

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І  
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ  
ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ**

***НАУКОВО-МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ***  
**ВИКОРИСТАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН**  
**ДЛЯ ЛІКУВАННЯ УШКОДЖЕНЬ**  
**КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ**



**КИЇВ – 2022**



**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І**  
**ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**  
**ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ**

**Розглянуто і затверджено**  
**Вченою радою НУБіП України,**  
**протокол № 10 від 22 червня 2022 р.**

**НАУКОВО-МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**  
**ВИКОРИСТАННЯ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ДЛЯ**  
**ЛІКУВАННЯ УШКОДЖЕНЬ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ**

**КИЇВ – 2022**

## **Науково-методичні рекомендації «Використання стовбурових клітин для лікування ушкоджень кісткової тканини»**

### **Розробники:**

А. Й. Мазуркевич – доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН України;

Т.Л. Савчук – кандидат ветеринарних наук, старший викладач;

Р.Р. Бокотько – кандидат ветеринарних наук, старший викладач;

М. О. Малюк – доктор ветеринарних наук, професор;

Л.В. Кладницька – доктор ветеринарних наук, доцент;

В.В. Ковпак – доктор ветеринарних наук, доцент;

Ю. О. Харкевич – кандидат ветеринарних наук, доцент

### **Рецензенти:**

**Ничик С. А.**, - доктор ветеринарних наук, професор, директор Інституту ветеринарної медицини НААН, член-кореспондент НААН;

**Мельник О. П.**, - доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри анатомії, гістології і патоморфології тварин ім. акад. В. Г. Касяненка Національного університету біоресурсів і природокористування України

Науково-методичні рекомендації «**Використання стовбурових клітин для лікування ушкоджень кісткової тканини**» призначені для використання в науково-дослідницьких установах, закладах вищої освіти, клініках ветеринарної медицини для вивчення і поглиблення знань щодо впливу стовбурових клітин на регенеративні процеси в тканинах.

### **Рекомендації розглянуто й затверджено:**

Вченою радою НУБіП України (протокол № 10 від 22 червня 2022 р.)

Видання здійснено за авторським редагуванням.

Відповідальний за випуск: Савчук Т.Л.

Підписано до друку 00.00.2020 р. Формат 60×84 1/16

Ум. друк. арк. 2.6 Тираж 100 пр.

Видавничий центр НУБіП України.

03041 Київ, вул. Героїв Оборони, 15.

# ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	7
ОТРИМАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН.....	8
ВВЕДЕННЯ КУЛЬТУРИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН.	11
ЗАСТОСУВАННЯ КУЛЬТУРИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЗА УШКОДЖЕНОЇ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ.....	12
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	17
ДОДАТКИ.....	19

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

**БСА** – бичачий сироватковий альбумін

**КМ** – кістковий мозок

**КРТ** – клітинно-регенеративна терапія

**КТ** – кісткова тканина

**ЛФ** – лужна фосфатаза

**МСК** – мезенхімальні стовбурові клітини

**РО** – репаративний остеогенез

**СК** – стовбурові клітини

**ФБР** – фосфатно буферний розчин

**DMEM** – середовище Ігла, модифіковане Дюльбекко

**MEM** – мінімальне середовище Ігла

**FBS** – фетальна сироватка теляти

**ITS** – інсулін Іг/л, селенін 0,67 мг/л, трансферин 0,55г/л

## ВСТУП

Розроблення нових методів прискорення процесів регенерації ушкодженої кісткової тканини нині набуває особливого значення, оскільки кількість ускладнень, пов'язаних із сповільненням або порушенням процесів регенерації кісткової тканини, залишається досить високою. Повне відновлення кісткової тканини часто відбувається із порушенням консолідації кісткових відламків та не зрощенням. Результатом цього є незрощення кісткових відламків або уповільнення зрощення і утворення хибних суглобів, а великі дефекти не можуть спонтанно відновлюватися.

Аналіз сучасного стану проблеми лікування хворих з розладами кісткової регенерації показав, що незважаючи на численні дослідження, є ціла низка спірних і невияснених питань. Найбільш важливими з них є проблема оптимізації репаративного утворення кістки, тобто створення найбільш сприятливих умов для реалізації власних остеогенних можливостей.

Методи клітинно-регенеративної терапії з використанням стовбурових клітин все більше використовуються у світі з надією на успіх у лікуванні різних ран і травм, на які неможливо ефективно впливати сучасними методами лікування.

