

นิพนธ์ฉบับ

การเปรียบเทียบผลการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากถุงน้ำคร่ำและไขกระดูก

ลัดดา มีสุข*, ภาควณิ เชี่ยวละม้าย**, ชัยรัตน์ ตัณฑรารัตน์พันธ์**, ศิริกุล มะโนจันทร์**

บทคัดย่อ

- บทนำ:** เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cells: MSCs) เป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพที่จะนำไปใช้ในด้านเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อม เนื่องจากเซลล์ต้นกำเนิดดังกล่าวสามารถคัดแยกได้จากเนื้อเยื่อหลายชนิด รวมทั้งสามารถเพิ่มจำนวนและกระตุ้นให้เจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะอย่างได้ คุณสมบัติสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์เป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดที่น่าสนใจคือ ฤทธิ์ในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทำให้เกิดการ engraftment ของเซลล์ที่ปลูกถ่าย MSCs ที่ใช้ในทางคลินิกและการวิจัยส่วนใหญ่ได้มาจากไขกระดูก ในปัจจุบันมีรายงานการคัดแยก MSCs จากเนื้อเยื่อหลายชนิดรวมทั้งรกและสายสะดือ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีววิทยาและการออกฤทธิ์ควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากถุงน้ำคร่ำ (AM-MSCs) และเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก (BM-MSCs)
- วิธีการศึกษา:** ศึกษาและเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ AM-MSCs และ BM-MSCs โดยใช้ระบบการเลี้ยงร่วมกับ T lymphocyte จากกระแสดเลือดที่ถูกกระตุ้น
- ผลการศึกษา:** AM-MSCs มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์เช่นเดียวกับ BM-MSCs กล่าวคือมีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ ได้แก่ CD73, CD90 และ CD105 และไม่มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด คือ CD34 และ CD45 นอกจากนี้ยังพบว่า AM-MSCs สามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ในชั้น mesoderm ได้หลายชนิด ได้แก่ เซลล์ไขมันและเซลล์กระดูก และที่น่าสนใจ คือ เมื่อนำ AM-MSCs มาเลี้ยงร่วมกับ T lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นพบว่าทำให้อัตราการเพิ่มจำนวนของ activated T lymphocyte ลดลง
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** AM-MSCs และ BM-MSCs มีความสามารถในการออกฤทธิ์ควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ไม่แตกต่างกัน แต่การคัดแยก AM-MSCs มีข้อได้เปรียบในด้านของแหล่งที่มาของเซลล์ ดังนั้น AM-MSCs น่าจะเป็นแหล่งทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดรักษาโรคในทางคลินิก

คำสำคัญ: การออกฤทธิ์ควบคุมภูมิคุ้มกัน, เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์, ไขกระดูก, ถุงน้ำคร่ำ

วันที่รับบทความ: ๑๖ มีนาคม ๒๕๕๖

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๑๕ พฤษภาคม ๒๕๕๖

* หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ชีววิทยาระดับเซลล์และอณูชีววิทยา) คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** สาขาเซลล์ชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์พระคิริน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผู้ให้ติดต่อ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริกุล มะโนจันทร์ สาขาเซลล์ชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์พระคิริน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทนำ

Graft versus host disease (GvHD) เป็นภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญของการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด โดยเฉพาะในรายที่ผู้ให้เซลล์ต้นกำเนิดมี HLA ต่างจากผู้รับ โดย T lymphocyte จากไขกระดูกที่ปลูกถ่ายเข้าไปใหม่ มีปฏิกิริยาต่อต้าน T lymphocyte ที่มีอยู่ในตัวผู้ป่วย ระบบภูมิคุ้มกันจะมีการจดจำถึงความแตกต่างระหว่างเนื้อเยื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาต่อต้าน เกิดเป็นอาการผิดปกติ เช่น ผื่นตามตัว ท้องเสีย ตับทำงานผิดปกติ ตัวเหลือง เป็นต้น ในรายที่รุนแรงอาจถึงขั้นเสียชีวิตได้ การรักษาในปัจจุบันส่วนใหญ่จะเป็นการให้ยากกลุ่ม steroids แต่ยาที่ใช้จะมีผลในการกดภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยทำให้ร่างกายไม่สามารถต่อสู้กับเชื้อโรคและเกิดภาวะแทรกซ้อนอื่นตามมา ในผู้ป่วยที่มี GvHD รุนแรง ซึ่งใช้ยาอื่นแล้วไม่ได้ผล ถ้าให้เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จะสามารถลดอาการของ GvHD ได้ดี เนื่องมาจากการที่เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์สามารถควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory property) โดยการยับยั้งการ proliferation และการทำงานของ innate และ adaptive immune cells เช่น ยับยั้งการ maturation ของ dendritic cell ยับยั้ง cytotoxicity ของ NK cell และยับยั้งการเจริญของ T และ B lymphocytes ที่ถูกกระตุ้นจาก alloresponse ต่างๆ รวมทั้งส่งเสริมการแบ่งตัวของ CD4⁺, CD25⁺, FoxP3⁺ และ regulatory T cells^{๑-๔}

ในปัจจุบันเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์สามารถคัดแยกได้จากไขกระดูก เซลล์ชนิดนี้สามารถที่จะนำมาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และสามารถพัฒนาเป็นเซลล์ได้หลายชนิด อาทิเช่น เซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมัน อย่างไรก็ตามการนำเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูกมาใช้ในทางการแพทย์ยังคงมีข้อจำกัดหลายประการทั้งทางด้านจำนวนซึ่งมีอยู่เพียงร้อยละ ๐.๐๐๑-๐.๐๑ ของเซลล์ในไขกระดูก นอกจากนี้จำนวนและคุณภาพของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ มีการแปรผันตามอายุของผู้บริจาค กล่าวคืออายุมากขึ้นจะทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์มีเซนไคม์ มีจำนวนและคุณภาพลดลง^๕ นอกจากนี้การเจาะไขกระดูกยังเป็นที่ถกเถียงทำให้เกิดความเจ็บปวดต่อผู้บริจาคอีกด้วย นอกจากนี้ไขกระดูกแล้ว ในปัจจุบันมีรายงานความสำเร็จในการคัดแยกเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่ออื่นหลายชนิด เช่น ไขมัน^๖, สายสะดือ^๗, Whartonsjelly^{๘, ๙}, รก^{๑๐}, ถุงน้ำคร่ำ^{๑๑}, เหงือก^{๑๒} เป็นต้น

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากเนื้อเยื่อดังกล่าวมีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะสำหรับ

เซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ และสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูก เซลล์กระดูกอ่อน และเซลล์ไขมันได้เช่นเดียวกับเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีววิทยาและการออกฤทธิ์ควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากถุงน้ำคร่ำและเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบผลการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากถุงน้ำคร่ำและเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากไขกระดูก

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์ในด้านแหล่งทางเลือกใหม่ของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์ที่ไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดต่อผู้บริจาค รวมทั้งเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ในเรื่องของความสามารถในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์ต้นกำเนิดมีเซนไคม์จากถุงน้ำคร่ำซึ่งอาจพัฒนาไปสู่วิธีการรักษาหรือการป้องกันการเกิด GvHD ต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง

ถุงน้ำคร่ำจำนวน ๕ ตัวอย่างได้รับบริจาคจากมารดาที่มีผลเลือดปกติ ปราศจากโรคตับอักเสบ ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ซิฟิลิส หรือโรคติดเชื้อต่างๆ ที่คัดกรองกำหนดและไม่มีภาวะแทรกซ้อน ณ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ไขกระดูกได้รับบริจาคจากอาสาสมัครที่บริจาคไขกระดูก ณ โรงพยาบาลศิริราช โดยกลุ่มตัวอย่างทั้งหมดได้รับคำอธิบายรายละเอียดของโครงการวิจัยจากผู้วิจัยโดยละเอียด ก่อนลงนามยินยอมเข้าร่วมการวิจัย ระเบียบวิธีวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การคัดแยกและการเพาะเลี้ยง MSCs จากไขกระดูก (BM-MSCs)

นำไขกระดูกปริมาณ ๑๐ มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) ในอัตราส่วน ๑:๑ แล้วนำมาปั่นแยก mononuclear cells (MNCs) ด้วย Ficoll-Hypaque (Sciencetific corporation, USA) ที่ความเร็วรอบ 100xg ที่อุณหภูมิ ๒๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ นาที หลังจากนั้นนำส่วนของ MNCs ที่ได้มาปั่นล้างด้วย PBS ที่ความเร็วรอบ 100xg ที่อุณหภูมิ ๒๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๕ นาที ๒ ครั้ง แล้วจึงนำ MNCs ที่ได้มาเพาะเลี้ยงใน

T25-Flask ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 1×10^5 cells/cm² ในน้ำยา Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; GibcoBRL, USA) ที่มี 2 mM L-glutamine (GibcoBRL, USA), 10% fetal bovine serum (FBS; BioWhittaker, USA) และ 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin (GibcoBRL, USA) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ โดยเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ ๓-๔ วัน สังเกตและบันทึกภาพด้วยกล้อง inverted microscope (Nikon TS100, Japan) จนเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ ๘๐ จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วย 0.25% trypsin-EDTA (GibcoBRL, USA) และนำเซลล์ไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป

การคัดแยกและการเพาะเลี้ยง MSCs จากถุงน้ำคร่ำ (AM-MSCs)

นำถุงน้ำคร่ำขนาดประมาณ ๕ x ๕ เซนติเมตร มาล้างด้วย PBS ที่มี 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin แล้วหั่นจนละเอียด จากนั้นนำไปปั่นล้างด้วย PBS ที่มี 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin ที่ความเร็วรอบ 100xg เป็นเวลา ๕ นาที แล้วจึงนำเนื้อเยื่อที่ได้มาแยกด้วย collagenase XI (Sigma-Aldrich, USA) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๖ ชั่วโมง จากนั้นจึงนำเซลล์และเนื้อเยื่อที่ได้ไปปั่นล้างด้วย PBS ที่มี 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin ที่ความเร็วรอบ 100xg เป็นเวลา ๕ นาที ๒ ครั้ง และนำเซลล์รวมทั้งเนื้อเยื่อที่ได้มาเพาะเลี้ยงใน T25-Flask ในน้ำยา DMEM ที่มี 2 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum และ 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ โดยเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ ๓-๔ วัน สังเกตและบันทึกภาพด้วยกล้อง inverted microscope จนเซลล์มีความหนาแน่นประมาณร้อยละ ๘๐ จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วย 0.25% trypsin-EDTA และนำเซลล์ไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป

การศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs ด้วย flow cytometry

นำ MSCs จากถุงน้ำคร่ำ/ไขกระดูก (passage ที่ ๓) มาล้างด้วย PBS และ trypsinized ด้วย 0.25% trypsin-EDTA ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๓ นาที จากนั้นจึงนำเซลล์จำนวน 1×10^6 เซลล์ ที่อยู่ใน PBS 50 µl มาติดฉลากด้วยแอนติบอดี ๕ ชนิด ได้แก่ anti-CD34 PE-conjugate (BD Bioscience, USA), anti-CD45 FITC-conjugate (BD

Bioscience, USA), anti-CD73 PE-conjugate (BD Bioscience, USA), anti-CD90 FITC-conjugate (AbD Serotec, USA) และ anti-CD105 FITC-conjugate (AbD Serotec, USA) ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ นาที จากนั้นจึงนำเซลล์มาปั่นล้างด้วย PBS ที่ความเร็วรอบ 100xg ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๕ นาที แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มาทำให้คงสภาพด้วย 1% paraformaldehyde 500 µl ก่อนที่จะนำเซลล์มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer (FACSCalibur™, Becton Dickinson, USA) โดยใช้โปรแกรม CELLQuest®

การศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ MSCs ไปเป็นเซลล์กระดูก

นำ MSCs ที่ได้จากถุงน้ำคร่ำ/ไขกระดูก (passage ที่ ๓) มาล้างด้วย PBS และ trypsinized ด้วย 0.25% trypsin-EDTA ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓ นาที จากนั้นจึงนำ MSCs จำนวน 1×10^4 เซลล์ มาเพาะเลี้ยงในน้ำยา osteogenic differentiation medium (Hyclone® AdvanceSTEM™, USA) ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด ๓๕ มิลลิเมตร (Corning, USA) ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุก ๓ วัน จนครบ ๒๑ วัน จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปล้างด้วย PBS และตรึงเซลล์ด้วย 10% formalin-methanol ที่อุณหภูมิ -๒๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๕ นาที แล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น ๓ ครั้ง นำไปทำการทดสอบการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase ด้วยสารละลาย 1 mg/ml sodium naphthyl และ 1 mg/ml fast blue RR acid ใน propanididial buffer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา ๑๕ นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นอีก ๒ ครั้ง จากนั้นจึงนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope กลุ่มควบคุมถูกดำเนินการเช่นเดียวกับกลุ่มทดลองทุกประการยกเว้นแต่ใช้น้ำยา DMEM ที่มี 2 mM L-glutamine, 10% FBS และ 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin แทนน้ำยา osteogenic differentiation medium

การศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ MSCs ไปเป็นเซลล์ไขมัน

นำ MSCs ที่ได้จากถุงน้ำคร่ำ/ไขกระดูก (passage ที่ ๓) มาล้างด้วย PBS และ trypsinized ด้วย 0.25% trypsin-EDTA ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓ นาที จากนั้นจึงนำ MSCs จำนวน 1×10^4 เซลล์

มาเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยา adipogenic differentiation medium (Hyclone® AdvanceSTEM™, USA) ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด ๓๕ มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุก ๓ วันจนครบ ๒๑ วัน จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปล้างด้วย PBS และตรึงเซลล์ด้วย 40% formalin vapor ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๑๐ นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น ๒ ครั้ง ก่อนที่จะนำไปย้อมด้วยสารละลาย 0.5% Oil Red O (Sigma, USA) ใน isopropanol ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา ๒๐ นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นอีก ๒ ครั้ง และนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope กลุ่มควบคุมถูกดำเนินการเช่นเดียวกับกลุ่มทดลองทุกประการยกเว้นแต่ใช้น้ำยา DMEM ที่มี 2 mM L-glutamine, 10% FBS และ 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin แทนน้ำยา adipogenic differentiation medium

การทดสอบความสามารถของ MSCs ในการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ activated T lymphocyte

นำ MSCs ที่ได้จากถุงน้ำคร่ำ/ไขกระดูก จำนวน ๓x๑๐^๕ เซลล์ มาเพาะเลี้ยงใน 96 - well plate ที่มีน้ำยา RPMI 1640 (GibcoBRL, USA) ที่มี 10% FBS, 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นจึงคัดแยก MNCs จากกระแสเลือดของผู้ให้ (stimulator) และผู้รับ (responder) โดยนำเลือดปริมาณ ๑๐ มิลลิตร มาเจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน ๑:๑ แล้วนำมาปั่นแยก MNCs ด้วย Ficoll-Hypaque ที่ความเร็วรอบ 100xg ที่อุณหภูมิ ๒๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ นาที นำส่วนของ MNCs ที่ได้มาปั่นล้างด้วย PBS ที่ความเร็วรอบ 100xg ที่อุณหภูมิ ๒๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๕ นาที ๒ ครั้ง แล้วจึงใส่ในน้ำยา RPMI ที่มี 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin จากนั้นจึงนำ MNCs ที่ได้จากผู้รับความเข้มข้น ๑x๑๐^๕ เซลล์/100 µl และ MNCs จากผู้ให้ซึ่งถูกยับยั้งการแบ่งตัวด้วย 10 µg/ml

mitomycin C เป็นเวลา ๒ ชั่วโมง ความเข้มข้น ๒x๑๐^{-๕} เซลล์/100 µl เติมนลงใน 96-well plate ที่มี MSCs อยู่ กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่มี MSCs หลังจากนั้น ๓๒ ชั่วโมง จึงนำเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำยา RPMI 1640 ปริมาณ 100 µl มาใส่ใน 96 well plate อันใหม่ และเติม Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Japan) 10 µl ปั่นไว้เป็นเวลา ๔ ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวัดการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น ๔๕๐ นาโนเมตร ค่าที่ได้นำมาคำนวณการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{Proliferative index} = \frac{\text{O.D. sample} - \text{O.D. blank}}{\text{O.D. control} - \text{O.D. blank}}$$

