

Оригінальна стаття = Original article = Оригинальная статьяDOI: <https://doi.org/10.25305/unj.112102>**Вживання трансплантованих мезенхімальних стовбурових клітин вартонових драглів пуповини людини в центральній нервовій системі щурів при експериментальному алергічному енцефаломієліті після їх субоципітального введення**Пічкур Л.Д.¹, Ковальчук М.В.^{2,3}, Дерябіна О.Г.³, Вербовська С.А.¹, Акінола С.Т.¹, Шувалова Н.С.³, Кордюм В.А.^{2,3}¹ Відділ відновлювальної та функціональної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна² Відділ регуляторних механізмів клітини, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна³ Відділ генних технологій, Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, Київ, УкраїнаНадійшла до редакції 11.06.17.
Прийнята до публікації 01.08.17.**Адреса для листування:**Пічкур Леонід Дмитрович,
Відділення відновлювальної нейрохірургії, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова, вул. Платона Майбороди, 32, Київ, Україна, 04050, e-mail: L.Pichkur@neuro.kiev.ua

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) вартонових драглів пуповини людини (ВДл) мають значну перевагу порівняно з клітинами з інших джерел, оскільки їх терапевтичний потенціал при захворюваннях центральної нервової системи (ЦНС) вищий за такий МСК, отриманих з інших джерел. У зв'язку з цим, їх застосування може бути альтернативою при лікуванні демієлінізуючого ураження ЦНС, в тому числі розсіяного склерозу (РС).

Мета. Проаналізувати строки виживання МСК ВДл у різних відділах ЦНС щурів при експериментальному алергічному енцефаломієліті (ЕАЕ) після їх субоципітального введення в лікворні шляхи.

Матеріали і методи. Моделювання ЕАЕ. Виділення та культивування МСК ВДл in vitro. Імунне фенотипування з використанням проточної цитометрії. Субоципітальне введення МСК у спинномозкову рідину (СМР) щурів при ЕАЕ. Вживання трансплантованих МСК ВДл у ЦНС щурів досліджували за даними ланцюгової реакції з полімеразою (ЛРП) в зразках тканин на 2, 3, 4-ту і 5-ту добу з використанням праймерів, що ампліфікують специфічні послідовності ДНК альфа-сателітної ділянки 17-ї хромосоми людини.

Результати. За даними ЛРП альфа-сателітні послідовності ДНК людини виявили у зразках тканини ЦНС експериментальних тварин до 5-ї доби після субоципітального введення МСК ВДл на піку захворювання. ДНК людини виявляли у СМР і різних сегментах спинного мозку.

Висновки. Субоципітально введені МСК ВДл виживають і мігрують по СМР з великої потиличної цистерни у різні відділи ЦНС. МСК ВДл можна також розглядати як клітини-вектори для доставки терапевтичних молекул при лікуванні запальних захворювань ЦНС.

Ключові слова: експериментальний алергічний енцефаломієліт; мезенхімальні стовбурові клітини пуповини людини; демієлінізуюче ураження; ланцюгова реакція з полімеразою.

Український нейрохірургічний журнал. 2017;(3):30-5.

The survival of transplanted mesenchymal stem cells from humans Wharton's jelly of the umbilical cord in the central nervous system of rats with experimental allergic encephalomyelitis after their suboccipital injectionLeonid D. Pichkur¹, Mariia V. Kovalchuk^{2,3}, Olena G. Deriabina³, Svitlana A. Verbovska¹, Samuel T. Akinola¹, Nadiia S. Shuvalova³, Vitalii A. Kordium^{2,3}¹ Department of Regenerative and Functional Neurosurgery, Romodanov Neurosurgery Institute, Kyiv, Ukraine² Department of Regulatory Mechanisms of Cells, Institute of Molecular Biology and Genetics, Kyiv, Ukraine³ Department of Gene Technology, Institute of Genetic and Regenerative Medicine, Kyiv, UkraineReceived, June 11, 2017.
Accepted, August 01, 2017.**Address for correspondence:**

Leonid D. Pichkur, Restorative Neurosurgery Department, Romodanov Neurosurgery Institute, 32 Platona Maiborody St., Kyiv, Ukraine, 04050, e-mail: L.Pichkur@neuro.kiev.ua

Human Wharton's Jelly of mesenchymal stem cells (hWJ-MSCs) have a considerable advantage in comparison with the cells from other sources; their therapeutic potential in treating the central nervous system (CNS) diseases is higher than that of other MSCs. That's why hWJ-MSCs can be a new alternative treatment of CNS demyelination damages including multiple sclerosis (MS).

