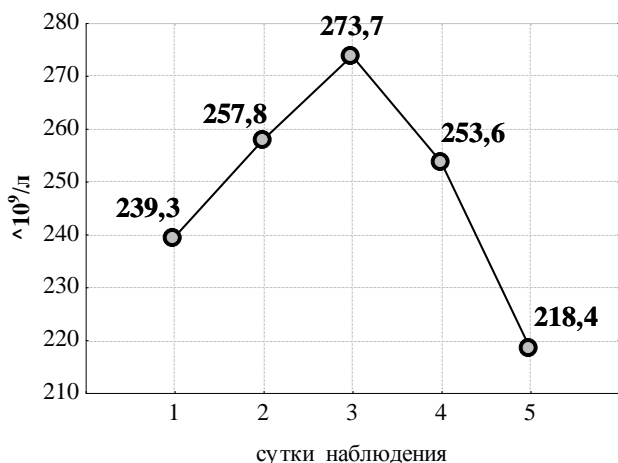


Рис. 2. Среднее число тромбоцитов, взвешенных в аутоплазме (группа 1), на протяжении срока наблюдения, $\cdot 10^9/\text{л}$.

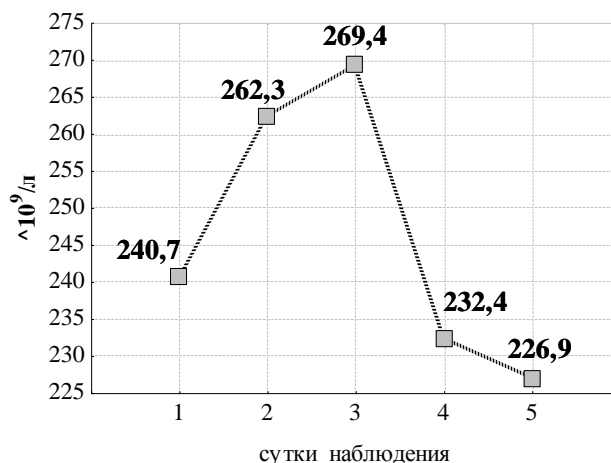


Рис. 3. Среднее число тромбоцитов, взвешенных в SSP+ (группа 2), на протяжении срока наблюдения, $\cdot 10^9/\text{л}$.

Достигнув пика на 3-и сутки (рост на 14,4%), показатель PLT в 1-й группе образцов снижлся: в 4-е сутки – на 7,9% относительно наивысшего значения, и далее к 5-м суткам – на 25,3%. Относительно момента заготовки к концу срока наблюдения снижение числа клеток составило 9,6%. Очевидно, «старые» клетки, попавшие в образцы в момент их заготовки, и образовавшиеся из «зрелых» в процессе хранения образцов, разрушались, что и обусловило снижение PLT на данном этапе наблюдения.

В образцах группы 2 повышение количества тромбоцитов было более значимым на 2-е сутки, чем в группе 1 (9,0% против 7,7%) и не столь значимым на 3-и сутки (11,9% против 14,4%). Обратил на себя внимание тот факт, что на 4-е сутки наблюдения количество тромбоцитов в образцах снижалось более резко, чем в группе 1 (15,9% против 7,9%). Следовательно, в суспендирующей среде образцов группы 2 условия менее адекватны для сохранения клеток. К концу срока наблюдения число клеток по сравнению с исходным снизилось на 6,8%. Учитывая данные литературы, можно предположить, что повышение числа клеток в образцах может быть обусловлено: а) трансформацией в тромбоциты гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), возможно, имеющихся в образцах в числе остаточных клеток донорской крови [1]; б) размножением тромбоцитов *in vitro*. Известно, что ГСК циркулируют в кровеносном русле человека в количестве 1:100000 клеток крови [5]. В выделенном из донорской крови тромбоконцентрате имеет место остаточное количество лейкоцитов ($0,05\text{--}0,2 \cdot 10^9/\text{л}$) [4,11] и незначительное количество эритроцитов. Следовательно, теоретически ГСК также могут попадать в исследуемый материал, несмотря на то, что диаметр гемопоэтических стволовых клеток (около 6,5 мкм) превышает таковой у тромбоцитов (2-4 мкм), приближаясь к размеру эритроцитов (7-8 мкм) [2,9]. Однако можно предположить, что при дифференцированном центрифугировании большая часть ГСК будет удалена вместе с эритроцитами и лейкоцитами.