Мезенхімальні стовбурові клітини ссавців вважаються найбільш перспективним видом галогенного і аутогенного матеріалу у клітинній регенеративній терапії. Зокрема, велика кількість публікацій, присвячених результатам клінічного використання стовбурових клітин у лікуванні тварин за патології апарату руху, що свідчить про обґрунтованість цього методу та наукове його значення.

Водночас, залишаються мало дослідженими питання вибору найбільш ефективних методичних підходів що до застосування стовбурових клітин за ушкодження кісток. Остаточо не визначено дози та шляхи введення стовбурових клітин в кожному конкретному випадку, протипоказання до їх застосування.

Методичні рекомендації розроблені за результатами фундаментальних та прикладних наукових досліджень з вивчення властивостей стовбурових клітин тварин, а також їх застосування з метою відновлення структури і функції ушкоджених тканин кістки. Рекомендації включають в себе детальний опис техніки проведення послідовних маніпуляцій, що до відбору кісткового мозку та виділення з них мезенхімальних стовбурових клітин, а також їх використання з практичною метою при лікуванні ушкодженої кісткової тканини.

Методичні рекомендації допоможуть у вирішенні питань стосовно показань та способів використання мезенхімальних стовбурових клітин з метою корекції репаративних процесів в ушкоджених кісткових тканинах. Дослідження, представлені в методичних рекомендаціях, будуть корисними

магістрантам, аспірантам, науковцям та фахівцям біологічного і ветеринарного профілю.

## **ОТРИМАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН**

Лікувальну дозу стовбурових клітин отримують із відібраних зразків кісткового мозку і в лабораторних умовах виділяють активні мезенхімальні стовбурові клітини (МСК). Техніка виділення МСК включає в себе два відповідальних етапи: виділення із отриманого аспірату моноклеарних клітин шляхом центрифугування та проведення культивування клітин. Всі ці процеси потребують особливої уваги, оскільки від цього залежить чистота клітинної маси, яку використовують для введення.

**Отримання кісткового мозку.** Мезенхімальні стовбурові клітини отримують із червоного кісткового мозку стегнової кістки, суть методу полягає в наступному: за 15 хв до відбору кісткового мозку тварину піддають седативному веденню препарату «Золетил» внутрішньом'язово з розрахунку 0,05 мг/кг ваги тварини. У ділянці оперативного доступу проводять місцеве знеболення 0,5% розчином новокаїну, шкіру вибривають та обробляють 5% розчином йоду, після чого пронаційними рухами за допомогою медичної голки для спінальної анестезії та діагностичної пункції зі зрізом типу «Pencil-Point» виконують прокол шкіри і м'яких тканин аж до окістя у ділянці дистального епіфізу стегнової кістки. Дійшовши до окістя, голку з приєднаним до неї шприцом із гепарином проштовхують вглиб ще на 0,5–1 см. Кількість гепарину у шприці не повинна перевищувати 2–3 ОД на 1 см<sup>3</sup> отриманого об'єму аспірату. Утримуючи голку в непорушному стані проводили, аспірацію кісткового мозку (рис. 1).

Після завершення аспірації червоного кісткового мозку шприц від'єднують, повертаючи проти часової стрілки голку обережно витягують. До місця проколу шкіри на кілька хвилин прикладають стерильно ватно-марлевий тампон з метою зупинки кровотечі, після чого місце проколу знову обробляють 5% спиртовим розчином йоду.

**Культивування клітин.** Процедури з виділення клітин і маніпуляції із клітинним матеріалом потрібно проводити у стерильному боксі (кабінет біологічної безпеки II класу ESCO) (рис. 2). Отриманий аспірат червоного кісткового мозку у 3 рази розбавляють фосфатно-буферним розчином, нашаровують на попередньо внесений у стерильні пробірки розчин із градієнтом щільності  $\rho=1,076$  (фікол-тріомраст) та центрифугують протягом 25 хв за відцентрової сили 300 g. За допомогою піпетки із пробірки відбирають рідину, розташовану над фіколом у вигляді кільця. Отримані таким чином моноклеарні клітини вносять в чашки Петрі ( $3 \times 10^5$  кл/см<sup>2</sup>) і культивують за  $t37^{\circ}\text{C}$  у повітряному середовищі із 5% вмістом  $\text{CO}_2$  на стандартному культуральному середовищі, до складу якого входить: 80% ДМЕМ; 20% ембріональної сироватки теляти; 10 мкл/мл антибіотик-антимікотику.



