APPENDIX

APPENDIX A

Ethical Approval Document (Thai)

คณะอนุกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1

.....

รหัสโครงการ MTU-I-1-1/52

ชื่อโครงการวิจัย การคัดแยกและการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่ได้จากสายสะดือ, รกและเยื่อหุ้มทารก

ชื่อผู้วิจัยหลัก อาจารย์ ดร.ศิริกุล มะโนจันทร์

หน่วยงานที่รับผิดชอบ สาขาเซลล์วิทยา สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิค
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โทรศัพท์ 02-926-9767 , 086-533-3969

คณะอนุกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่ 1 ได้พิจารณาอนุมัติด้านจริยธรรมการทำวิจัยในคน ให้ดำเนินการวิจัยตามโครงการวิจัยข้างต้นได้ ตามมติที่ประชุมครั้งที่ 1/2552 เมื่อวันที่ 23 มกราคม 2552

ลงชื่อ .....
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ จักรชัย จึงธีรพานิช)
ประธานอนุกรรมการ

ลงชื่อ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุธน พรธิสาร)
อนุกรรมการและเลขานุการ

อนุมัติ ณ วันที่ .....28 เมษายน 2552.....

APPENDIX B

Patient Information Sheet (Thai)

เอกสารชี้แจงข้อมูล/คำแนะนำแก่ผู้เข้าร่วมโครงการ

(Patient Information Sheet)

ชื่อโครงการวิจัย การคัดแยกและการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่ได้จากสายสะดือ, รกและเยื่อหุ้มทารก

ชื่อผู้รับผิดชอบโครงการ ดร. ศิริกุล มะโนจันทร์, นายศุภเดช โรจไพศาล

สถานที่ติดต่อ อาคารคุณากรชั้น 8 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12121

โทรศัพท์ 02-9269767, 02-9269757-9

ผู้สนับสนุนการวิจัย

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ความเป็นมาของโครงการวิจัย

ในปัจจุบันเซลล์ต้นกำเนิดส่วนใหญ่ได้มาจากไขกระดูก ซึ่งมีจำนวนน้อยประมาณ 0.001-0.01% ของไขกระดูกที่ได้จากผู้ใหญ่ และเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากไขกระดูกจะมีจำนวนและคุณภาพแปรผันตามอายุ พบว่าอายุมากขึ้นทำให้เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้มีจำนวนและคุณภาพลดลง นอกจากนี้การนำเซลล์ต้นกำเนิดจากไขกระดูกมาใช้ต้องมีการเจาะไขกระดูก ทำให้เกิดความเจ็บปวดต่อผู้บริจาค

จากการศึกษาพบว่า สายสะดือ รก และเยื่อหุ้มทารก เป็นแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดที่ดี เนื่องจากการแยกเซลล์ต้นกำเนิดจากแหล่งดังกล่าว ทำได้สะดวกและไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดต่อผู้บริจาค

การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาคุณสมบติของเซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากสายสะดือ รก เยื่อหุ้มทารก และไขกระดูกในด้านความสามารถในการเจริญเติบโต, การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์,ความสามารถในการเจริญพัฒนา และลักษณะทางด้านภูมิคุ้มกันของเซลล์ต้นกำเนิดจากแหล่งต่างๆ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาแหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดที่ดีที่สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในเชิงการรักษาต่อไปในอนาคต

การวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยจะเก็บตัวอย่างไขกระดูกประมาณ 10 ซีซีหรือประมาณ 2 ช้อนชา จากอาสาสมัครที่บริจาคเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจากไขกระดูก หรือผู้วิจัยจะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ (สายสะดือ รก และเยื่อหุ้มทารก) ภายหลังการคลอด ซึ่งไม่มีผลไปเปลี่ยนแปลงหรือเพิ่มเติมการรักษาหรือการปฏิบัติตัวของอาสาสมัครแต่อย่างใด ตัวอย่างที่ได้รับจะถูกนำไปใช้ในการศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการ โดยอาสาสมัครไม่มีความเสี่ยงเพิ่มเติมเมื่อเข้าร่วมการวิจัย ตัวอย่างไขกระดูก หรือ ตัวอย่างเนื้อเยื่อ (สายสะดือ รก และเยื่อหุ้มทารก) ส่วนที่เหลือภายหลังการวิจัยจะถูกนำไปทิ้งในภาชนะสำหรับทิ้งขยะติดเชื้อ เพื่อรอการกำจัดพร้อมกับขยะติดเชื้ออื่นๆ ต่อไป