Кроме того, развитие и дифференцировка ГСК регулируются специфическим микроокружением и гемопоэтическими ростовыми факторами, которые включают, в частности, цитокины (IL-3, IL-6, IL-11), гормоны (тромбопоэтин) [3,10]. Возможности использования данных стимулов для продукции дифференцированного, функционального потомства ГСК практически лишены в группе образцов 2, так как сохранено лишь 20% аутоплазмы, в то время как микроокружение клеток в образцах группы 1 (100%-ная аутоплазма) может содержать определенное количество указанных факторов. Однако результаты исследований показали процесс нарастания количества тромбоцитов, сходный в обеих группах. Следовательно, стволовые клетки не могут быть единственным источником новых тромбоцитов, появление которых в образцах очевидно. Нами была принята рабочая гипотеза о размножении тромбоцитов *in vitro*. Она косвенно подтверждается тем, что средний объем исследуемых тромбоцитов на протяжении срока наблюдения имел тенденцию к увеличению, а к 4-м суткам (в группе образцов 2 – к 3-м суткам) возрос достоверно (табл. 1).

На всех этапах наблюдения статистически значимых различий в MPV между образцами 1-й и 2-й групп выявлено не было. Выявленная динамика MPV требует объяснения. Известно, что наибольшими размерами обладают так называемые «тромбоциты раздражения», появляющиеся в популяции тромбоцитов *in vivo* при

тромбоцитопениях различного генеза [21]. Однако в условиях искусственной среды выделенных из донорской крови тромбоцитов *in vitro* отсутствует источник возникновения мегакариоцитарных форм. Следовательно, увеличение объема тромбоцитов имеет иную природу. Популяция тромбоцитов, изначально помещенная в пробирку, на 92,5-97,4% [2] состоит из «зрелых» и «старых» клеток, подверженных процессу «platelet storage lesion» (повреждение во время хранения) [14,16,20]. Содержащихся в данной популяции «юных» клеток (до 0,8%) недостаточно для того, чтобы при их трансформации в «зрелые» к 5-м суткам сохранилось значительное количество тромбоцитов и их объем, что имело место в нашем исследовании. Поэтому можно предположить, что «зрелые» клетки претерпевали возрастные изменения (следовательно, уменьшались в объеме) [2], а «старые» разрушались по мере хранения образцов, и их нишу заполняли более крупные «потомки». В связи с изложенным было сделано предположение о том, что *in vitro* имело место именно размножение тромбоцитов.

Таблица 1

Сутки наблюдения	MPV во взвеси тромбоцитов, фл	
	Аутоплазма	Взвешивающая среда
1	7,54±0,19	SSP+ 7,34±0,19
2	7,91±0,20	7,71±0,17
3	7,99±0,16	8,17±0,18*
4	8,17±0,16*	8,23±0,20*
5	8,30±0,19*	8,37±0,18*

Примечание: * p<0,05 в сравнении с показателем 1-х суток наблюдения

Общеизвестно, что появление новой клетки предусматривает «строительство» ее составляющих. Для того чтобы подтвердить или отрицать расходование из окружающей тромбоциты среды «строительного материала» для новых клеток, нами был выбран показатель уровня холестерина как обязательной составляющей мембраны тромбоцита. Изучили динамику показателя уровня холестерина во взвешивающей среде на этапах наблюдения (рис. 4,5). Выявлена корреляционная связь между количеством тромбоцитов в исследуемых образцах и уровнем холестерина во взвешивающей среде, что подтверждает расходование последнего на построение новых клеток в первые 3-е суток наблюдения и увеличение его содержания по мере «platelet storage lesion» (табл. 2).