Purpose. To study the persistence and distribution of hWJ-MSCs in different CNS segments following suboccipital transplantation into cerebrospinal fluid (CSF) of rats with experimental allergic encephalomyelitis (EAE).

Methods. Isolation and cultivation of hWJ-MSCs in vitro. Immunological phenotyping by flow cytometry. EAE induction. Suboccipital injection of MSCs into EAE rats cerebrospinal fluid. Persistence of hWJ-MSCs in the CNS of EAE rats was assayed by PCR in tissue samples at days 2, 3, 4 and 5 using primers for amplifying nucleic alpha satellite sequences of human 17th chromosome.

Results. PCR-assays for alpha-satellite sequences revealed human DNA to be detected in the treated rats within 5 days after suboccipital injection at the peak of disease. The human DNA was traced in CSF and various segments of the spinal cord.

Conclusions. The data obtained suggest that suboccipitally delivered hWJ-MSCs, survive and can migrate through the CSF from the injection site (cisterna magna) to various segments of CNS.

Keywords: *experimental allergic encephalomyelitis, mesenchymal stem cells from humans Wharton's jelly of umbilical cord, demyelination damages, PCR-analysis.*

Ukrainian Neurosurgical Journal. 2017;(3):30-5.

Выживание трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток вартонового студня пуповины человека в центральной нервной системе крыс при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите после их субоципитального введения

Пичкур Л.Д.¹, Ковальчук М.В.^{2,3}, Дерябіна Е.Г.³, Вербовская С.А.¹, Акинола С.Т.¹, Шувалова Н.С.³, Кордюм В.А.^{2,3}

¹ Отдел восстановительной и функциональной нейрохирургии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

² Отдел регуляторных механизмов клетки, Институт молекулярной биологии и генетики, НАН Украины, Киев, Украина

³ Отдел генных технологий, Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины, Киев, Украина

Поступила в редакцию 11.06.17.
Принята к публикации 01.08.17.

Адрес для переписки:

Пичкур Леонид Дмитриевич,
Отделение восстановительной
нейрохирургии, Институт
нейрохирургии им. акад. А.П.
Ромоданова, ул. Платона
Майбороды, 32, Киев, Украина,
04050, e-mail: L.Pichkur@neuro.
kiev.ua

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) вартонового студня пуповины человека (ВСч) имеют значительное преимущество по сравнению с клетками из других источников; их терапевтический потенциал при заболеваниях центральной нервной системы (ЦНС) выше такового МСК, полученных из других источников. В связи с этим, их применение может быть альтернативой при лечении демиелинизирующих заболеваний ЦНС, в том числе рассеянного склероза (РС).

Цель исследования. Проанализировать сроки выживания МСК ВСч в разных отделах ЦНС крыс при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ) после их субоципитального введения в ликворные пути.

Материалы и методы. Моделирование ЭАЭ. Выделение и культивирование МСК ВСч *in vitro*. Иммунофенотипирование с применением проточной цитометрии. Субоципитальное введение МСК ВСч в спинномозговую жидкость (СМЖ) крыс при ЭАЭ. Выживание трансплантированных МСК ВСч в ЦНС крыс исследовали по данным цепной реакции с полимеразой (ЦРП) в образцах тканей на 2, 3, 4-е и 5-е сутки.

Результаты. По данным ЦРП альфа-сателлитные последовательности ДНК человека обнаруживали до 5-х суток после субоципитального введения на пике заболевания. ДНК человека выявляли в СМЖ и разных сегментах спинного мозга.

Выводы. Введенные субоципитально МСК ВСч выживают и мигрируют по СМЖ из большой затылочной цистерны в разные отделы ЦНС. МСК ВСч можно также рассматривать в качестве клеточ-векторов для доставки терапевтических молекул при лечении воспалительных заболеваний ЦНС.

Ключевые слова: *экспериментальный аллергический энцефаломиелит; мезенхимальные стволовые клетки пуповины человека; демиелинизирующее поражение; цепная реакция с полимеразой.*

Украинский нейрохирургический журнал. 2017;(3):30-5.

Вступ. Розсіяний склероз (РС) – це складне хронічне імунно-опосередковане і нейродегенеративне захворювання, спричинене генетичною схильністю та екологічними факторами ризику [1, 2]. Він характеризується інфільтрацією імунних клітин з крові в ЦНС, пошкодженням мієліну і аксонів. В останні роки розроблені методи лікування РС, спрямовані на пригнічення імунної системи для контролю запальних процесів з метою припинення прогресування захворювання. Методи лікування, що застосовують у теперішній час, ефективні лише частково [3-5]. Для посилення нейро-або мієлогенезу ушкоджених тканин ЦНС і відновлення неврологічних функцій актуальним є пошук нових підходів і методів лікування. Одним з таких напрямків може бути застосування клітинної терапії [3, 6].