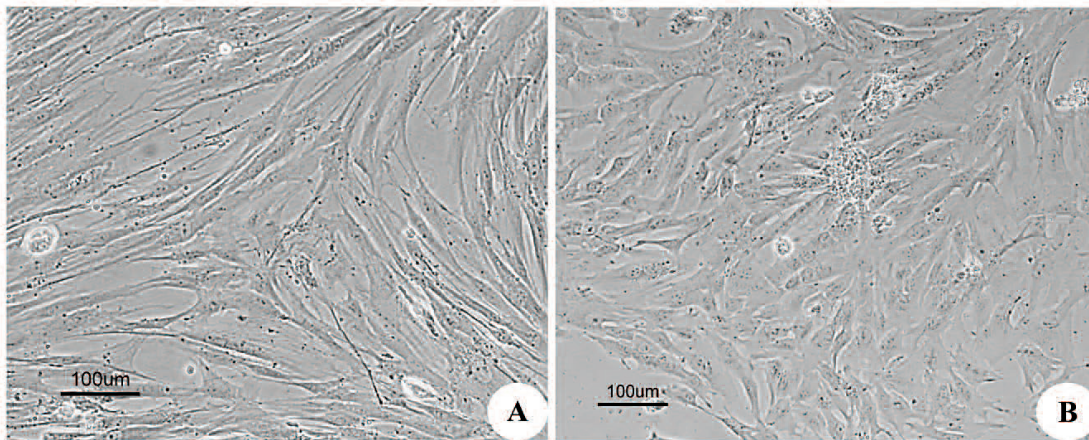
การทดสอบสถิติ

ในการวิจัยนี้ได้ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย ๓ ครั้ง ข้อมูลที่ได้วิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard error of mean) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ ANOVA โดยค่า p-value ที่น้อยกว่า ๐.๐๕ จึงถูกจัดว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษา

การคัดแยกและการเพาะเลี้ยง MSCs จากถุงน้ำคร่ำและไขกระดูก

จากศึกษาการคัดแยก MSCs จากไขกระดูกพบว่า MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูกมีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast-like cell) สามารถยึดเกาะจานเพาะเลี้ยง และสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้จนเต็มพื้นที่ (รูปที่ ๑ A) เมื่อศึกษาการคัดแยก MSCs จากถุงน้ำคร่ำพบว่า เซลล์ที่คัดแยกจากถุงน้ำคร่ำมีลักษณะคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ สามารถยึดเกาะจานเพาะเลี้ยง และสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนเต็มพื้นที่ได้เช่นเดียวกับเซลล์ที่คัดแยกจากไขกระดูก (รูปที่ ๑ B)

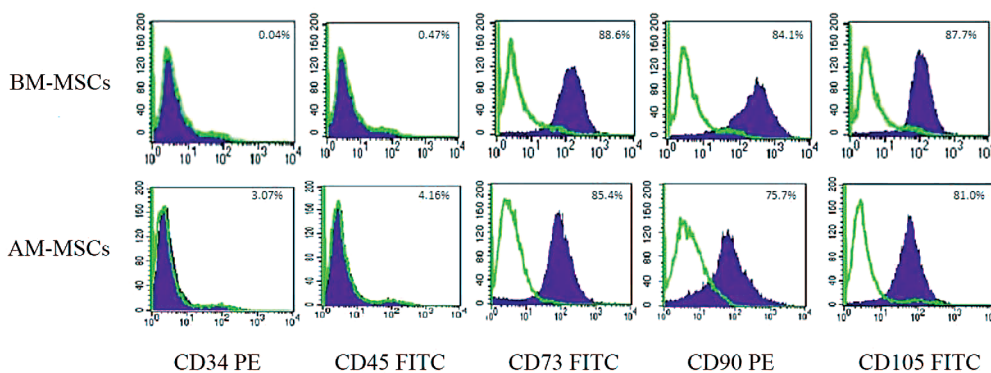


รูปที่ ๑ ลักษณะของ MSCs รุ่นที่ ๓ A: MSCs จากไขกระดูก และ B: MSCs จากถุงน้ำคร่ำ

การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs

เมื่อนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ในรุ่นที่ ๓ มาศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs ด้วย flow cytometry พบว่าเซลล์ที่ได้จากถุงน้ำคร่ำมีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs ได้แก่ CD73, CD90 และ CD105 คิดเป็นร้อยละ ๘๕.๔, ๗๕.๗ และ ๘๑.๐

ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจาก MSCs จากไขกระดูกที่มีการแสดงออกของ CD73, CD90 และ CD105 คิดเป็นร้อยละ ๘๘.๖, ๘๔.๑ และ ๘๗.๗ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่คัดแยกได้จากเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดไม่พบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด ได้แก่ CD34 และ CD45 (รูปที่ ๒)