Дисперсия распределения тромбоцитов по объему (PDW) в каждый день наблюдения в обеих группах образцов оставалась неизменной (колебания от 11,0% до 11,4% в 1-й группе образцов и от 10,6% до 10,9% во 2-й группе, не имеющие статистической значимости). Это также свидетельствует в пользу появления в популяции тромбоцитов новых клеток, позволяющих сохранить баланс «старые»/«юные» клетки на первоначальном уровне, так как при хранении тромбоциты *in vitro* неизбежны «старение» и гибель «стареющих» и «старых» клеток. Предположение о размножении тромбоцитов *in vitro* потребовало подтверждения при помощи микроскопии. В образцах обеих групп нами были выявлены признаки этого процесса, описанные в литературе, – почкование тромбоцитов (рис. 6); тромбоциты в виде палочек, имеющих в центре оптическое уплотнение (рис. 7), впоследствии размножающихся поперечным делением; образование цепочек, состоящих из 3-х, 4-х, 5-ти клеток (рис. 8, 9, 10).

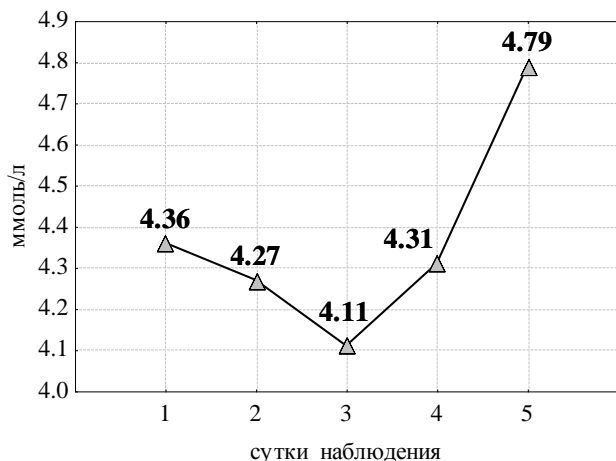


Рис. 4. Уровень холестерина во взвешивающей тромбоциты среде (аутоплазма), группа образцов 1.

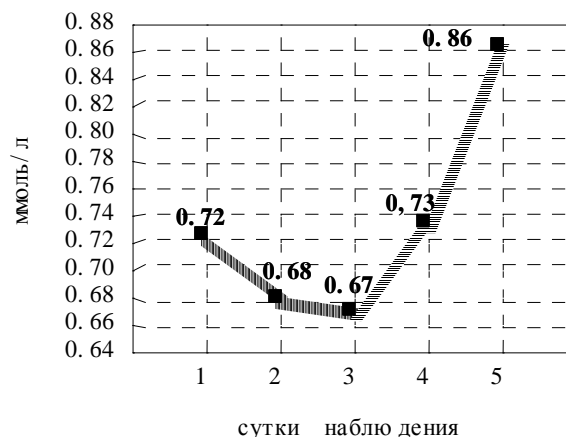


Рис. 5. Уровень холестерина во взвешивающей тромбоциты среде (SSP+), группа образцов 2.

Таблица 2

Матрица корреляционной связи количества тромбоцитов и уровня холестерина во взвешивающей среде исследуемых образцов

Пара корреляционной связи	Аутоплазма		Взвешивающая среда	
	г	р	г	р
Количество тромбоцитов – уровень холестерина	-0,99	<0,05	-0,99	<0,05

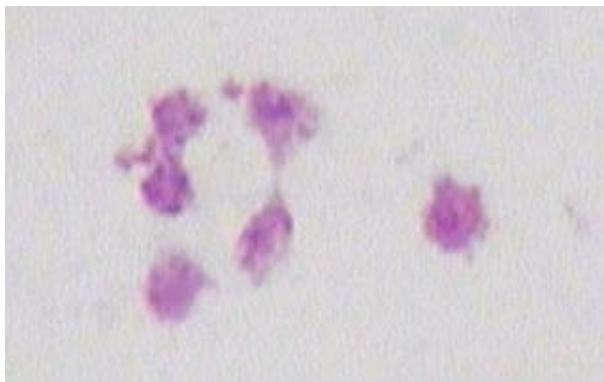


Рис. 6. Почкование тромбоцитов.