ความเสี่ยงในการเก็บตัวอย่าง

อาสาสมัครไม่มีความเสี่ยงเพิ่มเติมจากการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิจัย หากมีข้อมูลเพิ่มเติมทั้งด้านประโยชน์และโทษที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยนี้ ผู้วิจัยจะแจ้งให้ทราบโดยไม่ปิดบังอย่างรวดเร็ว

การเก็บข้อมูลของอาสาสมัคร

ข้อมูลส่วนตัวของอาสาสมัครจะถูกเก็บรักษาไว้ ไม่เปิดเผยต่อสาธารณะเป็นรายบุคคล แต่จะรายงานผลการวิจัยเป็นข้อมูลส่วนรวม ข้อมูลของอาสาสมัครเป็นรายบุคคลอาจมีคณะบุคคลบางกลุ่มเข้ามาตรวจสอบได้ เช่น ผู้ให้ทุนวิจัย, สถาบัน หรือองค์กรของรัฐที่มีหน้าที่ตรวจสอบ, คณะกรรมการจริยธรรมฯ เป็นต้น

สิทธิของอาสาสมัครในการถอนตัวออกจากโครงการ

อาสาสมัครที่เข้าร่วมการวิจัยมีสิทธิ์ถอนตัวออกจากโครงการวิจัยเมื่อใดก็ได้ โดยไม่ต้องแจ้งให้ทราบล่วงหน้า และการไม่เข้าร่วมการวิจัยหรือถอนตัวออกจากโครงการวิจัยนี้จะไม่มีผลกระทบต่อการบริการและการรักษาที่สมควรจะได้รับแต่ประการใด

โครงการวิจัยนี้ได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ (02)9269704-6

APPENDIX C

Informed Consent Form (Thai)

หนังสือยินยอมโดยได้รับการบอกกล่าวและเต็มใจ

(Informed Consent Form)

ชื่อโครงการวิจัย การคัดแยกและการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ที่ได้จากสายสะดือ, รกและเยื่อหุ้มทารก

ชื่ออาสาสมัคร.....อายุ.....ปี

คำยินยอมของอาสาสมัคร

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว ซึ่งผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบัง ซ่อนเร้น จนข้าพเจ้าพอใจ และเข้าร่วมโครงการนี้โดยสมัครใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ ถ้าข้าพเจ้าปรารถนาโดยไม่เสียสิทธิในการรักษาพยาบาลที่จะเกิดขึ้นตามมาในโอกาสต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่า จะเก็บข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปที่เป็นสรุปผลการวิจัย (หรือข้าพเจ้าอนุญาตให้ผู้วิจัยเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องได้ตามที่ผู้วิจัยเห็นสมควร) การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็นด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้น

ผู้วิจัยรับรองว่าหากเกิดอันตรายใดๆ ที่มีสาเหตุจากการวิจัยดังกล่าว ข้าพเจ้าจะได้รับการรักษา พยาบาลโดยไม่คิดมูลค่าเพิ่ม และจะได้รับการชดเชย ตลอดจนเงินทดแทนความพิการที่อาจเกิดขึ้นและตามความเหมาะสมดังกล่าว

ข้าพเจ้ายินยอมให้ผู้กำกับดูแลการวิจัย ผู้ตรวจสอบ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ และคณะกรรมการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมยา สามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้า เพื่อเป็นการยืนยันถึงขั้นตอนโครงการวิจัยทางคลินิกโดยไม่ล่วงละเมิดเอกสิทธิ์ ในการปิดบังข้อมูลของการสมัครตามกรอบที่กฎหมายและกฎระเบียบได้อนุญาตไว้

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการ และได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม……ผู้ยินยอม

(.....)