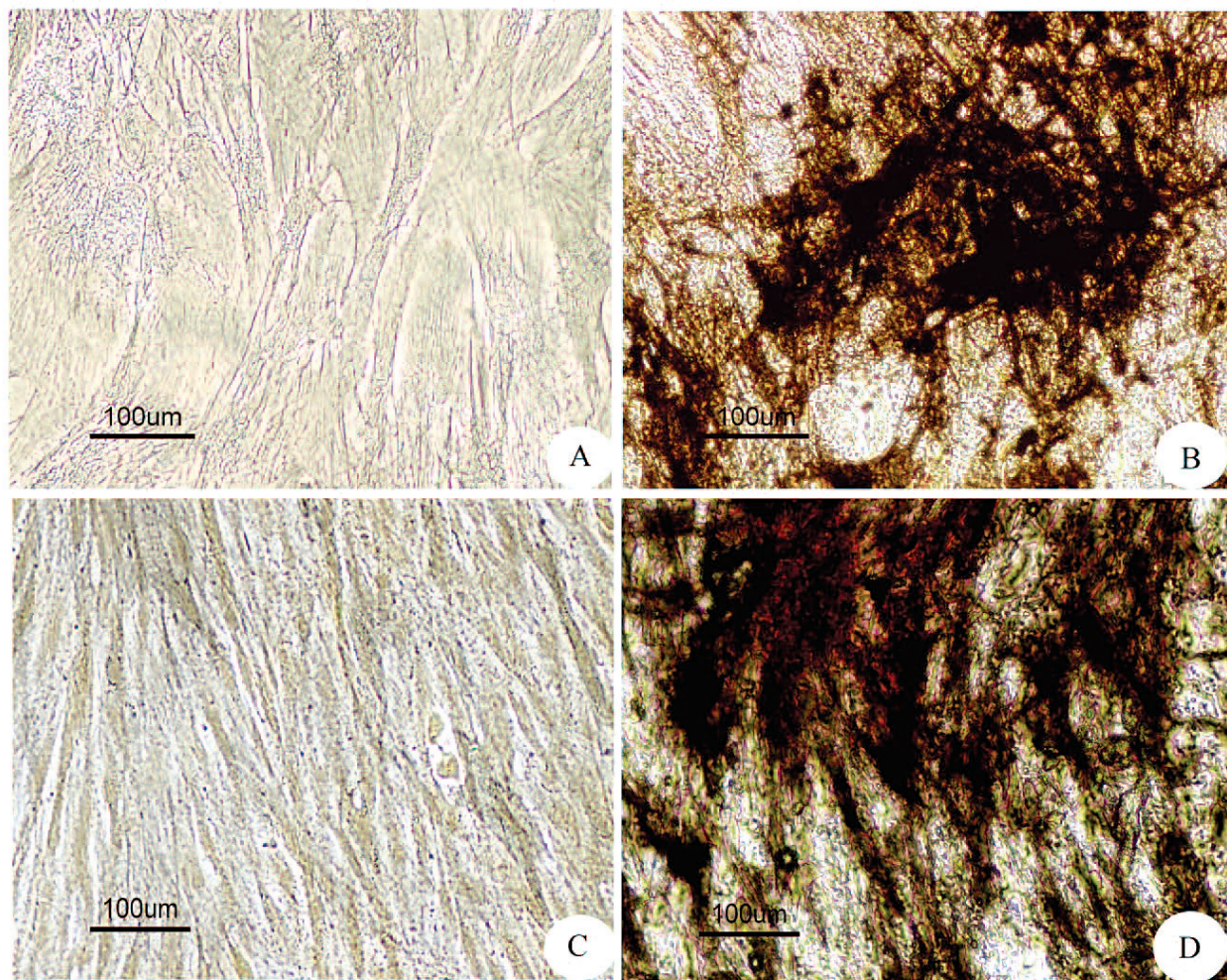


รูปที่ ๒ การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ของ MSCs จากไขกระดูก (BM-MSCs) และถุงน้ำคร่ำ (AM-MSCs)

ความสามารถในการเจริญพัฒนาของ MSCs ไปเป็นเซลล์กระดูก

เมื่อนำ MSCs จากถุงน้ำคร่ำและไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงไว้ในรุ่นที่ ๓ มาทดสอบความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์กระดูก พบว่า MSCs จากถุงน้ำคร่ำที่เพาะเลี้ยงในน้ำยากระตุ้นการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูก สามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์กระดูก เมื่อนำเซลล์ดังกล่าวมาทดสอบการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase พบว่า มีตะกอนสีน้ำตาลเกิดขึ้น (รูปที่ ๓ D) เช่นเดียวกับ MSCs จากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในน้ำยากระตุ้นการเจริญ

พัฒนาเป็นเซลล์กระดูก (รูปที่ ๓ B) สำหรับกลุ่มควบคุม MSCs จากถุงน้ำคร่ำและไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในน้ำยา DMEM ที่มี 2 mM L-glutamine, 10% FBS และ 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin นั้น ไม่สามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกได้ และไม่เกิดผลึกสีน้ำตาลหลังทดสอบการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase (รูปที่ ๓ A, C) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า MSCs จากถุงน้ำคร่ำสามารถถูกกระตุ้นเพื่อให้เกิดการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกได้ ไม่แตกต่างจาก MSCs จากไขกระดูก