Далі проводять культивування клітин. В процесі культивування клітин після формування моношару на 80–90 % (рис. 3). В кінці кожного пасажу з культурального посуду видаляють поживне середовище, а моношар, що залишається, промивають фосфатно-буферним розчином, до клітин додають 0,25 мл 0,02% розчин трипсину/версену і залишають в термостаті за температури 37 °С на 1–2 хв. За процесом округлення та відкріплення клітин спостерігають в мікроскоп. По досягненню необхідного ефекту дію розчину трипсину/версену нейтралізують ембріональною сироваткою теляти, вносячи її в чашку Петрі у співвідношенні 1:30 до загального об'єму розчину.

Після чого знімають клітини та дезагрегують клітинні конгломерати шляхом піпетування. Клітини центрифугують за відцентрової сили 300 g, видаляють надосадову рідину, додають поживне середовище, ретельно піпетують осад та здійснюють підрахунок кількості клітин за стандартною методикою. Пасажування клітин здійснюють у співвідношенні 1:2 (з однієї чашки Петрі пересівали у дві) за посівної дози  $5 \times 10^4$  клітин/см<sup>2</sup>.

Підрахунок кількості клітин проводять під мікроскопом при збільшенні у 200 разів в усіх квадратах та розраховували за формулою:

$$X = A \times 1000 / 0,9$$

де X – число клітин в 1 см<sup>3</sup>;

A – число клітин у всіх квадратах;

1000 – кількість мм<sup>3</sup> в см<sup>3</sup>;

0,9 – об'єм камери Горяєва в мм<sup>3</sup>.

На третьому пасажі знімають клітини та підраховували кількість клітин в отриманому субстраті за вище описаною методикою і готувлять дози для введення. Введення стовбурових клітин проводять на 0,5 мл. фосфатно-буферному розчині.

## **ВВЕДЕННЯ КУЛЬТУРИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН**

Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку у кількості 5 млн. (рис. 4) суспензують у 3 см<sup>3</sup> фосфатно-буферного розчину та вводять безпосередньо в місце ушкодження кістки (рис. 5). Введення клітин у такій же кількості повторюють двічі з інтервалом у 2 тижні.

## **ЗАСТОСУВАННЯ КУЛЬТУРИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ЗА УШКОДЖЕНОЇ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ**

Було проведено рентгенологічні дослідження процесу відновлення дефекту великогомілкової кістки за введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) починаючи з 3 і закінчуючи на 42 добу. При цьому, тваринам контрольної групи вводили фосфатно-буферний розчин місцево, а тваринам дослідної групи вводили алогенні МСК в місце дефекту.

В результаті проведених досліджень встановлено (табл. 1, 2), що на 3 добу експерименту у кролів контрольної групи дефект був округлої форми, інших змін не спостерігалось (рис. 6 А). У кролів дослідної групи, яким вводили алогенні мезенхімальні стовбурові клітини у місце дефекту, спостерігали незначну реакцію з боку прилеглих м'яких тканин, ознаки утворення кісткового мозоля, зменшення діаметра і глибини округлого дефекту кістки (рис. 6 Б).

Табл.1

### **Динаміка зміни діаметру (мм.) округлого дефекту великогомілкової кістки.**

<b>Група кролів</b>	<b>Вихідний стан</b>	<b>3 доба</b>	<b>7 доба</b>	<b>14 доба</b>	<b>21 доба</b>	<b>28 доба</b>	<b>42 доба</b>
Контроль група (плацебо)	2,5	2,5	2,5	2,1	1,7	0,5	–
Дослідна група (МСК в місце дефекту)	2,5	2,4	1,8	1,2	0,8	–	–

Табл. 2

### **Динаміка змін глибини (мм.) округлого дефекту великогомілкової кістки.**

<b>Група кролів</b>	<b>Вихідний стан</b>	<b>3 доба</b>	<b>7 доба</b>	<b>14 доба</b>	<b>21 доба</b>	<b>28 доба</b>	<b>42 доба</b>
---------------------	----------------------	---------------	---------------	----------------	----------------	----------------	----------------