ลงนาม……พยาน

(.....)

ลงนาม……พยาน

(.....)

ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ แต่ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้แก่ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดีแล้ว และข้าพเจ้าจึงลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม……ผู้ยินยอม

(.....)

ลงนาม……พยาน

(.....)

ลงนาม……พยาน

(.....)

คำอธิบายของแพทย์หรือคณะผู้วิจัย

ข้าพเจ้าได้อธิบายรายละเอียดของโครงการ ตลอดจนประโยชน์และข้อเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นแก่ผู้ยินยอมตนให้ทำวิจัยทราบแล้วอย่างชัดเจนโดยไม่มีสิ่งใดปิดบังซ่อนเร้น

ลงชื่อ……(แพทย์หรือคณะผู้วิจัย)

(……)

APPENDIX D

Reagents and Instrumentation

Reagents

Ficoll-Hypaque solution	(GE Healthcare Bio-science AB, Sweden)
IsoPrep	(Robbins Sciencetific Corporation,USA)
2.5%Trypsin-EDTA (Cat No.17-160E)	(GibcoBRL, NY)
Penicillin/Streptromycin	(GibcoBRL, NY)
Fetal bovine serum (Lot No.0000089602)	(BioWhittaker, USA)
Trypan blue	(GibcoBRL, NY)
5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE)	(Molecular Probes, Invitrogen, USA)
L-glutamine	(GibcoBRL, NY)
7-amino-actinomycin D (Apoptosis detection kit) (Cat No.559763)	(BD Bioscience, USA)
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	(Sigma-Aldrich, St.Louis)
Oil Red O	(Sigma-Aldrich, St.Louis)

Monoclonal antibodies

FITC-conjugated anti-mouse IgG1 antibody	(BD Bioscience, USA)
FITC-conjugated anti-human CD45 antibody	(BD Bioscience, USA)
FITC-conjugated anti-human CD90 antibody	(AbD Serotec, USA)
FITC-conjugated anti-human CD105 antibody	(AbD Serotec, USA)
PE-conjugated anti-mouse IgG2a antibody	(BD Bioscience, USA)
PE-conjugated anti-human CD34 antibody	(BD Bioscience, USA)
PE-conjugated anti-human CD73 antibody	(BD Bioscience, USA)
PE-conjugated anti-human CD106 antibody	(AbD Serotec, USA)

Media

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	
(Cat No.31600-034)	(GibcoBRL, NY)
RPMI 1640 medium	(GibcoBRL, NY)
NH AdipoDiff Medium	(MACS Media, USA)
NH OsteoDiff Media	(MACS Media, USA)

Instrumentation

BD FACScalibur™	(Becton Dickinson, USA)
CellQuest®solfware	(Becton Dickinson, USA)
Inverted microscopy CKX41	(Olympus, Japan)
Light microscopy CX31	(Olympus, Japan)
Class II biological safety carbinets	(NuAire, USA)
Water-jecketed incubator	(Forma scientific, USA)
Sunyo CO_2 incubator	(Sunyo, Japan)
Vip series -86 °C	(Sunyo, Japan)
Sunyo Biomedical Freezor	(Sunyo, Japan)
Model J-6B centrifuge	(Backman, USA)
Allegra™ 6R Centrifuge	(Beckman, USA)
50 pH Meter	(Beckman, USA)
Water Bath	(Memment, USA)
CELL-DYN® 1800 system	(Abbott, Germany)
MC1 Laboratory LC 3200 D	(Sartorious AG, Germany)
T25 Cell Culture Flask	(Corning Incorporated, USA)
T75 Cell Culture Flask	(Corning Incorporated, USA)
T165 Cell Culture Flask	(Corning Incorporated, USA)
24 well Cell Culture Plate	(Corning Incorporated, USA)
96 well Cell Culture Plate	(Corning Incorporated, USA)

Preparation of Reagents

10X Phosphate buffered saline (PBS)

NaCl	38.25	g	
Na_2HPO_4	4.97	g	
KH_2PO_4	2.04	g	
Distilled water to	500	ml	Adjust pH 7.4

The solution was sterile by autoclaving for 15 min at 121 °C, 15lb/square inches and stored at 4 °C.

