

АЛГОРИТМ ОТРИМАННЯ АУТОЛОГІЧНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ КЛІТИН У ЕКСПЕРИМЕНТІ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України»

(м. Харків)

*ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМН України»

(м. Київ)

Представлена робота являє собою фрагмент науково-дослідницької тематики «Розробка технології отримання аутоклітин різних типів біологічних тканин із стромальних клітин кісткового мозку і застосування їх для лікування захворювань різного ґенезу за допомогою аутотрансплантації», № держ. реєстрації 0106U003995 (2013-2015р. р.).

Вступ. Дослідження властивостей аутологічних стовбурових мезенхімальних клітин (АСМК) вважають одним із найбільш пріоритетних напрямків сучасної медицини та біотехнології [4, 11, 16]. Останній факт обумовлений їхньою здатністю до відтворення у постмитотичних поколіннях та можливістю започаткування диференційованих клітинних елементів тканини. На думку фахівців, саме стовбурові клітини відіграють роль органів термінової макрорепарації при масованих тканинних ураженнях; апарату об'новлення старих клітин, захисту від передчасного старіння [4]. Все вище зазначене обумовлює обережне та скрупульозне відношення дослідників до застосування АСМК, ретельне опрацювання норм і стандартів стосовно їх клінічного впровадження, подальшої розробки нових та вдосконалення існуючих алгоритмів отримання клітинного матеріалу [3, 6]. Важливими залишаються питання пошуку зручних та адекватних меті дослідження джерел виділення АСМК, етапів культивування із строми кісткового мозку чи інших похідних, надання об'єктивної морфологічної характеристики отриманому матеріалу. Провідну роль відіграють цілеспрямоване встановлення життєздатності клітинних суспензій, індукція диференціювання клітин строми кісткового мозку у клітини нервової тканини [5, 16]. Безперечними за значенням залишаються в згаданій системі імуноцитохімічне підтвердження диференціювання АСМК у нейрональному напрямку *in vitro/in vivo* (завдяки чому з'являється можливість остаточного з'ясування ефективності заподіяного впливу), фенотипування. Поєднання всього переліку складових, що сприяють якісному та прискореному отриманню популяції клітин, здатних до ефективної трансплантації, можливе лише за умов впровадження комплексної системи/

алгоритму експериментальних заходів. У зв'язку із чим необхідність спроб щодо розробки останніх не викликає сумнівів.

Метою дослідження було створити уніфікований алгоритм застосування АСМК для усунення ознак ішемічного інсульту в експерименті.

Об'єкт і методи дослідження. Матеріалом дослідження стали АСМК ($3,5-5 \times 10^5$), що досліджували *in vitro* та *in vivo* (на самцях щурів лінії Вістар 3-х місячного віку, $n = 48$). Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

З метою створення експериментального алгоритму *in vitro* відпрацьовували методи виділення, культивування, встановлення життєздатності, індукції диференціювання, імуноцитохімічного підтвердження останнього, фенотипування, забарвлення прижиттєвим барвником РКН 26. Проводили детальну морфологічну характеристику. Експериментальних тварин утримували у стандартних умовах клімат-контролю віварію Харківської академії післядипломної освіти (ХМАПО) МОЗ України. Експериментальній групі щурів ($n = 36$) оперативним шляхом на функціонуючому кровообізі моделювали ішемічний емболічний інсульт. За цим з дослідницькою метою особинам трьома відпрацьованими способами (внутрішньовенним, інтракраніальним та субокципітальним) вводили АСМК, спостерігали за ними протягом 28-ми діб. Результати узагальнювали та співставляли з інтактним контролем ($n = 12$).