Нам также удалось зафиксировать на снимках связь тромбоцитов с эритроцитами (рис. 11, 12), охарактеризованную М.В. Лифановским и В.А. Ульман как «паразитирование» тромбоцитов с использованием кислорода гемогрупп, аминокислот эритроцитов [7]. Почему же нет статистической достоверности увеличения PLT вследствие размножения тромбоцитов в опытных образцах? Не исключено, что оно маскируется естественной гибелью «старых» клеток в процессе хранения образцов; ускоренным «старением» с последующей гибелью «зрелых» тромбоцитов по причине условий искусственного окружения, не содержащего достаточного количества веществ, обеспечивающих адекватное поддержание морфофункциональных свойств тромбоцитов.

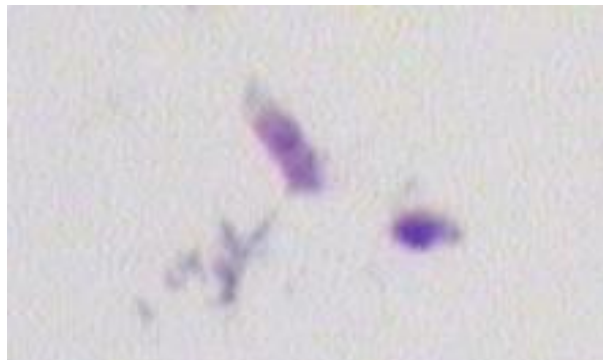


Рис. 7. Тромбоцит в виде палочки.

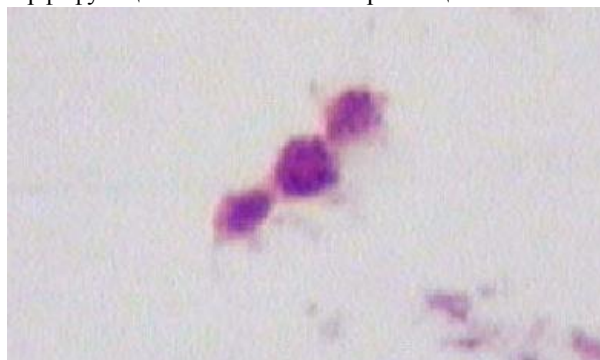


Рис. 8. Тромбоциты в цепочке из 3-х клеток.

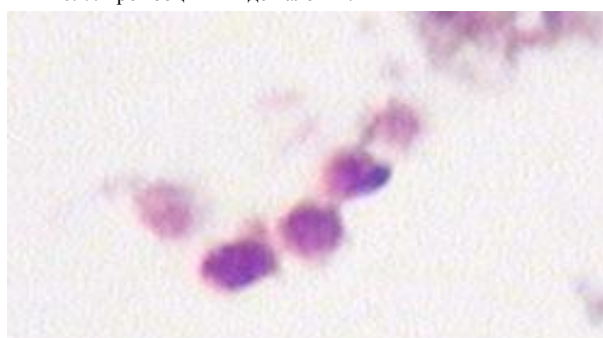


Рис. 9. Тромбоциты в цепочке из 4-х клеток.

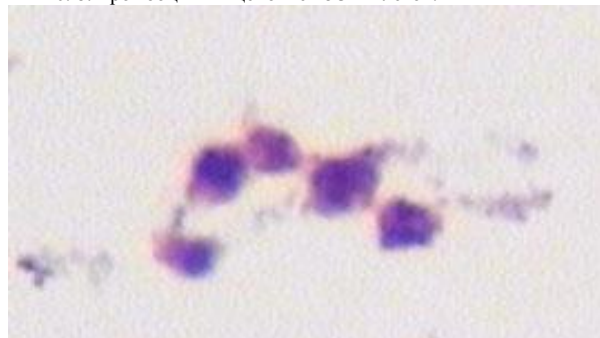


Рис. 10. Тромбоциты в цепочке из 5-ти клеток.