За даними численних досліджень, МСК різного походження здатні поліпшувати перебіг алергічного

енцефаломієліту, що є експериментальною моделлю РС [5, 7-9]. На моделях неврологічних розладів, у тому числі ЕАЕ, було доведено, що трансплантовані МСК виявляють імунomodulatory, протизапальні, прорегенеративні, нейропротекторні та ангіогенні властивості [7, 10, 11], сприяють пригніченню демієлінізації, попереджають загибель нейронів. Крім того, на моделі ЕАЕ у мишей при трансплантації МСК (на ранніх стадіях) відзначений захист від прогресування ЕАЕ, що пов'язане з дозою трансплантованих клітин, а на піку ЕАЕ – уповільнення прогресування, зменшення тяжкості захворювання [7].

МСК здатні мігрувати в зони ушкоджених ділянок ЦНС, де вони підтримують локальний нейрогенез, мієлогенез завдяки нейротрофічним ефектам, стимуляції резидентних стовбурових клітин ЦНС, індукції імунomodulatory *in situ*, або, ймовірно, навіть

трансдиференціації [5]. Трансплантовані МСК можуть бути джерелом нейротрофічних сполук, що поширюються через СМР до різних відділів спинного мозку [12]. Також встановлено, що трансплантовані у головний мозок МСК людини динамічно розподіляються і локалізуються переважно у певних анатомічних ділянках [13]. Очевидно, цей процес опосередкований молекулами адгезії і перебуває під контролем рецепторів, що експресуються трансплантованими МСК [14].

МСК з ВДл можуть бути ефективними в лікуванні захворювань ЦНС. Імуномодулюючий ефект МСК ВДл оцінений *in vitro* і на моделях на тваринах [15]. Вважають, що ЦНС є забар'єрним імунно-привілейованим органом завдяки її структурним особливостям. Тим не менше, за результатами сучасних досліджень, доведений контроль імунної системи над ЦНС через модифіковані схеми імунного нагляду, що потребує перегляду та переосмислення концепції імунної привілейованості ЦНС [16]. РС є прикладом такого імунного «нагляду» за ЦНС. Можливості виживання й міграції МСК ВДл в зони ураження ЦНС при патологічних станах недостатньо досліджені, в той час, як ці чинники можуть справляти істотний вплив на ефективність клітинної терапії. В цьому контексті ми досліджували виживання МСК ВДл і їх поширення по лікворних шляхах після трансплантації на піку клінічних симптомів у тварин при ЕАЕ без відповідної імуносупресії.

Матеріали і методи. Лабораторні тварини.

Як експериментальних тварин використовували білих нелінійних щурів-самців розведення віварію Інституту нейрохірургії, масою тіла 200–220 г. Тварин утримували в стандартних умовах з вільним доступом до води та їжі. Всі процедури проведені з дотриманням вимог Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.10.2006 [17] та Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для дослідницьких або інших наукових цілей від 18.03.86 [18].

Виділення і культивування клітин. МСК виділені з пуповини людини [19]. Клітини другого пасажу (що використовували для ін'єкції) відкріплювали від поверхні культурального посуду і ресуспендували у фосфатно-буферному розчині (ФБР) в концентрації 10×10^6 клітин в 1 см^3 . Зразок клітин для введення перевіряли на адекватність експресії поверхневих маркерів (CD73, CD90, CD105, CD34) [20] за допомогою FACS Aria cell sorter (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) та аналізували з використанням програмного забезпечення BD FACSDiva (v 6.1.2).

Моделювання ЕАЕ та введення МСК ВДл. Для моделювання ЕАЕ щурів імунізували 0,4 мл суспензії, що містила гомогенат спинного мозку (ГСМ) щурів в ізотонічному розчині натрію хлориду, емульгований у співвідношенні 1:2, з повним ад'ювантом Фрейнда (Sigma-Aldrich). Ін'єкцію здійснювали підшкірно в подушечки задніх лап [21]. Тяжкість перебігу ЕАЕ оцінювали за бальною шкалою [22].