Основні етапи алгоритму

Етап перший: виділення, культивування аутологічних стовбурових мезенхімальних клітин із строми кісткового мозку самців щурів лінії Вістар

Суспензію кісткового мозку отримували із стегнової та великої гомілкової кісток самців щурів лінії Вістар 3-х місячного віку в стерильних умовах

ветеринарної операційної. Для цього експериментальних тварин наркотизували кетаміном: із розрахунку 125 мг на кг ваги тварини, іммобілізували. Депільовану поверхню стегна, гомілки щура троєкратно обробляли розчином хлоргексидину біглюконату спиртового (0,5%), виконували повздожній пошаровий розтин м'яких тканин. Шкіру, фасції, м'язи ретельно відсепарували. Бормашиною випилювали отвір, діаметром до 0,3 см, через який аспіраційним шприцем (об'єм: 1мл) діставали кістковий мозок. Субстрат кісткового мозку промивали середовищем для культивування, що містило розчин Хенкса, 20%. Клітини центрифугували при 300 g протягом 10 хвилин. Осад ресуспендували у культуральному середовищі DMEM/F12(1/1) (Sigma) з 10% фетальною бичачою сироваткою (ФБС), Sigma, 2 mM L-глутаміна (Sigma), 50 µg/ml гентаміцину. Після осадження суспензії кісткового мозку осад розсівали на культуральні флакони (Greiner Bio-One GmbH, Germany) і витримали в CO₂-інкубаторі, model BNR- 110, Tabai ESPEC (Osaka, Японія) при температурі 37°C і 5% CO₂ з метою подальшого культивування [18]. Заміну поживного середовища проводили кожні 3 доби. Клітини культивували при температурі 37°C і 5% CO₂ в CO₂-інкубаторі, model BNR- 110, Tabai ESPEC (Osaka, Японія). Через 24 години культивування, після експлантації середовище з клітинами, які не прикріпилися до субстрату, видаляли. Культуральний флакон три рази промивали розчином Хенкса, 20%. Фібробластоподібні клітини, які залишилися прикріпленими, культивували в CO₂-інкубаторі, model BNR- 110, Tabai ESPEC (Osaka, Японія) при температурі 37°C і 5% CO₂ і 100% вологості 7-12 діб із заміною поживного середовища кожні три доби. За цим клітини знімали із дна флакону шляхом короткочасної (5-10 хвилин) інкубації у розчині трипсину, ресуспендували у культуральному середовищі та осаджували центрифугуванням при 300g протягом 10 хвилин. Надалі клітини розсівали на культуральні флакони (Greiner Bio-One GmbH, Germany) у концентрації 2-5 x 10⁴ клітин/ см². Культивували п'ять-сім діб до досягнення 80% конфлюентності. На дні флакону стромальні клітини формували колонії фібробластоподібних клітин. Отриману первісну культуру клітин строми кісткового мозку піддавали індукції і трансплантували [3].

Етап другий: морфологічна характеристика клітин строми кісткового мозку

Ріст, розподіл та диференціювання клітин строми кісткового мозку оцінювали візуально у живій культурі за допомогою інвертованого мікроскопу Inverso-TC100 (Medline Scientific Limited, UK). Для цитологічного аналізу із клітин строми кісткового мозку готували мазки. Останні фіксували у парах 4% формаліну на фосфатному буфері (pH=7,0-7,2) в скло-керамічному ексикаторі із щільно притертою кришкою (Sarstedt, Німеччина). За цим використовували інкубаційне середовище, що містило ДАБ, 0,02% перекису водню та 0,2 М трис-НCl (соляної кислоти), pH=7,6. Препарати клітин строми кісткового мозку, забарвлені 1% метиловим фіолетовим

за Романовським аналізували (x1350) у світлооптичному мікроскопі Lieca (Німеччина) [8,9].

Етап третій: встановлення життєздатності клітинної суспензії

Із кожного флакону з культурою клітин відбирали дві паралельні проби. За цим ресуспендували клітини у фосфатному буфері (pH=7,2) 104 кл/см² і та забарвлювали їх розчином метиленового синього (0,2%) протягом десяти хвилин. Серед 100 клітин у світлооптичному мікроскопі визначали долю мертвих з відносними похибками, не більше 8-12% (спеціально для забарвлення метиленовим синім). Далі проводили підрахунок живих, некротичних, апоптотичних клітин з відносними похибками не більше, ніж 10-17% відповідно. Живими вважались клітини, що мали відмінну від круглої форму та залишались незабарвленими. До некротичних відносили такі клітини, що характеризувалися великими розмірами, круглою формою та виразним забарвленням. Апоптотичними вважали клітини, які мали круглу або нитивну форму, з ознаками фрагментації ядра та інтенсивним забарвленням [17].