Рис. 11. Тромбоцит в связи с эритроцитом. Образец группы 1



Рис. 12. Тромбоцит в связи с эритроцитом. Образец группы 2

Итак, исследования показали вероятность размножения тромбоцитов *in vitro*. Однако для того, чтобы полностью доказать это предположение, необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение возможных причин увеличения объема тромбоцитов в процессе хранения: за счет изменения водно-электролитного баланса, за счет образования агрегатов, расцениваемых автоматическим гематологическим анализатором как единая большая клетка (изучить с помощью агрегометра).

Удостоверено

Выбранные для сравнения взвешивающие среды для заготовки тромбоцитов человека (аутологичная плазма и ресуспендирующий раствор SSP+) в равной степени обеспечивают не только сохранность

морфометрических показателей тромбоцитов в течение 5-ти суток хранения, но и увеличение числа клеток в первые 3-е суток. Не исключено, что тромбоциты сохраняют возможность размножаться *in vitro*, даже при условии их хранения в суспендирующем растворе, содержащем лишь неорганические вещества.

При условии доказанности появления новых клеток в их взвеси *in vitro* следует рассмотреть варианты моделирования суспендирующей тромбоконцентрат среды путем добавления компонентов, способных обеспечить благоприятные условия для размножения тромбоцитов.

Жибурт Е.Б.

1. Бенедь О.О. Стволовые клетки, их використання в практичній медицині http://www.transplantology.com/index.php?option=com_content&task=view&id=388&Itemid=42.
2. Гайдукова С.М. Тромбоцитоз в лікарській практиці / С.М. Гайдукова, С.В. Видиборець // Мистецтво лікування. – 2004. – №10. – С. 16-18.
3. Гривенников И.А. Эмбриональные стволовые клетки и проблема направленной дифференцировки / И.А. Гривенников // Успехи биологической химии. – 2008. – Т. 48. – С. 181-220.
4. Жибурт Е.Б. Совершенствование получения концентрата тромбоцитов / Жибурт Е.Б., Коденев А.Т., Вашенко Г.А. // Вестник службы крови России. – 2010. – N 2. – С.22-25.
5. Космачёва С.М. Стволовые клетки взрослых: проблемы получения, дифференцировки *in vitro*, перспективы клинического применения / Космачёва С.М., Волк М.В., Потапнев М.П. // Медицинские новости. – 2008. – №9. – С. 5-9.
6. Лифановский В.А. Способ получения тромбоцитов / Патент Р.Ф. №2068265, 1992г. <http://www.hemostas.ru/society/publications/p9.shtml>
7. Лифановский М.В., Ульман В.А. Размножение тромбоцитов? / Калининград: Калинингр. кн. изд-во, 1994. – 71с.
8. Медицинские лабораторные технологии: [Справочник] / Под ред. Карпищенко А.И. – Санкт-Петербург, «Интермедика», 1998. – Том 1. – 407 с. (С. 309)
9. Общероссийская общественная организация российская ассоциация трансфузиологов. Донорская кровь и ее компоненты: характеристики и контроль качества. XVII. Гемопозитические стволовые клетки. Стандарт орг-и 17, дата принятия 01.04.2005. [transfusion.ru > rat/doc/doc17.pdf](http://transfusion.ru/rat/doc/doc17.pdf)
10. Онищенко НА. Современные представления о биологии стволовых клеток костного мозга и крови в аспекте их клинического применения / Онищенко НА., Крашенинников М.Е. // Вестн. трансплантол. и искусственн. органов.- 2004. – №3. – С.54-62.
11. Порядок контролю за дотриманням показників безпеки та якості донорської крові, її компонентів. Мет. рекомендації, затв. Наказом Міністерства охорони здоров'я України від 9 березня 2010 року N 211. Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 8 червня 2010 р. за N 368/17663.
12. Техническое руководство Американской ассоциации банков крови / Пер. с англ. – Милан: Европейская школа трансфузионной медицины. – 2000. – 1055 с. (С. 604)
13. Чугрієв А.М., Терещук Т.О. Контроль якості концентрату тромбоцитів, отриманого методом переривчастого аферезу // Гемостаз – проблеми та перспективи: Матеріали II міжнародного симпозиуму (8-9 листопада 2006р.). – Київ, 2006. – Гематологія і переливання крові. – 2006. – №33. – С. 148. www.nbu.gov.ua/portal/Chem_Biol/Gipk/2006_33/II/06cammpa.pdf
14. Devine D.V. The Platelet Storage Lesion / Devine D.V., Serrano K. // Clin. Lab. Med. 2010 V. 30. - №2. – P. 475-487.
15. Helbig W. Effect of polyenyl phosphatidylcholines on thrombocyte adhesiveness and thrombocyte propagation *in vitro* / Helbig W. // Z. Gesamte Inn. Med. – 1974. – №29(11). – P. 456-459.
16. Kaufman R. M. Platelets: Testing, Dosing and the Storage Lesion—Recent Advances / Kaufman R. M. // Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006. – P. 492-496.
17. Moake J. Platelets in bloom / Moake J. // Blood. – 2010. – Vol. 115, Issue 18. – P. 3650-3651.
18. Schwertz H., Blyalock R.C., Kraiss L. W. Terminally-differentiated anucleate platelet progeny <http://www.sumobrain.com/patents/wipo/Terminally-differentiated-anucleate-platelet-progeny/WO2010042179A1.pdf>.
19. Schwertz H. Anucleate platelets generate progeny / Schwertz H., Köster S., Kahr W. // Blood. – 2010. – №115. – 3801-3809
20. Thon J.N. Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets / Thon JN, Devine DV. // Transfusion. – 2007. – №47(12). – P. 2260-2270.
21. Trowbridge E.A. Platelet volume heterogeneity in acute thrombocytopenia / Trowbridge E.A., Warren C.W., Martin J.F. // Clin. Phys. Physiol. Meas. – 1986. – №7. – P. 203-210.