МСК ВДл вводили тваринам на піку захворювання, на 17-ту добу після моделювання ЕАЕ субокципітально у велику потиличну цистерну в кількості 1×10^6 в 100 мкл ФБР. Контрольною групою були тварини з модельованим ЕАЕ, яким МСК не вводили. Матеріал для дослідження (поперекове потовщення, стовбур

мозку в ділянці великої потиличної цистерни, СМР, півкулі великого мозку) забирали на 2, 3, 4-ту і 5-ту добу після трансплантації МСК.

Виділення ДНК. Геномну ДНК екстрагували з клітин СМР за методом висолювання [23], а також з тканини головного і спинного мозку [24]. ДНК, отриману з тканин щура контрольної групи, використовували як негативний контроль, ДНК-МСК ВДл – як позитивний контроль. Концентрацію ДНК і чистоту визначали за показником оптичної щільності з використанням спектрофотометра Thermo Scientific NanoDrop 2000 UV Vis. (США).

Ланцюгова реакція з полімеразою. Для ідентифікації клітин людини використовували ЛРП з специфічними до альфа-сателітних послідовностей ДНК людини праймерами. Проводили стандартизовану ЛРП [25]. Всі аналізи виконані у двох повторях. В кожній реакції використовували однаково кількість геномної ДНК-матриці. Продукти реакції візуалізували шляхом електрофорезу в 1,2% агарозному гелі. Використані ЛРП-праймери з послідовністю в альфа-сателітній ділянці 17-ї хромосоми людини:

5_-TGCGCGTGAAGGTTTCCAGTGT- 3 і

5_-GCCCCAGTTCGTTTCAGGTAATCATAGTCC-3 [25].

Чутливість ЛРП становила приблизно 1 клітина людини на 10^5 клітин щура, що встановлено в ЛРП з використанням матриць, отриманих з логарифмічних розведень МСК людини в спленоцитах щурів.

Результати та їх обговорення. Відповідно до FACS аналізу (Fluorescence-activated cell sorting), понад 90% МСК ВДл другого пасажу, підготовлених для трансплантації, були позитивними за CD73, CD90 і CD105 маркерам і негативними за CD 34 (менше 2%). Життєздатність клітин, визначена шляхом забарвлення трипановим синім, перевищувала 95%.

Аналіз альфа-сателітних послідовностей ДНК людини свідчив, що ДНК людини виявляли протягом 5 діб після ін'єкції без відповідної імуносупресії у тканинах експериментальних щурів при ЕАЕ (**див. таблицю**).

Відповідно до анатомічної локалізації, трансплантовані МСК ВДл можуть мігрувати через СМР. Типові приклади молекулярної детекції МСК ВДл у різних сегментах спинного мозку, СМР і головному

Виявлення трансплантованих МСК людини шляхом аналізу альфа-сателітних послідовностей методом ЛРП

Досліджуваний матеріал	Кількість тварин з позитивними результатами у строки спостереження, діб			
	2 (n=3)	3 (n=2)	4 (n=2)	5 (n=2)
Півкулі великого мозку	1	0	0	0
Стовбур мозку в ділянці ін'єкції	3	2	2	2
СМР	3	2	1	1
Спинний мозок грудного відділу	3	2	2	2
Спинний мозок поперекового потовщення	1	0	0	0

мозку представлені на **рис. 1-6**. Всі зразки тканини стовбуру мозку в ділянці великої потиличної цистерни (місце введення клітин) були позитивними щодо ДНК людини. Імовірно, більшість МСК ВДл спочатку локалізувались в цьому регіоні, їх виявляли там протягом 5 діб (**рис. 1**).

ДНК людини виявлена також у більшості зразків СМР з великої потиличної цистерни (**рис. 2**).

Клітини, введені у СМР при неврологічних демієлінізуючих захворюваннях, мігрують по ЦНС, в

тому числі до зон ураження. МСК ВДл мігрують, проникають і зберігаються у грудному відділі спинного мозку (**рис. 3**).

Проте, альфа-сателітні послідовності не виявлені у півкулях великого мозку та поперековому потовщенні спинного мозку, за винятком окремих спостережень (**рис. 4-6**). Можливо, більшість ксеногенних клітин загинули внаслідок гіпоксії або мігрували в зони більш вираженого ураження ЦНС. Можливо, кількість клітин недостатня для позитивного сигналу в ЛРП.