1X Phosphate buffered saline (PBS)

10X PBS	50	ml
Distilled water to	500	ml

The solution was sterile by autoclaving for 15 min at 121 °C, 15lb/square inches and stored at 4 °C.

10 mM EDTA

EDTA	1.861	g
Distilled water to	500	ml

The solution was sterile by autoclaving for 15 min at 121 °C, 15lb/square inches and stored at 4 °C.

0.5% Trypsin/EDTA

2.5% trypsin	10	ml
10 mM EDTA	5	ml
1X PBS to	50	ml

The solution was mixed and stored at 4 °C.

1% Paraformaldehyde

16% Paraformaldehyde	200	µl
1X PBS	1800	µl

The solution was mixed and stored at 4 °C.

1X Penicillin/Streptomycin

10X Penicillin/Streptomycin	5	ml
1X PBS	45	ml

The solution was mixed and stored at 4 °C.

DMEM +10%FBS

FBS	50	ml
1X Penicillin/Streptomycin	5	ml
L-glutamine	2.5	ml
DMEM solution to	500	ml

The solution was mixed and stored at 4 °C.

APPENDIX E

Experimental Procedures

Isolation and culture of MSCs from bone marrow

Reagents:

DMEM+10%FBS

1X Phosphate buffered saline

Ficoll-Hypaque solution

Procedure

1. Bone marrow (40 ml) obtained from the iliac crest was collected in 50 ml Falcon tube containing 2 ml heparin (LEO 5,000 i.u./u.i./ml).

2. Bone marrow was dilute 1:1 phosphate-buffered saline (1X PBS) and carefully loaded onto Ficoll-Hypaque solution

3. Centrifugation at 100 g for 30 minutes at 20 °C.

4. Mononuclear cells (MNCs) were removed from the inter phase and washed twice with PBS + 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin.

5. Cell counter were performed using an automated all analyzer (Cell-DYN®1800).

6. BM-derived MNCs were got in culture at a density of $1X10^6$ cells/cm^2 into T25 culture flask in DMEM containing 2 mM L-glutamine (Gibco), 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin.

7. Incubation at 37 °C in humidified at containing 5% carbon dioxide.

8. Nonadherent cells were removed and fresh medium was added to the flask every 3 to 4 days.

9. Fibroblastoid cells were recovered between days 7 through 12 after initiated plating using 0.25% trypsin/ 2 mM EDTA (Gibco). Recovered alls were replated at a density of $1X10^4$ cells/cm^2 as passage 1 cells and there after.

Isolation and culture of MSCs from Umbilical cords

Reagents:

DMEM+10%FBS

1X Phosphate buffered saline

0.5% trypsin-EDTA

Procedure

1. Umbilical lengths:2-4 cm were obtained after normal term delivery.

2. Human umbilical cords in filtered phosphate buffered saline (1X PBS) containing 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin.

3. The umbilical cord were rinsed with 1X PBS containing 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and minced into pieces on 1-2 mm^3 in size.

4. The tissue was washed with 1X PBS containing 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin.

5. After centrifugation at 100 g for 5 minute, 0.5% trypsin-EDTA was added to the tube up to a total volume of 5 ml. Tube was incubated at 37 °C for 30 min,

6. The remaining tissue was washed with 1X PBS containing 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin. Then centrifuged at 100 g for 5 min.

7. The tissue pellet was resuspended in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and seeded in noncoated culture flask.

8. Culture was maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2, with a change of culture medium every 3 to 4 days.

Isolation and culture of Wharton's jelly

Reagents:

DMEM+10%FBS

1X Phosphate buffered saline

0.5% trypsin-EDTA

Procedure

1. Umbilical cords lengths: 5-10 cm were obtained after birth and stored in PBS containing 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin.

2. After removal of blood vessels, the mesenchymal tissue was scraped off from the Wharton's jelly with a scalpel.

3. After that Wharton's jelly tissue was washed with 1X PBS, containing 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and then centrifuged at 100 g for 5 min.