Етап четвертий: індукція диференціювання клітин строми кісткового мозку у клітини нервової тканини

Для індукції нейронального диференціювання застосовували АСМК другого та третього пасажів, які знімали з культурального флакону після короткочасної інкубації у розчині трипсину. Останні розсівали у концентрації 5 тис кл/см² на культуральні флакони (Greiner Bio-One GmbH, Germany). Відмиті від трипсину клітини розташовували у індукційному середовищі, що містило повне середовище культивування, 2% ФБС та індуктор диференціювання-10⁶ M- ретиноева кислота [10]. Диференціювання тривало протягом чотирнадцяти діб зі зміною середовища на свіже кожні три доби.

Етап п'ятий: імуноцитохімічне підтвердження диференціювання аутологічних стовбурових мезенхімальних клітин у нейрональному напрямку *in vitro*

З метою аналізу індукції диференціювання АСМК переносили у 6-лункові планшети (Greiner Bio-One GmbH, Germany), куди наступного дня додавали індуктори. Через три доби індукційне середовище заміняли свіжим з відповідними складовими індукторами та піддавали культивуванню 14 діб. Після цього проводили фіксацію середовища у 4% розчині формаліну на фосфатному буфері (pH=7,0-7,2) дві хвилини при кімнатній температурі з наступною триразовою відмивкою фосфатно-сольовим буфером (ФСБ). Після відмивки клітини обробляли 1% розчином БСА з 10% козянчою сироваткою впродовж 30 хвилин. За цим протягом ночі при температурі 4°C проводили інкубацію при кімнатній температурі у розчині мишачих моноклональних антитіл до β-тубуліну III (beta III isoform, C-terminus, clone TU-20, Chemikon International, Inc), мишачих моноклональних антитіл до Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), (clone GA5, Chemikon International, Inc) та мишачих моноклональних антитіл до нейронспецифічного нейрофіламенту 200 kDa+160 kDa (200 kDa+160 kDa

Neurofilament). Роль негативного контролю відігравав 1 % розчин БСА з 10 % козинячою сироваткою. За цим проводили інкубування клітин, кон'югованими з флуорохромами антитілами протягом години. Після кожного із них клітини ретельно триразово промивали ФСБ. Флуоресцентне забарвлення клітин свідчило про наявність у них вищезгаданих нейроспецифічних білків. Для індукції нейронального диференціювання використовувались АСМК другого і третього пасажів, які знімали з культурального флакона після короткочасної інкубації в розчині трипсину [13,15]. Клітини розсівали у концентрації 5 тис кл/см² на культуральні флакони (Greiner Bio-One GmbH, Germany). Наступного дня клітини вносили до інкубаційного середовища, яке складалося з повного середовища культивування, 2% ФСБ та індуктора диференціювання-10⁶ М- ретиноевої кислоти. Диференціювання тривало протягом 14 діб зі зміною середовища на свіже кожні три доби. Через чотирнадцять діб клітини фіксували у 4% формаліні на фосфатному буфері (pH=7,0-7,2) 2 хвилини при кімнатній температурі з наступним триразовим відмиванням ФСБ. Після відмивання клітини обробляли 1% розчином БСА протягом 30 хвилин. За цим проводили інкубування при температурі 4eC протягом 12 годин в розчині мишачих моноклональних антитіл до β-тубуліну III (beta III isoform, C-terminus, clone TU-20, Chemikon International, Inc), мишачих моноклональних антитіл до Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), (clone GA5, Chemikon International, Inc) та мишачих моноклональних антитіл до 200 kDa+160 kDa Neurofilament (Clone RMdO-20, Abcam plc). Роль негативного контролю відігравав 1% розчин БСА. Потім клітини інкубували протягом години з вторинними козинячими, антимишачими антитілами, кон'югованими з флуорохромами. Після кожної інкубації з антитілами клітини тричі промивали ФСБ. Флуоресцентне забарвлення клітин свідчило про наявність у них вищезгаданих нейроспецифічних білків. Клітинні культури та забарвлені препарати вивчали у інвертованому мікроскопі Inverso-TC100 (Medline Scientific Limited, UK). Для реєстрації кадрів застосовували програму ASUS Live 3000 [6].