Контроль група (плацебо)	0,5	0,5	0,5	0,4	0,2	0,1	–
Дослідна група (МСК в місце дефекту)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	–	–

На 7 добу експерименту (табл. 1, 2) у кролів контрольної групи спостерігали незначну реакцію з боку прилеглих м'яких тканин діаметр дефекту та його глибина не змінилися, а також початок формування кісткового мозоля (рис. 7 А). Спостерігалася консолідація кісткового дефекту. У кролів дослідної групи спостерігали добре виражену реакцію з боку прилеглих м'яких тканин, виражені ознаки розвитку кісткового мозоля у вигляді осередків окостеніння, а також, діаметр та глибина округлого дефекту зменшилися (рис. 7 Б). Спостерігалася виражена консолідація кісткового дефекту.

На 14 добу експерименту (табл. 1, 2) у кролів контрольної групи спостерігали ще добре виражену реакцію з боку прилеглих м'яких тканин, з'явилися ознаки кісткового мозоля, а діаметр і глибина дефекту зменшилися. Спостерігалася консолідація кісткового дефекту (рис. 8 А). У кролів II дослідної групи спостерігали зниження реакції з боку прилеглих м'яких тканин, добре виражений кістковий мозоль, який вже зменшувався в об'ємі (рис. 8 Б). Також, відмічали зменшення діаметра і глибини дефекту. Спостерігалосся продовження консолідації кісткового дефекту.

На 21 добу експерименту (табл. 1, 2) у кролів контрольної групи відмічалосся незначне зменшення реакції з боку прилеглих м'яких тканин. Також, відмічали добре виражений кістковий мозоль, який зменшувався в об'ємі та зменшення діаметра і глибини дефекту. Відбувалася виражена консолідація кісткового дефекту (рис. 9 А). У кролів дослідної групи спостерігали зменшення діаметра і глибини дефекту. Реакція з боку прилеглих м'яких тканин була незначною, а кістковий мозоль зменшився в об'ємі й ущільнився (рис. 9 Б). Продовжувалася виражена консолідація кісткового дефекту.

На 28 добу експерименту (табл. 1, 2) спостерігали зменшення діаметра і глибини дефекту, незначну реакцію з боку прилеглих м'яких тканин, а також зменшення та ущільнення кісткового мозоля у кролів контрольної групи. Консолідація кісткового дефекту продовжувалася (рис. 10 А). У кролів дослідної групи спостерігали відсутність реакції з боку прилеглих м'яких тканин, круглий дефект вже практично не візуалізується, а також, кістковий мозоль зменшився в об'ємі й ущільнився до кісткової тканини. Відбулася повна консолідація кісткового дефекту (рис. 10 Б).

Отже, за показниками рентгенологічного дослідження у тварин дослідної групи на 28 добу експерименту зафіксовано практично завершення процесів репаративної регенерації кісткової тканини в зоні експериментального її ушкодження (табл. 1, 2).

На 42 добу експерименту у кролів дослідної групи видимих ознак місця дефекту не спостерігалось. Округлий дефект вже не візуалізується (рис. 11 Б). У тварин контрольної групи зміни в зоні нанесення дефекту були аналогічними, як у тварин дослідної груп на 28 добу експерименту (табл. 1, 2), а саме спостерігали відсутність реакції з боку прилеглих м'яких тканин. Округлий дефект вже практично не візуалізується, а кістковий мозоль зменшився в об'ємі й ущільнився до кісткової тканини (рис. 11 А). Відбулася консолідація кісткового дефекту.

Отже, при рентгенологічних дослідженнях встановлено, що після введення аlogenних мезенхімальних стовбурових процеси регенерації прискорюються починаючи вже з 3 доби експерименту і завершуються практично на 28 добу, за рахунок прискорення фаз репаративного остеогенезу. За цих умов швидше розвивається і зникає реакція з боку прилеглих м'яких тканин. Швидше утворюється кістковий мозоль, який швидше ущільнюється до кістки, а також прискорюються процеси консолідації кісткового дефекту.