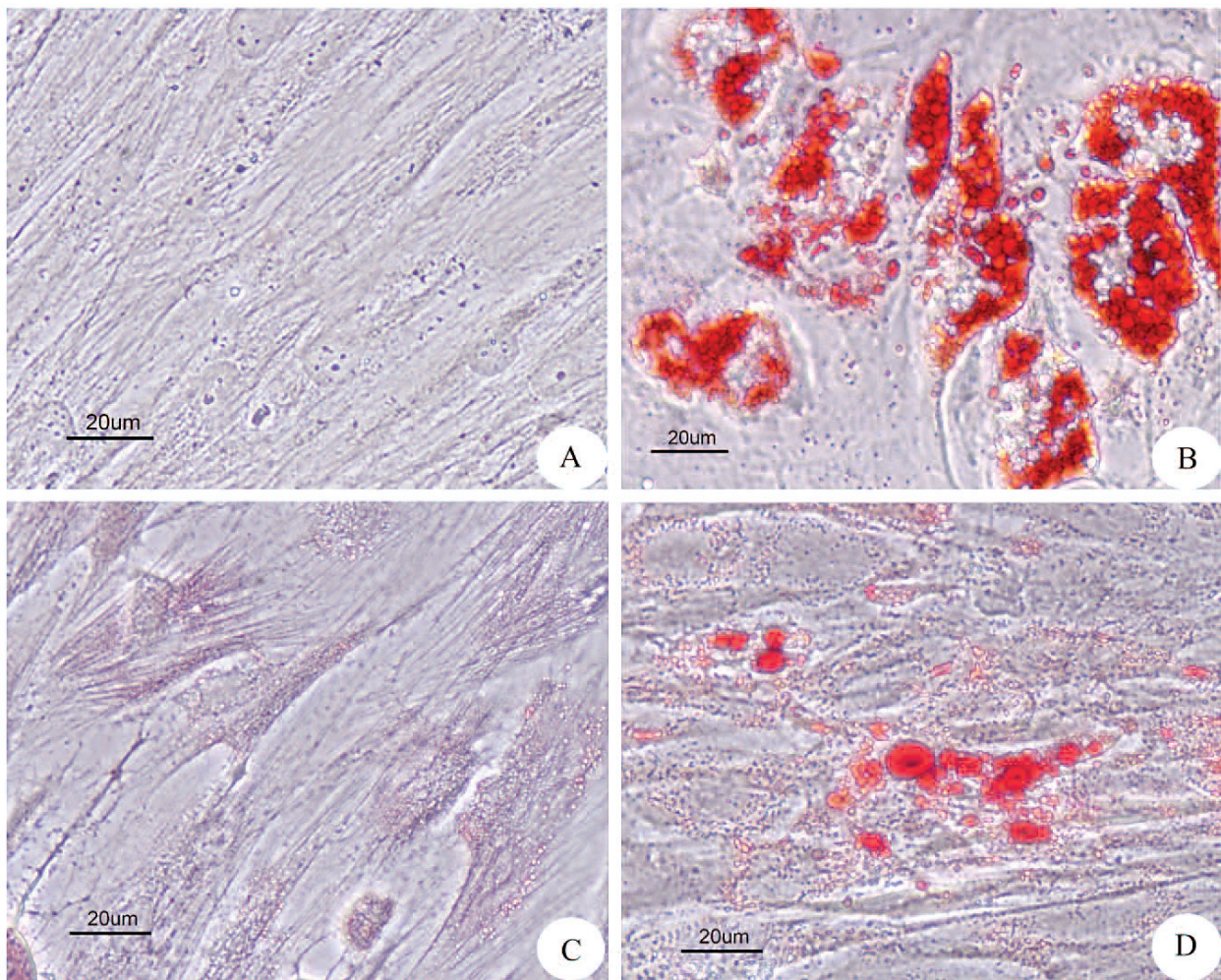


รูปที่ ๓ ความสามารถของ MSCs ในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูก A: MSCs จากไขกระดูก กลุ่มควบคุม, B: MSCs จากไขกระดูก กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้น, C: MSCs จากถุงน้ำคร่ำ กลุ่มควบคุม, D: MSCs จากถุงน้ำคร่ำ กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้น

ความสามารถในการเจริญพัฒนาของ MSCs ไปเป็นเซลล์ไขมัน

เมื่อนำ MSCs ที่เพาะเลี้ยงไว้ในรุ่นที่ ๓ มาทดสอบความสามารถในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมัน พบว่า MSCs จากถุงน้ำคร่ำที่เพาะเลี้ยงในน้ำยากระตุ้นการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมัน สามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ไขมัน โดยเซลล์ดังกล่าวมีการสร้าง lipid droplet ซึ่งย้อมติดสีแดงของ Oil Red O (รูปที่ ๔ D) เช่นเดียวกับ MSCs จากไขกระดูก (รูปที่ ๔ B) อย่างไรก็ตาม MSCs จากถุงน้ำคร่ำ ใช้เวลาในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันประมาณ

๒๘ วัน ซึ่งนานกว่าการเจริญพัฒนาของ MSCs จากไขกระดูก ซึ่งใช้เวลา ๒๑ วัน สำหรับกลุ่มควบคุม MSCs จากถุงน้ำคร่ำ และไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในน้ำยา DMEM ที่มี 2mM L-glutamine, 10% FBS และ 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin นั้น มีลักษณะเรียวยาวและไม่พบ lipid droplet ภายในเซลล์ รวมทั้งไม่ติดสีแดงของ Oil Red O (รูปที่ ๔ A, C) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม MSCs จากถุงน้ำคร่ำสามารถถูกกระตุ้นเพื่อให้เกิดการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมันได้ไม่แตกต่างจาก MSCs จากไขกระดูก