Етап шостий: фенотипування аутологічних стовбурових мезенхімальних клітин самців щурів лінії Вістар

Імунофенотипування досліджуваних культур клітин для підтвердження належності до АСМК проводили за стандартною методикою. Після відбору середовища культивування клітини промивали ФСБ, обережно знімали сумішшю розчинів трипсину і

ЕДТА та інгібували надлишком повного культурального середовища з 10% ФСБ. Отриману суспензію центрифугували (5 хвилин при 300g). Супернатант зливали, ресуспендували в 1 мл ФСБ, що містив 1% ФСБ. Після цього проводили підрахунок клітин і готували проби з концентрацією останніх 1x10⁵. Клітини перемішували та інкубували з антигенспецифічними моноклональними антитілами (міченими флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC), алофікоціанін (APC)) до антигенів CD19, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 (Beckton Dickinson, США) протягом 20 хвилин при температурі 4eC [7,12]. Після цього об'єм проби доводили до 500 мкл ФСБ і проводили фенотипування у проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (BD Biosciences, США) згідно інструкції фірми –виробника. Імунофенотипування виконували в декількох повторях. Для кожного антигену аналізували не менше 10000 клітин.

Етап сьомий: забарвлення аутологічних стовбурових мезенхімальних клітин барвником РКН 26

Прижиттєвий барвник РКН 26 застосовували з метою вивчення довготривалого трекингу АСМК самців щурів лінії Вістар (другий-третій пересів культури) [1,7,15]. Їх вирощували до щільного моношару (90% конфлюентності), потім знімали з чашок Петрі розчином трипсина та забарвлювали у відповідності до протоколу компанії-виробника РКН 26 (Sigma, США). Забарвлені АСМК центрифугували при 300g протягом 10 хвилин. Отриманий осад два рази промивали ФСБ та суспендували. Ефективність забарвлення АСМК оцінювали у флуоресцентному мікроскопі Inverso-TC100 (Medline Scientific Limited, UK).

Висновок. Сучасний експериментальний алгоритм з отримання АСМК повинен являти собою багатокомпонентну структуру, що реалізується в декілька послідовних етапів/процедур. Застосування системної логістики методичних прийомів виділення, культивування, індукції диференціювання клітин строми кісткового мозку з подальшими імуноцитохімічним підтвердженням нейродиференціювання останніх, фенотипуванням та специфічним забарвленням (РКН 26) забезпечує безприцидентний захист об'єктів дослідження та сприяє суттєвому підвищенню якості застосованих у експерименті чи клініці способів клітинної трансплантації.

Перспективи подальших досліджень полягають у застосуванні алгоритму отримання АСМК у якості уніфікованого стандарту для удосконалення клініко-експериментальних випробувань з клітинної трансплантації.

Література

1. Паляница С. С. Теоретичні основи використання трансплантації нейтральних стовбурових клітин при ішемічних ураженнях головного мозку / С. С. Паляница, О. Л. Кухарчук // Трансплантологія. – 2007. – № 1. – С. 203-208.
2. Сравнительная эффективность внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крысам, у которых моделировали паркинсоноподобный синдром / В. А. Пятикоп, М. А. Мсаллам, Е. А. Щегельская [и др.] // Український нейрохірургічний журнал. – 2014. – № 2. – С. 55-61.
3. Стволовые клетки: проблемы контроля, безопасности, разработки и применения / Н. Бунятян, А. Яворский, В. Рязанов [и др.] // Врач. – 2009. – № 6. – С. 2-5.
4. Шаймарданова Л. Р. Стволовая система / Л. Р. Шаймарданова, В. С. Пикалюк // Морфология. – 2008. – Т. 11, № 1. – С. 16-21.