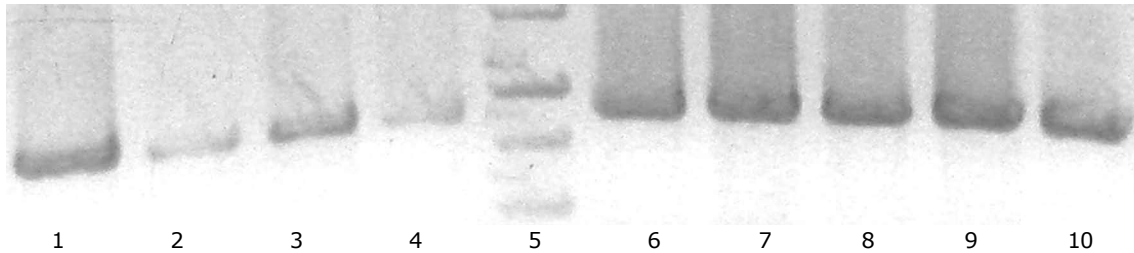


Рис. 1. Результати ЛРП зразків альфа-сателітних послідовностей ДНК людини у стовбурі головного мозку щурів в ділянці великої потиличної цистерни (місце введення МСК ВДл) в різні строки спостереження. 1, 2 – 2 доби; 3, 4 – 3 доби; 5 – маркер молекулярної маси 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 6, 7 – 4 доби; 8, 9 – 5 діб; 10 – ДНК МСК людини (позитивний контроль).

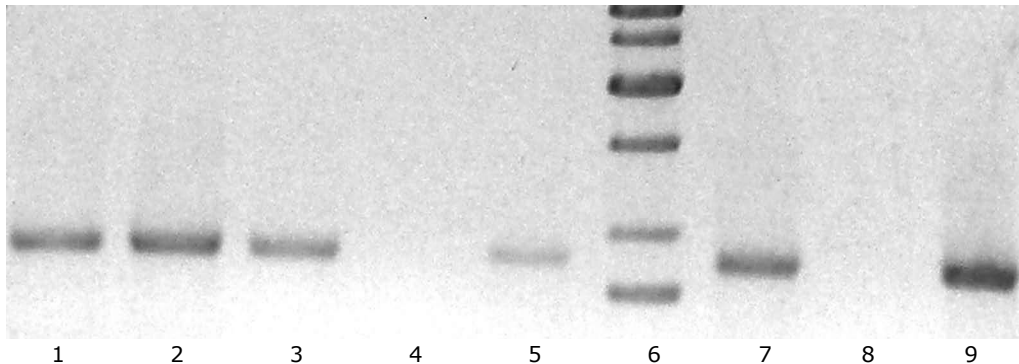


Рис. 2. Результати ЛРП зразків альфа-сателітних послідовностей ДНК людини у СМР щурів після трансплантації МСК ВДл в різні строки спостереження. 1 – 2 доби; 2, 3 – 3 доби; 4, 5 – 4 доби; 6 – маркер молекулярної маси, 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 7, 8 – 5 діб; 9 – ДНК МСК людини (позитивний контроль).

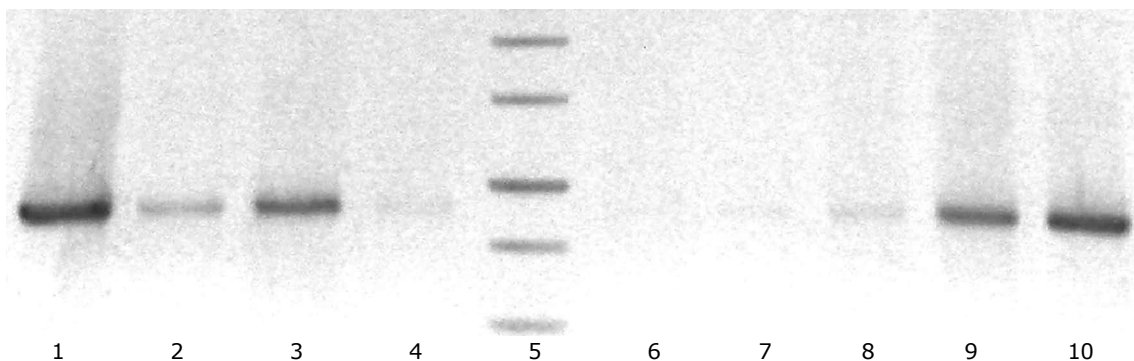


Рис. 3. Результати ЛРП зразків альфа-сателітних послідовностей ДНК людини у грудному відділі спинного мозку щурів після трансплантації МСК ВДл в різні строки спостереження. 1, 2 – 2 доби; 3, 4 – 3 доби; 5 – маркер молекулярної маси, 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 6, 7 – 4 доби; 8, 9 – 5 діб; 10 – ДНК МСК людини.