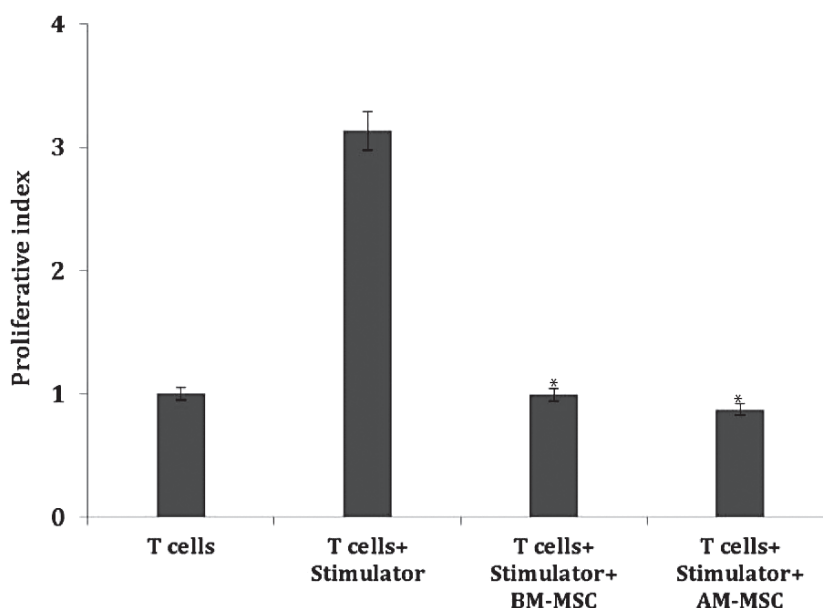


รูปที่ ๔ ความสามารถของ MSCs ในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมัน A: MSCs จากไขกระดูก กลุ่มควบคุม, B: MSCs จากไขกระดูก กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้น, C: MSCs จากถุงน้ำคร่ำ กลุ่มควบคุม, D: MSCs จากถุงน้ำคร่ำ กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้น

ความสามารถของ MSCs ในการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ activated T lymphocyte

การทดสอบความสามารถของ MSCs ในการยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ activated T lymphocyte พบว่า activated T lymphocyte ในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ MSCs จากถุงน้ำคร่ำ มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับ MSCs จากถุงน้ำคร่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (proliferative index = 0.47 ± 0.15 เปรียบเทียบกับ 3.14 ± 0.05 ตามลำดับ; $p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ activated T lymphocyte ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ MSCs จาก

ไขกระดูก พบว่า activated T lymphocyte ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ MSCs จากไขกระดูกมีอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับ MSCs อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (proliferative index = 0.55 ± 0.16 เปรียบเทียบกับ 3.14 ± 0.05 ตามลำดับ; $p < 0.05$) เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่า MSCs จากถุงน้ำคร่ำสามารถยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ activated T lymphocyte ได้ไม่แตกต่างจาก MSCs จากไขกระดูก (proliferative index = 0.47 ± 0.15 เปรียบเทียบกับ 0.55 ± 0.16 ตามลำดับ) (รูปที่ ๕)



รูปที่ ๕ ความสามารถของ MSCs จากไขกระดูกและถุงน้ำคร่ำ ในการยับยั้งการแบ่งตัวของ T lymphocyte

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (T cells + stimulator)

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

MSCs เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีศักยภาพในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะอย่างได้หลายชนิด เช่น เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์ไขมัน เซลล์กระดูก และเซลล์กระดูกอ่อน^{๑๔} MSCs จึงเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่แพทย์และนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มให้ความสนใจศึกษาเพื่อที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกได้ในอนาคต^{๑๕, ๑๖} มีรายงานว่าเมื่อฉีด MSCs เข้าไปในร่างกาย MSCs สามารถเข้าไปรวมกับเนื้อเยื่อได้หลายชนิด เช่น กระดูก กระดูกอ่อน ปอด^{๑๗} กล้ามเนื้อ^{๑๘} และกล้ามเนื้อหัวใจ^{๑๙} เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้เป็นอย่างมากในปัจจุบัน MSCs ที่ใช้ส่วนใหญ่ได้มาจากไขกระดูก ซึ่งเป็นแหล่งมาตรฐานที่ใช้ในทางคลินิก อย่างไรก็ตามการคัดแยก MSCs จากไขกระดูกมีข้อจำกัดหลายประการทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพของ MSCs ที่ลดลงตามอายุของผู้บริจาค^{๒๐} รวมทั้งความเจ็บปวดจากการเจาะไขกระดูก การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยได้คัดแยก MSCs จากถุงน้ำคร่ำซึ่งพบว่า MSCs ที่คัดแยกจากถุงน้ำคร่ำมีคุณสมบัติของ MSCs เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก^{๒๐, ๒๑} คือ ๑) MSCs จากแหล่งดังกล่าว มีรูปร่างยาวรีแบน ลักษณะคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ สามารถยึดติดพลาสติกของจานเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก ๒) MSCs ที่ได้จากแหล่งดังกล่าวมีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ซึ่งจำเพาะต่อ MSCs ได้แก่ CD73, CD90 และ CD105 และ

ไม่มีการแสดงออกของ CD34 และ CD45 ซึ่งเป็นโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ hematopoietic cell เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก ๓) MSCs ที่ได้จากแหล่งดังกล่าวสามารถที่จะเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมันได้ เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่คัดแยกได้จากถุงน้ำคร่ำมีคุณสมบัติของ MSCs เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก

เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานว่า MSCs มีคุณสมบัติเป็น immune-privileged cell และมีความสามารถในด้าน immunosuppression และ anti-inflammation ทำให้ MSCs สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการทำหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด เช่น NK cell, dendritic cell, T- และ B-cells^{๒๒} การศึกษาในครั้งนี้พบว่า MSCs จากถุงน้ำคร่ำสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ activated T lymphocyte ได้เช่นเดียวกับ MSCs จากไขกระดูก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษา MSCs ก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่า MSCs จากไขกระดูกมีคุณสมบัติทางด้านการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulation) ช่วยเพิ่มอัตราการ engraftment ของเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดที่ปลูกถ่ายเข้าไปในร่างกายและทำให้เซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดดังกล่าวมีความคงทน รวมทั้งช่วยทำให้อัตราการเกิด GvHD ลดลง^{๒๓}

โดยสรุปการศึกษาครั้งนี้ พบว่า MSCs จากถุงน้ำคร่ำ มีคุณสมบัติไม่แตกต่างจาก MSCs จากไขกระดูก ทั้งด้านลักษณะรูปร่างของเซลล์ การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ ความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์กระดูกเซลล์ไขมัน และที่สำคัญคือ ความสามารถในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ดังนั้น MSCs จากถุงน้ำคร่ำ จึงน่าจะเป็นแหล่งทางเลือกใหม่สำหรับการนำ MSCs มาใช้ทดแทน MSCs จากไขกระดูกในการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามการศึกษากลไกการควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในเชิงลึกยังเป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้เกิดการพัฒนาไปสู่การรักษาหรือการป้องกันการเกิด GvHD ในรูปแบบใหม่ได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ผู้วิจัยขอขอบคุณ หัวหน้างานการพยาบาลผู้คลอดและเจ้าหน้าที่ห้องคลอด โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติทุกท่าน ที่ช่วยประสานงานและช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

๑. Sivula J, Turpeinen H, Volin L, Partanen J. Association of IL-10 and IL-10R beta gene polymorphisms with graft-versus-host disease after haematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor. *BMC Immunol* 2009;10:24.
๒. Vogelsang GB, Hess AD. Graft-versus-host disease: new directions for a persistent problem. *Blood* 1994;84:2061-7.
๓. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;30:42-8.
๔. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003;101:3722-9.
๕. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439-41.
๖. Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 2004;22:649-58.
๗. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003;33:919-26.
๘. De Girolamo L, Sartori MF, Arrigoni E, Rimondini L, Albisetti W, Weinstein RL, et al. Human adipose-derived stem cells as future tools in tissue regeneration: osteogenic differentiation and cell-scaffold interaction. *Int J Artif Organs* 2008;31:467-79.
๙. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 2006;91:1017-26.
๑๐. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 2003;21:50-60.
๑๑. Arora M, Nagaraj S, Witte J, DeFor TE, MacMillan M, Burns LJ, et al. New classification of chronic GVHD: added clarity from the consensus diagnoses. *Bone Marrow Transplant* 2009;43:149-53.
๑๒. Miao Z, Jin J, Chen L, Zhu J, Huang W, Zhao J, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2006;30:681-7.
๑๓. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, et al. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol* 2007;7:11.

๑๔. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Le AD. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol* 2009;183:7787-98.
๑๕. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
๑๖. Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641-50.
๑๗. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4857-61.
๑๘. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-30.
๑๙. Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs* 2001;25:187-93.
๒๐. Le Blanc K, Ringden O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol* 2006;18:586-91.
๒๑. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28:875-84.
๒๒. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006;36:2566-73.

Abstract

Comparison of immunomodulatory effects of amnion derived mesenchymal stem cells with bone marrow derived mesenchymal stem cells

Ladda Meesuk*, Pakpoom Kheolamai**, Chairat Tantrawatpan**, Sirikul Manochantr**

* Master of Science Program in Medical Sciences (Cellular and Molecular Biology), Faculty of Medicine, Thammasat University

** Division of Cell Biology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University

Corresponding author: Sirikul Manochantr, Ph.D., Division of Cell Biology, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Medicine, Thammasat University

Introduction: Mesenchymal stem cells (MSCs) are potent sources for cell therapy in regenerative medicine because they can be isolated from various tissues, expanded, and induced into multiple lineages. Noteworthy, their immunomodulatory effects maximize the therapeutic effects of stem cells engrafted on host, making them an especially attractive choice. The main source of MSCs for most clinical and preclinical research is bone marrow. Recently, several tissues, including placenta and umbilical cord have been suggested as alternative sources of mesenchymal stem cells. However, comparative studies on biological and immunomodulatory effects of amnion derived mesenchymal stem cells (AM-MSCs) and bone marrow derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) are still poorly characterized.

Method: Examine and compare immunomodulatory function of AM-MSCs with that of BM-MSCs using co-culture system with activated T lymphocyte derived from human peripheral blood.

Results: Similar to BM-MSCs, AM-MSCs expressed MSC markers CD73, CD90, and CD105 but did not express the hematopoietic markers CD34 and CD45. AM-MSCs were able to differentiate to several mesodermallineages including adipocytes and osteoblasts. Interestingly, these cells also exhibited comparable immunomodulatory effects when they were co-cultured with activated T lymphocyte.

Discussion and conclusion: The results of the present study suggest that while both AM-MSCs and BM-MSCs have immunomodulatory effects, AM-MSCs may have additional advantage over the BM-MSCs in terms of availability. Therefore, AM-MSCs might be considered a potential source for therapeutic applications.

Key words: Immunomodulation, Mesenchymal stem cells, Bone marrow, Amnion