5. Abody K. Translating stem cell studies to the clinic for CNS repair: current state of the art and the need for a Rosetta Stone / K. Abody, A. Capela // *Neuron*. – 2011. – Vol. 70 (4). – P. 597-613.
6. Hunter: Statistics for Experimenters [електронний ресурс] / George E. P. Box, J. Stuart Hunter, G. William // *Design, Innovation, and Discovery*. – 2nd Edition. – 2005. – Режим доступу: <http://www.amazon.com/Statistics-Experimenters-Innovation-Discovery-Edition/dp/04/0471718130>.
7. Clinical studies in stem cells transplantation for stroke: a review / A. Bersano, E. Ballabio, S. Lanfranco [et al.] // *Current Vascular Pharmacology*. – 2010. – Vol. 8. – P. 29-34.
8. Distribution of vascular endothelial growth factor receptor-3/Flt4 mRNA in adult rat central nervous system / Y. Hou, Y. -J. Shin, E. Jiwon Han [et al.] // *J. Chemical Neuroanatomy*. – 2011. – Vol. 42. – P. 56-64.
9. Gudas L. J. Retinoids induce stem cell differentiation via epigenetic changes / L. J. Gudas // *Semin Cell Development Biology*. – 2013. – № 4. – P. 278-283.
10. Gudas L. J. Retinoids regulate stem cell differentiation / L. J. Gudas, J. A. Wagner // *J. Cell Physiol*. – 2011. – № 2. – P. 322-330.
11. Jablonska A. Stroke induced brain changes: implications for stem cell transplantation / A. Jablonska, B. Lukomska // *Acta Neurobiol. Exp*. – 2011. – Vol. 71. – P. 74-85.
12. Kaca-Oryńska M. Neuron-specific enolase and S 100B protein as predictors of outcome in ischaemic stroke / M. Kaca-Oryńska, R. Tomasiuk, A. Friedman // *Neurol. Neurochir. Pol*. – 2010. – Vol. 44, № 5. – P. 459-463.
13. Neurobiochemical markers of brain damage in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients / R. Brouns, B. De Vil, P. Cras [et al.] // *Clin. Chem*. – 2010. – Vol. 56, № 3. – P. 451-458.
14. Sahota P. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery / P. Sahota, S. I. Savitz // *Neurotherapeutics*. – 2011. – Vol. 8. – P. 434-51.
15. Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in humans compared with S-100B and neuron-specific enolase / M. Honda, R. Tsuruta, T. Kaneko [et al.] // *J. Trauma*. – 2010. – Vol. 69, № 1. – P. 104-109.
16. Sinden J. D. Stem cell in stroke treatment: the promise and challenges / J. D. Sinden, K. W. Muir // *International Journal of Stroke*. – 2012. – Vol. 7. – P. 426-434.
17. Smith H. K. The potential of stem cell therapy for stroke: is PISCES the sign? / H. K. Smith, F. N. Gavins // *FASEB J*. – 2012. – Vol. 26. – P. 2239-2252.
18. Yu Luo Cell-based therapy for stroke / Yu Luo // *J. Neural. Transm*. – 2011. – Vol. 118. – P. 61-74.

УДК 611-018. 82:612-616. 1-005. 4-085

АЛГОРИТМ ОТРИМАННЯ АУТОЛОГІЧНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ КЛІТИН У ЕКСПЕРИМЕНТІ

Торяник І. І., Колесник В. В.

Резюме. У представленій статті надається інформація щодо створення уніфікованого робочого алгоритму отримання та контролю аутологічних стовбурових мезенхімальних клітин (АСМК) в експерименті. Останній проводили на самцях щурів лінії Вістар 3-х місячного віку, що утримувались у стандартних умовах клімат-контролю виварію Харківської академії післядипломної освіти (ХМАПО) МОЗ України. Тваринам із власноруч змодельованим ішемічним емболічним інсультом дозовано у певні терміни (1-ша, 3-тя, 7-ма, 14-та доби) трьома відпрацьованими способами (внутрішньовенний, інтракраніальний, субокципітальний) вводили суспензію АСМК. Спостереження за щурами відбувались протягом 28 діб. Особин виводили із експерименту шляхом передозування амфетамінового наркозу. Власне алгоритм складався із семи послідовних етапів (виділення, культивування АСМК, детальної морфологічної характеристики, встановлення життєздатності, індукції диференціювання, імуноцитохімічного підтвердження останнього, фенотипування, забарвлення прижиттєвим барвником РКН 26).