Малиш П.М.

ЧИ РОЗМНОЖУЮТЬСЯ ТРОМБОЦИТИ IN VITRO?

Малиш П.М., Кондрашев С.О., Фролова О.В.,
Гусакова В.Я., Щоголева Н.Б., Саргсян В.Р.,
Маснева Л.П.

Дані проведених досліджень показали, що існує можливість розмноження тромбоцитів *ex vivo* за умови вміщення їх у суспендуюче середовище

WHETHER WILL PLATELETS REPRODUCE IN VITRO?

Malysh P.N., Kondrashev S.A., Frolova E.V.,
Gusakova V.Ya., Zshogoleva N.B., Sargsyan V.R.,
Masneva L.P.

There is possibility of reproduction of platelets *ex vivo* under putting them in the suspending medium of autoplasm or officinal additional solution

аутоплазми або офіціального додаткового розчину для зберігання тромбоцитів.

Ключові слова: розмноження, тромбоцит, морфометричні показники.

Стаття надійшла 28.06.2011 р.

at deposit of platelets as it was shown by carried out researches.

Key words: reproduction, platelet , morphometric indexes.

УДК: 616.831.31-009.24- 092.9

В.О. Попельний

Одеський національний медичний університет, м. Одеса

ВПЛИВ АСПІРАЦІЇ ПАЛЕОЦЕРЕБЕЛЯРНОЇ КОРИ НА ФОРМУВАННЯ ВОГНИЩ ЕПІЛЕПТОГЕНЕЗУ В КОРІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ З РЕЗИСТЕНТНОЮ ФОРМОЮ ЕПІЛЕПТИЧНОГО СИНДРОМУ

В гострих дослідях на щурах лінії Вістар у яких відтворювали модель резистентної до лікування форми епілептичного синдрому (введення коразолу в дозі 30.0 мг/кг, в/очер на протязі трьох тижнів з наступним чотиритижневою перервою у введеннях епілептогену) встановлено, що під впливом аспірації палеоцеребелярної кори виникає скорочення часу появи епілептичних розрядів, які викликались в лобних відділах кори головного мозку шляхом нанесення розчину натрієвої солі бензілпеніциліну (10.000 МО/мл). Крім того, спостерігалось скорочення часу досягнення максимальної амплітуди розрядів, збільшення їх амплітуди і зміщення моди жіспайкових інтервалів в бік їх скорочення. Під впливом аспірації палеоцеребелярної кори збільшувався час існування епілептичних вогнищ.