4. The tissue was treated with 0.5% trypsin-EDTA for 30 min at 37°C.

5. After, washing with 1X PBS containing 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, the pellet was resuspended in DMEM supplement with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and seeded in noncoated culture flask.

6. Culture was maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2, with a change of culture medium every 3 to 4 days.

Isolation and culture of MSCs from placenta

Reagents:

DMEM+10%FBS

1X Phosphate buffered saline

0.5% trypsin-EDTA

Procedure

1. Deciduas basalis tissue (3x3x1 cm) was macroscopically dissected from the central region of the maternal-facing surface of the placenta under aseptic conditions.

2. The placental tissue was minced into small piece and extensively washed with PBS containing 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin.

3. The tissue was digested with 0.5% trypsin-EDTA for 30 min at 37°C.

4. The tissue pellet was washed 1X PBS containing 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and then centrifuged at 103 g for 5 min.

5. The pellet were resuspended in DMEM supplement with 2mM L-glutamine,10% FBS , 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin seeded in noncoated culture flask.

6. Culture was maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2, with a change of culture medium every 3 to 4 days.

Isolation and culture of MSCs from amnion

Reagents:

DMEM+10%FBS

1X Phosphate buffered saline

0.5% trypsin-EDTA

Procedure

1. Term amnion (diameter~ 5 cm) was obtained by removing it from the fetal membranes after normal term delivery.

2. Term amnion in filtered phosphate buffered saline (1X PBS) containing 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin.

3. The amnion were rinsed with 1X PBS containing 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and minced into pieces on 1-2 mm^3 in size.

4. The tissue was washed with PBS containing 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin.

5. After centrifugation at 103 g for 5 minute, 0.5% trypsin-EDTA was added to the tube up to a total volume of 5 ml. Tube was incubated at 37 °C for 30 min, well agitation them centrifuged at 100 g for 5 min to remove large particular matter.

6. The remaining tissue was washed with 1X PBS containing 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin. Then centrifuged at 103 g for 5 min.

7. The tissue pellet was resuspended in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and seeded in noncoated culture flask, culture was maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2, with a change of culture medium every 3 to 4 days.

Growth kinetics

Reagents:

DMEM+10%FBS

1X Phosphate buffered saline

0.5% trypsin-EDTA

Procedure

1. MSCs derived from umbilical cord, Wharton's jelly, placenta, amnion and bone marrow were trypsinized.

2. $6x10^3$ cells passage 2-5) were seeded in 24-well plate with DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin.

3. The number of cells was counted in triplicate cultures every 2 days over 8 days.

Immunophenotyping of cultured cells

Reagents:

FITC-conjugated anti-mouse IgG1 antibody	(BD Bioscience, USA)
FITC-conjugated anti-human CD45 antibody	(BD Bioscience, USA)
FITC-conjugated anti-human CD90 antibody	(AbD Serotec, USA)
FITC-conjugated anti-human CD105 antibody	(AbD Serotec, USA)
PE-conjugated anti-mouse IgG2a antibody	(BD Bioscience, USA)
PE-conjugated anti-human CD34 antibody	(BD Bioscience, USA)
PE-conjugated anti-human CD73 antibody	(BD Bioscience, USA)
PE-conjugated anti-human CD106 antibody	(AbD Serotec, USA)

Procedure

1. Primary culture (passage 2-5) were washed with 1X PBS and treated with 0.25% trypsin-EDTA at 37 ^{o}C for 5 min.

2. The harvested cells were washed twice with 1X PBS and fixed for 15 min with 1% parafoemadehyde in 1X PBS.

3. After washing twice with 1X PBS, $4X10^5$ cell in 50 µl 1X PBS were incubated for 30 min at 4 °C in the dark with 10 µl of Fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin(PE)-conjugated antibodies.