Ключові слова: алгоритм, аутологічні стовбурові мезенхімальні клітини (АСМК), самці щурів лінії Вістар, культивування, диференціювання, фенотипування, барвник РКН 26.

УДК 611-018. 82:612-616. 1-005. 4-085

АЛГОРИТМ ПОЛУЧЕННЯ АУТОЛОГИЧЕСКИХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Торяник И. И., Колесник В. В.

Резюме. В представленной статье содержится информация относительно создания унифицированного рабочего алгоритма, касающегося получения и контроля аутологических стволовых мезенхимальных клеток (АСМК) в эксперименте. Последний проводили на самцах крыс линии Вистар 3-х месячного возраста, которые содержались в стандартных условиях климат-контроля вивария Харьковской академии последипломного образования (ХМАПО) МЗ Украины. Животным с моделированным ишемическим инсультом дозировано в определенное время (1-е, 3-е, 7-е, 14-е сутки) тремя отработанными способами (внутривенный, интракраниальный, субокципитальный) вводили суспензию АСМК. Наблюдение за крысами осуществлялось в продолжение 28 суток. Особей выводили из эксперимента путем передозирования амфетаминowego наркоза. Собственно алгоритм состоял из семи последовательных этапов (выделения, культивирования АСМК, детальной морфологической характеристики, установления жизнеспособности, индукции дифференцирования, иммуноцитохимического подтверждения последнего, фенотипирования, окраски прижизненным красителем РКН 26).

Ключові слова: алгоритм, аутологические стволовые мезенхимальные клетки (АСМК), самцы крыс линии Вистар, культивирование, дифференцировка, фенотипирование, краситель РКН 26.

UDC 611-018. 82:612-616. 1-005. 4-085

Algorithm of Autologous Mesenchymal Stem Cell Receiving in the Experiment

Torianik I. I., Kolesnik V. V.

Abstract. The research of autologous mesenchymal stem cell (AMSC) properties is considered to be one of the top-priorities in modern medicine and biotechnology. It is linked with their ability to be reproduced in postmitotic generations and the possibility to induce differential cell elements of the tissue. According to expert opinion these are stem cells that play role of urgent macroreparation organs in cases of large scale tissue damage; unit of old cell regeneration, defence against premature ageing. All mentioned before stipulates careful and scrupulous attitude of researchers to the usage of AMSC, detailed research of limits and standards of their clinical implementations, further development of new algorithms and improvements of algorithms that already exist to get cell material.

The purpose of this research is to create a unified algorithm of AMSC usage to eliminate symptoms of ischemic stroke in the experiment.

In the article the information about the creation of unified operative algorithm of autologous mesenchymal stem cell (AMSC) receiving and control in the experiment is given. The experiment was carried out on three month old male Han Wistar Rats which was kept in standard conditions of vivarium climate control of Kharkiv Academy of Postgraduate Education of Public Health Ministry in Ukraine. At a given time (1-st, 3-rd, 7-th, 14-th days) the AMSC suspension was injected in doses to the animals with simulated ischemic stroke by three tried and tested methods (endovenous, intracranial, suboccipital). The attendance over rats was pursued for 28 days. Animal units were taken from the experiment by means of amphetamine anesthesia overdosing. The algorithm itself consisted of seven successive stages (detachment, culture of AMSC, detailed morphological characteristics, determination of viability, induction of peaking, immunocytochemical confirmation, phenotyping, PKH 26 vital stain dying).

Consequently modern experimental algorithm to get AMSC must be represented by a multicomponent structure that is accomplished in several subsequent stages/procedures. The usage of systemic transportation guidelines of effuse, cultivation, induction of brain stroma differentiation with further immunochemical confirmation of their neurodifferentiation, phenotype and specific coloration (PKH 26) provides reliable defense of study subjects and contributes to considerable quality improvement of the methods of cell transplantation used in an experiment or a clinic.

Keywords: algorithm, autologous mesenchymal stem cell (AMSC), male Han Wistar Rats, culture, peaking, phenotyping, PKH 26 vital stain dying.

Рецензент – проф. Бондаренко В. А.

Стаття надійшла 12. 12. 2014 р.