Ключові слова: епілептичне вогнище, кора хробака мозочка, пеніцилін, резистентна форма епілептичного синдрому.

Мозочок є важливою складовою ланкою антиепілептичної системи мозку [1, 2]. Встановлено полегшення розвитку епілептичних вогнищ, які індуковані розчином пеніциліну, стрихніну [2], а також каїнової кислоти [3] в корі головного мозку кішок під впливом видалення мозочку. Підвищення функціонального стану як кори, так ядер мозочку супроводжується пригніченням активності епілептичних вогнищ [2, 5]. Разом з тим, залишаються нез'ясованими патофізіологічні механізми протиепілептичних впливів утворень мозочку, зокрема за умов виникнення та розвитку резистентних до дії антиепілептичних засобів форм епілептичного синдрому [6].

Метою роботи було дослідження особливостей динаміки формування вогнищ епілептогенезу, які викликали шляхом аплікації розчину натрієвої солі пеніциліну на кору головного мозку щурів у яких було модельовано резистентну форму епілепсії, за умов локальної аспірації палеоцеребелярної кори.

Матеріал та методи дослідження. Досліди проведено на щурах- самцях лінії Вістар масою 150- 200 г за умов гострого експерименту. Резистентну форму епілептичного синдрому викликали шляхом повторного застосування коразолу (30,0 мг/кг, в/очер) («Sigma-Aldrich», Німеччина) на протязі 3 тижнів, після чого створювали проміжок (чотири тижні) на протязі якого не впливали епілептогенами [4]. За цей час у кіндлінгових щурів формується фармакологічна резистентність [4].

Через три тижні з моменту останнього застосування коразолу під ефірним наркозом тваринам здійснювали трахеотомію, розрізом від носових кісток до потилиці розсікали шкіру та підшкірну клітковину. В місці кріплення екстензорних шийних м'язів проводили інфільтрацію тканин 0,5% розчином новокаїну та тупим методом відсепарували їх від потиличної кістки. Після міорелаксації (d-тубокурарін в дозі 0,2 мг/кг, в/очер) («Orion», Фінляндія) та підключення апарату штучного дихання трепанували кісткову тканину в лобному та потиличному відділах, з метою забезпечення доступу до сенсомоторних відділів неокортексу та зони хробака мозочку. Після розтину твердої мозкової оболонки в області лобних відділів кори головного мозку створювали епілептичне вогнище за допомогою аплікації фільтрувального папірця (2 мм²), який був змочений розчином натрієвої солі бензілпеніциліну (10.000 МО/мл). Тривалість існування вогнищ визначали з моменту появи першого і до останнього спайку. Після 2- 3 подібних визначень проводили аспірацію кори палеоцеребелуму під візуальним контролем. Повторне утворення епілептичного вогнища проводили таким же чином через 40- 60 хв з моменту аспірації мозочку [2]. Для оцінки ефектів на частоту генерування епілептичних потенціалів застосовували методику побудування гістограми міжспайкових інтервалів, яку проводили на основі підрахунку числа інтервалів певної тривалості на протязі перших 5 хв генерування потенціалів максимальної амплітуди в вогнищах [1]. Запис біопотенціалів проводили монополярно на комп'ютерному електроенцефалографі DX-5000 (Харків), індиферентний електрод кріпили в носових кістках. До уваги приймали лише результати дослідів, в яких повнота видалення кори палеоцеребелуму була верифікована гістологічно після введення тваринам великої дози (100 мг/кг, в/очер) нембуталу. Результати досліджень обробляли статистично із застосуванням критеріїв ANOVA+ Newmann- Keuls, а також критерію Фішера.