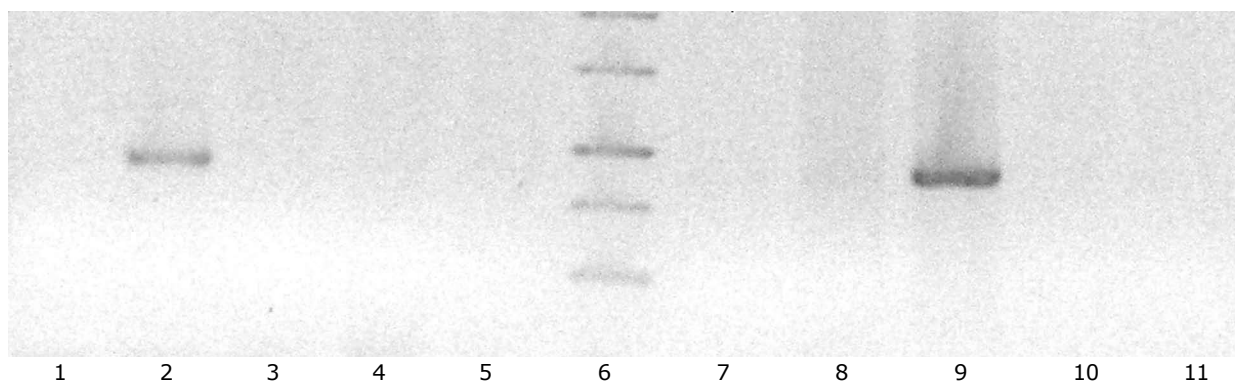


Рис. 4. Результати ЛРП зразків альфа-сателітних послідовностей ДНК людини у півкулях великого мозку щурів після трансплантації МСК ВДл в різні строки спостереження. 1 – ДНК лейкоцитів щурів (негативний контроль); 2, 3 – 2 доби; 3, 4, 5 – 3 доби; 6 – маркер молекулярної маси, 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 7, 8 – 4 доби; 9 – ДНК МСК людини (позитивний контроль); 10, 11 – 5 діб.

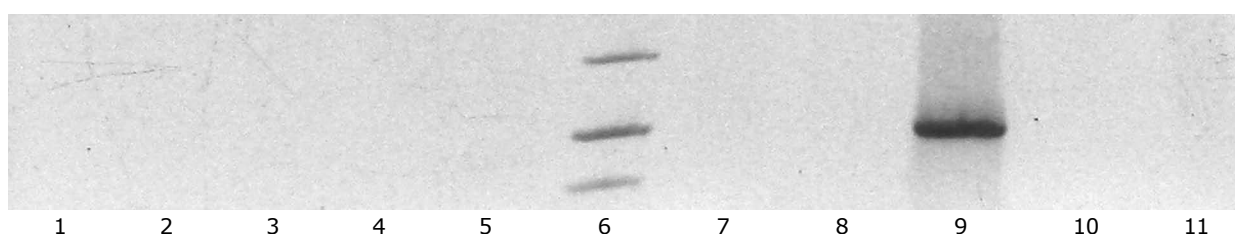


Рис. 5. Результати ЛРП зразків альфа-сателітних послідовностей ДНК людини у поперековому потовщенні спинного мозку щурів після трансплантації МСК ВДл в різні строки спостереження. 1 – ДНК лейкоцитів щурів (негативний контроль); 2, 3 – 2 доби; 4, 5 – 3 доби; 6 – маркер молекулярної маси, 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 7, 8 – 4 доби; 9 – ДНК МСК людини (позитивний контроль); 10, 11 – 5 діб.

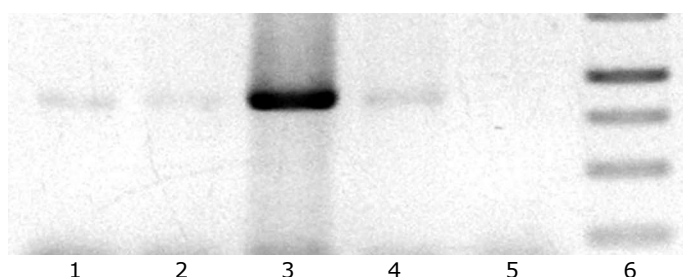


Рис. 6. Результати ЛРП зразків альфа-сателітних послідовностей ДНК людини у різних зразках тканин нервової системи та СМР у щура на 2-гу добу після трансплантації МСК. 1 – поперековий відділ; 2 – стовбур головного мозку; 3 – ДНК МСК людини (позитивний контроль); 4 – СМР; 5 – півкулі великого мозку; 6 – маркер молекулярної маси, 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Отже, МСК ВДл, введені щурам при ЕАЕ на піку захворювання, локалізувались в специфічних регіонах ЦНС тварин. Протягом 5 діб клітини мігрували по СМР, переважно в грудний відділ спинного мозку.