4. The labeled cells were acquired and analyzed using flow cytometer (FACS caliber, Becton Dickinson) and Cell Quest software

Adipogenic Differentiation Testing

Reagents:

NH AdipoDiff Medium

1X Phosphate buffered saline

0.5% Oil Red O

Distilled water

40% formalin

Procedure

1. Culture-expanded MSCs passage 3 from umbilical cord, Wharton's jelly, placenta, amnion and bone marrow were seeded at a density of $8X10^3$ cell/cm^2 in 6-well plate and incubated in 1.5 ml NH AdipoDiff Medium.

2. Cells were culture at 37°C in an incubator with 5% CO_2 at saturating humidity.

3. The medium was replaced every 3 days.

4. After 3 weeks of culture, cells were washed with 1X PBS and fixed with 40% formalin vapor for 10 min at room temperature.

5. After that the cells were washed twice with distilled water and stained with 0.5% Oil Red O in 6% isopropanol for 20 min at room temperature.

6. Cells were washed twice with distilled water.

7. The positive cells were observed under inverted microscope (Olympus CKX41).

Osteogenic Differentiation Testing

Reagents:

NH OsteoDiff Media

1X Phosphate buffered saline

10% formalin-methanol

Substrate solution (1 mg/ml sodium naphthyl, 1 mg/ml fast blue RR acid in propanidial buffer pH 9.75)

Distilled water

Procedure

1. Culture-expanded MSCs passage 3 from umbilical cord, Wharton's jelly, placenta, amnion and bone marrow were seeded at a density of $5X10^3$ cell/cm^2 in 6-well plate and incubated in NH OsteoDiff Media

2. Cells were culture at 37 °C in an incubator with 5% CO_2 at saturating humidity.

3. The medium was replaced every 3 days.

4. After 10 days of culture, cells were washed with 1X PBS and fixed with 10% formalin-methanol for 5 min at -20 ^oC.

5. To visualize osteogenic differentiation, cell were stained for alkaline phosphatase (AP) activity. For AP expression cells were washed with PBS and incubated for 10 min with substrate solution (Sodium Naphthyl 50 mg, fast blue RR 50 mg, Propanidial buffer pH 9.75 50 ml), usually in the formation of a brown reaction product.

6. The positive cells were observed under inverted microscope (Olympus CKX41).

Labeling Responder cells with CFSE

Reagents:

0.5 uM CFSE

RPMI 1640 medium

Procedure

1. Peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs) were labeled with 0.5 uM CFSE continuous shack for 10 min at 37 °C.

2. After washing the cells 3 times with 1 ml RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS.

3. They were resuspended in the same medium and at 4 ^{o}C in dark room until processing.

Mixed Lymphocyte Reaction Assays (MLR assays)

Reagents:

0.5 uM CFSE

RPMI 1640 medium

7-aminoactinomycin D (7-ADD)

Procedure

1. $3X10^6$ cell/ml stimulator cells (Irradiated allogenic PB-MNCs) were plated on 24-well plate containing $1X10^6$ cells/ml CSFE-labeled responder PB-MNCs in RPMI-1640 medium containing 10%FBS

2. $1X10^6$ cells/ml effectors cells (human MSCs derived from umbilical cord, Wharton's jelly, placenta, amnion and bone marrow) were also plate into the same wells.

3. Control experiments included allogenic PB-MNCs use as stimulators with no MSCs added.

4. After 5 days of MLR culture, the cells were harvested and washed twice with PBS supplemented with 1%FBS. T-cells were resuspended in 1X PBS supplemented with 1%FBS. 7-aminoactinomycin D (7-ADD) staining was used to exclude dead cells, and analysis of cell division was performed using flow cytometer (FACS caliber, Becton Dickinson) and Cell Quest software. All experiments were performed at least in triplicate.

VITA

NAME Mr. Supadej Rojphaisarn

DATE OF BIRTH June 1, 1973

EDUCATION Bachelor of Science (Nursing), Phabudabath Nursing College, Ministry of Public Health, Thailand.

Master of Science (Medical Science), Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

RESEARCH GRANT

- Thailand Research Fund (Senior Research Scholar to Prof. Surapol Issaragrisil, grant No RTA 488-0007)
- Commission on Higher Education (grant No. CHE-RES-G-49)
- Faculty of Medicine, Thammasat University (Research Scholar to Dr. Sirikul Manochantr)