Таким чином, застосування трансплантованих аутогенних мезенхімальних стовбурових клітин, сприяє ефективному відновленню тканинних структур ураженої кістки та відновлення клінічного і функціонального стану її.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрейчин В.А., Білінський П.І. Системний аналіз оперативного методу лікування діафізарних переломів і фактори впливу на репаративну регенерацію Травма. 2014. № 6. С. 59–64.
2. Дєдх Н. В., Малишкіна С. В. Регенерація кістки: досягнення та перспективи Травма. 2006. Т. 7, № 2. С.212–216.
3. Лисков А. В., Фролов Б. А., Павловичев С. А. Новий підхід до стимуляції фізіологічної та репаративного остеогенезу. Геній ортопедії. 2010. № 3. С. 34-39.
4. Мазуркевич А. Й. Клітинні технології у ветеринарній медицині: навчальний посібник / [А. Й. Мазуркевич, В. Б. Данілов, В. В. Ковпак, М. О. Малюк, Харкевич Ю. О]. – Київ : Компрінт, 2014. – 131 с.
5. Петренко О.Ф. Особливості переломів кісток у домашніх тварин. Ветеринарна медицина України. 2002. № 5. С. 16–17.
6. Петренко А. Ю., Іванов Е. Н., Хунов Ю. А. Стовбурові клітини. Властивості та перспективи клінічного застосування Луганськ Прес-експрес, 2011. С. 365.
7. Савчук Т. Л. Рентгенологічні зміни у кістці за її експериментального ушкодження на фоні введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у кровоносне русло. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин НААН (сільськогосподарські та ветеринарні науки). 2018. Вип. 19. № 1. С. 75–81.
8. Савчук Т. Л., Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Ткаченко В. В., Гулякова О. Г. Рентгенологічні зміни у кістці за експериментального ушкодження та після ведення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин. Науковий вісник ветеринарної медицини. 2017. № 2 (136). С. 106–113.
9. Семизоров А.Н. Рентгенография в диагностике и лечении переломов костей. М. - 2007; 21—27.
10. Alegre D.N. Possible benefits of strontium ranelate in complicated long bone fractures / D.N. Alegre, C. Ribeiro, C. Sousa [et al.] / Rheumatol. Int. – 2012. – Vol. 32. – P. 439–443.
11. Clines G.A. Prospects for osteoprogenitor stem cells in fracture repair and osteoporosis. Curr. Opin. Organ. Transplant. 2010. Vol. 15, № 1. P. 73–78.
12. Dimarino A.M. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair / A.M. Dimarino, A.I. Caplan, T.L. Bonfield [et al.] // Front Immunol. – 2013. – Vol. 4. – P. 201.
13. Clegg P. D. Evidence-based medicine and stem cell therapy: how do we know such technologies are safe and efficacious P. D. Clegg Vet. Clin. North Am Equine Pract. 2011. Vol. 27, № 2. P. 373–382.
14. Grassi L. Extracting accurate strain measurements in bone mechanics: A critical review of current methods L. Grassi, H. Isaksson //

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. – 2015. – Vol. 50. – P. 43–54

15. Hamed E. Multiscale damage and strength of lamellar bone modeled by cohesive finite elements / E. Hamed, I. Jasiuk // Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. – 2013. – Vol. 28. – P. 94–110.

16. Kittaka M. Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration / M. Kittaka, M. Kajiya, H. Shiba, M. Takewaki [et al.] // Cytotherapy. – 2015. – Vol. 17, Issue 7. – P. 860–873.

17. Kurniawan D. Finite element analysis of bone–implant biomechanics: refinement through featuring various osseointegration conditions / D. Kurniawan, F. M. Nor, H. Y. Lee, J. Y. Lim // International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. – 2012. – Vol. 41, Issue 9. – P. 1090–1096.

18. Nicks K.M. Relationship of age to bone microstructure independent of areal bone mineral density / K.M. Nicks, S. Amin, E.J. Atkinson [et. al.] // J. Bone Miner. Res. – 2012. – Vol. 27, № 3. – P. 637–644.