На відміну від отриманих нами результатів, на моделі експериментального остеоартриту після ін'єкції МСК ВДл в колінний суглоб щурів клітини виживали протягом 1 доби [26].

Оскільки при РС відбувається часткова спонтанна і непередбачувана ремієлінізація, строки введення МСК дуже важливі, проте, їх важко визначити. У клінічній практиці клітинну терапію застосовують, як правило, тільки за наявності гострих проявів РС. У зв'язку з цим, незважаючи на те, що в моделях на

тваринах доведена ефективність профілактичного лікування ЕАЕ з використанням МСК, важливо вводити МСК до або під час піку захворювання, що попереджує прогресування симптомів і сприяє процесам ремієлінізації. Тому ми вивчали виживання і розподіл субоципітально введених МСК ВДл у щурів при ЕАЕ за відстроченого введення клітин на піку клінічних проявів захворювання.

Цей розподіл клітин по ЦНС і їх виживання свідчать, що МСК ВДл мають суттєвий терапевтичний потенціал при запальних нейродегенеративних захворюваннях, коли їх використовують для внесення терапевтичних агентів (факторів росту, цитокінів тощо) в ЦНС. МСК ВДл слід розглядати і як клітини-

вектори для доставки терапевтичних молекул при лікуванні запальних захворювань ЦНС.

Висновки. Отримані дані свідчать, що субоципітально введені МСК ВДл можуть мігрувати через СМР з місця ін'єкції в різні відділи ЦНС і виживати в них принаймні протягом 5 діб після трансплантації, здійсненої на піку ЕАЕ (в ксеногенному варіанті без імуносупресії).