19. Savchuk, T.L., Mazurkevych, A.Y., Maliuk M.O., Kharkevych Yu.O. (2018). Biokhimichni zminy u syrovatski krovi kroliv za eksperymentalnoho mekhanichnoho poszkodzhennia kistkovoï tkanyny pislia zastosuvannia alohennykh mezenkhimalnykh stovburovykh klityn. Naukovyi visnyk Natsionalnoho universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannia Ukrainy. Serii: Veterynarna medytsyna, yakist i bezpeka produktsii tvarynnytstva. 2018. № 285. S. 240–251

20. Savchuk, T.L., Bokotko, R.R., Kharkevyc,h Yu.O., Mazurkevych, A.Y., Maliuk, M.O., Danilov, V.B., Blahyi, R.S., Braha, O.V. (2020). Makroskopichni zminy v eksperymentalno ushkodzhenni velykohomilkovii kisttsi kroliv za vvedennia alohennykh mezenkhimalnykh stovburovykh klityn riznymi sposobamy. NTB Derzhavnoho naukovo-doslidnoho kontrolnoho instytutu vetpreparativ ta kormovykh dobavok i Instytutu biolohii tvaryn 21. 1. 168-174.

21. Shupyk, O.V., Bokotko, R.R., Savchuk, T.L., Danilov, V.B., Kladnytska, L.V., Kharkevych, Ya.O., Pasnichenko, O.S., Blahyi, R.S., Hraborenko, N.I., Krystyniak, Y.M (2020). Effectiveness of mesenchymal stem cells in uveitis in dogs, depending on the method of their administration. NTB Derzhavnoho naukovo-doslidnoho kontrolnoho instytutu vetpreparativ ta kormovykh dobavok i Instytutu biolohii tvaryn 21. 2. 219-229.

22. Shupyk, O.V., Masurkevych, A.Y., Bokotko, R.R., Savchuk, T.L., Pasnichenko, O.S., Krystyniak, Y.M. (2020). The effectiveness of amniotic membrane depending on the cause of corneal damage in dogs. Ukrainian journal of veterinary sciences. 11. 4. 48-60.

23. Thormann U. Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats / U. Thormann, T. El. Khawassna, S. Ray [et al.] // Injury, Int. J. Care Injured. – 2014. – № 45. – P. 487–493.

24. Yifang F. Optimal Principle of Bone Structure / Yifang Fan, Yubo Fan, Zhiyu Li [et. al.] // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6, № 12. – P. 828-868.

25.

## ДОДАТКИ

### Розчини, реактиви та обладнання для виконання робіт

1. DMEM
2. FBS
3. PBS
4. фікол
5. тріомбраст
6. желатин
7. 0,25%-ий розчин трипсину
8. антибіотик-антимікотик
9. ксилазин
10. кетамін
11. гепарин
12. трипсин – 0,5 % /EDTA - 0,2 %
13. ДМСО
14. 5 %-ий розчин трипанового синього
15. покривні скельця
16. 70 %-ий розчин спирту етилового
17. 5%-ий розчин йоду

### Лабораторне обладнання:

- бокс ламінарний;
- кріоконтейнери;
- низькотемпературний холодильник, що забезпечує температуру від мінус 65 °С до мінус 85 °С ;
- центрифуга з відцентровою силою від 200 g до 1500 g;
- кріобіологічна посудина (біосховище);
- мікроскоп світловий інвертований;
- мікроскоп світловий;
- культуральні чашки для культивування культури клітин діаметром 35; 60; 100; 150 мм і площею росту 8; 21; 55; 148 см<sup>2</sup> відповідно;
- 6 та 12 лункові культуральні планшети для культивування культури клітин ;
- пластикові центрифужні пробірки об'ємом 15; 50 см<sup>3</sup>;
- пластикові або скляні кріопробірки ємністю 1,0; 1,2; 1,8; 2,0; 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 10,0 см<sup>3</sup>;
- камера Горяєва;
- пальники газові або спиртові;
- термостат, що забезпечує температуру від 15 °С до 50 °С;
- водяна баня, що забезпечує температуру від 20 °С до 60 °С;
- сухожарна шафа, що забезпечує температуру від 120 °С до 180 °С;
- мірні пластикові одноразові піпетки ємністю 1, 2, 5 і 10 см<sup>3</sup>;
- пробірки скляні ємністю 10, 15, 20 см<sup>3</sup>;
- шприци медичні ін'єкційні;
- хірургічні свердла діаметром 2 - 3 мм;
- дрель;
- внутрішньосудинний катетер;
- флакони пеніцилінові;
- CO<sub>2</sub> – інкубатор;
- автоматичні дозатори (10-1000 мкл);
- холодильник, що забезпечує температуру від 2 °С до -18 °С
- нітроцелюлозні фільтри (d-0,22 мкм);
- магнітна мішалка;
- аерометр;
- раневий розширювач;
- скальпель.