References

- Darlington PJ, Boivin MN, Bar-Or A. Harnessing the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2011 Sep;11(9):1295-303. doi: 10.1586/ern.11.113. PubMed PMID: 21864075; PubMed Central PMCID: PMC3234364.
- Høglund RA, Maghazachi AA. Multiple sclerosis and the role of immune cells. *World J Exp Med.* 2014 Aug 20;4(3):27-37. doi: 10.5493/wjem.v4.i3.27. PubMed PMID: 25254187; PubMed Central PMCID: PMC4172701.
- Mastorodemos V, Ioannou M, Verginis P. Cell-based modulation of autoimmune responses in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: therapeutic implications. *Neuroimmunomodulation.* 2015;22(3):181-95. doi: 10.1159/000362370. PubMed PMID: 24852748.
- Goldenberg MM. Multiple sclerosis review. *P T.* 2012 Mar;37(3):175-84. PubMed PMID: 22605909; PubMed Central PMCID: PMC3351877.
- Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, Bulte JW, Petrou P, Ben-Hur T, Abramsky O, Slavov S. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 2010 Oct;67(10):1187-94. doi: 10.1001/archneurol.2010.248. PubMed PMID: 20937945; PubMed Central PMCID: PMC3036569.
- Cohen JA. Mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2013 Oct 15;333(1-2):43-9. doi: 10.1016/j.jns.2012.12.009. PubMed PMID: 23294498; PubMed Central PMCID: PMC3624046.
- Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, Gini B, Bach SD, Martinello M, Bifari F, Galie M, Turano E, Budui S, Sbarbati A, Krampfer M, Bonetti B. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells.* 2009 Oct;27(10):2624-35. doi: 10.1002/stem.194. PubMed PMID: 19676124.
- Axelsson M, Malmeström C, Gunnarsson M, Zetterberg H, Sundström P, Lycke J, Svenningsson A. Immunosuppressive therapy reduces axonal damage in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2014 Jan;20(1):43-50. doi: 10.1177/1352458513490544. PubMed PMID: 23702432.
- Lublin FD, Bowen JD, Huddlestone J, Kremenchutzky M, Carpenter A, Corboy JR, Freedman MS, Krupp L, Paulo C, Hariri RJ, Fischkoff SA. Human placenta-derived cells (PDA-001) for the treatment of adults with multiple sclerosis: a randomized, placebo-controlled, multiple-dose study. *Mult Scler Relat Disord.* 2014 Nov;3(6):696-704. doi: 10.1016/j.msard.2014.08.002. PubMed PMID: 25891548.
- Uccelli A, Laroni A, Freedman MS. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol.* 2011 Jul;10(7):649-56. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70121-1. PubMed PMID: 21683930.
- Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell.* 2012 Jun 14;10(6):709-16. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.015. PubMed PMID: 22704511.
- Nakano N, Nakai Y, Seo TB, Homma T, Yamada Y, Ohta M, Suzuki Y, Nakatani T, Fukushima M, Hayashibe M, Ide C. Effects of bone marrow stromal cell transplantation through CSF on the subacute and chronic spinal cord injury in rats. *PLoS One.* 2013 Sep 11;8(9):e73494. doi: 10.1371/journal.pone.0073494. PubMed PMID: 24039961; PubMed Central PMCID: PMC3770680.
- Isakova IA, Baker K, DuTreil M, Dufour J, Gaupp D, Phinney DG. Age- and dose-related effects on MSC engraftment levels and anatomical distribution in the central nervous systems of nonhuman primates: identification of novel MSC subpopulations that respond to guidance cues in brain. *Stem Cells.* 2007 Dec;25(12):3261-70. doi: 10.1634/stemcells.2007-0543. PubMed PMID: 17932418.
- Phinney DG, Baddoo M, Dutreil M, Gaupp D, Lai WT, Isakova IA. Murine mesenchymal stem cells transplanted to the central nervous system of neonatal versus adult mice exhibit distinct engraftment kinetics and express receptors that guide neuronal cell migration. *Stem Cells Dev.* 2006 Jun;15(3):437-47. doi: 10.1089/scd.2006.15.437. PubMed PMID: 16846379.
- Zhao G, Liu F, Lan S, Li P, Wang L, Kou J, Qi X, Fan R, Hao D, Wu C, Bai T, Li Y, Liu JY. Large-scale expansion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on gelatin microbeads, with retention of self-renewal and multipotency characteristics and the capacity for enhancing skin wound healing. *Stem Cell Res Ther.* 2015 Mar 19;6:38. doi: 10.1186/s13287-015-0031-3. PubMed PMID: 25889402; PubMed Central PMCID: PMC4413550.
- Romo-González T, Chavarría A, Pérez-H J. Central nervous system: a modified immune surveillance circuit? *Brain Behav Immun.* 2012 Aug;26(6):823-9. doi: 10.1016/j.bbi.2012.01.016. PubMed PMID: 22310920.
- [Law of Ukraine No 3447-IV On the Protection of Animals from Cruelty] [Internet]. Verkhovna Rada of Ukraine. 2017 [cited 24 May 2017]. Ukrainian. Available from: <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
- European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes [Internet]. Council of Europe. 2017 [cited 24 May 2017]. Available from: <https://rm.coe.int/168007a67b>.
- Maslova OO, Shuvalova NS, Sukhorada OM, Zhukova SM, Deryabina OG, Makarenko MV, et al. Heterogeneity of Umbilical Cords as a Source for Mesenchymal Stem Cells. *Dataset Papers in Biology.* Hindawi Limited; 2013;2013:1-4. doi: 10.7167/2013/370103.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905. PubMed PMID: 16923606.
- Feurer C, Prentice DE, Cammisuli S. Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol.* 1985 Dec;10(2):159-66. doi: 10.1016/0165-5728(85)90006-2. PubMed PMID: 3877741.
- Miller SD, Karpus WJ, Davidson TS. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol.* 2010 Feb;Chapter 15:Unit 15.1. doi: 10.1002/0471142735.im1501s88. PubMed PMID: 20143314.
- Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 1989 Oct 25;17(20):8390. doi: 10.1093/nar/17.20.8390. PubMed PMID: 2813076; PubMed Central PMCID: PMC334995.
- Biase FH, Franco MM, Goulart LR, Antunes RC. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. *Genet Mol Biol.* 2002;25(3):313-315. doi: 10.1590/S1415-47572002000300011.
- Becker M, Nitsche A, Neumann C, Aumann J, Junghahn I, Fichtner I. Sensitive PCR method for the detection and real-time quantification of human cells in xenotransplantation systems. *Br J Cancer.* 2002 Nov 18;87(11):1328-35. doi: 10.1038/sj.bjc.6600573. PubMed PMID: 12439725; PubMed Central PMCID: PMC2408903.
- Kovalchuk MV, Shuvalova NS, Pokholenko IO, Draguljan MV, Gulko TP, Deryabina OG, Kordium VA. Monitoring of transplanted human mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in xenogeneic systems in vivo. *Biopolymers and Cells.* 2015;31(3):193-199. doi: 10.7124/bc.0008E0.