

# NGHIÊN CỨU BIỆT HÓA IN VITRO TẾ BÀO GỐC TRUNG MÔ MÀNG DÂY RỐN NGƯỜI THÀNH TẾ BÀO XƯƠNG

Đỗ Minh Trung\*; Đặng Thị Thu\*\*; Lê Văn Đông\*

## TÓM TẮT

Nghiên cứu tiến hành nhằm mục tiêu nuôi cấy tăng sinh và cảm ứng biệt hóa *in vitro* tế bào gốc (TBG) trung mô màng dây rốn trẻ sơ sinh thành TBX. Phân lập TBG trung mô được từ màng bao dây rốn bằng kỹ thuật nuôi cấy mô theo phương pháp của Phan Toàn Thắng. Cấy chuyển tăng sinh tế bào, khi thể hệ cấy chuyển thứ tư mọc kín 60 đến 80% bề mặt đĩa nuôi cấy, tiến hành cảm ứng biệt hóa tạo tế bào xương (TBX) bằng môi trường có bổ sung dexamethasone,  $\beta$ -glycerolphosphate, axit ascorbic. Theo dõi thay đổi hình thái tế bào được trong quá trình biệt hóa. Sau 21 ngày biệt hóa, các tế bào được nhuộm với thuốc nhuộm alizarin red 1% để phát hiện đám canxi tích tụ trong bào tương tế bào. Định lượng lượng canxi tích tụ bằng hệ thống phân tích hóa sinh tự động. Kết quả bước đầu cho thấy, các TBG trung mô thay đổi hình thái theo hướng thành TBX và có lắng đọng canxi nội bào.

\* Từ khóa: Trung mô màng dây rốn; Biệt hóa tế bào gốc; Tế bào xương.

## IN VITRO OSTEOGENESIS OF HUMAN UMBILICAL CORD LINING MESENCHYMAL STEM CELL

### SUMMARY

*This research aimed to do in vitro proliferation and differentiation of the human umbilical cord lining membrane derived mesenchymal stem cells (MSC) to bone cell. The MSC was isolated from cord lining membrane by tissue culture according to Phan's TT method. The cell was then sub-cultured for cell proliferation until the 4<sup>th</sup> passage reached 60 to 80% confluence. The differentiation was induced by adding osteoblast induction medium that contains dexamethasone,  $\beta$ -glycerolphosphate, ascorbic acid. The morphology of the cell was monitored during the differentiation process. After 21 days, the cell was stained with 1% alizarin red to reveal the calcium accumulation in cytoplasm of the cell. The amount of calcium accumulation was also quantified by routine biochemistry test. Preliminary results showed that the MSC has changed its morphology toward the bone cell with calcium accumulation in cytoplasm.*

\* Key words: Umbilical cord lining mesenchymal stem cell; Stem cell differentiation; Bone cell.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào gốc (TBG) là tế bào có khả năng biệt hoá thành nhiều loại tế bào khác để thay thế cho các tế bào bị mất đi do già và chết tự nhiên hay do chấn thương vì nhiều nguyên nhân khác nhau. Vì vậy, có thể sử dụng TBG để tạo ra tế bào mới thay thế cho các tế bào bị tổn thương hoặc mất chức năng, đem lại triển vọng trong điều trị một số bệnh nan y. Trong số các loại TBG, TBG trung mô có khả năng tăng sinh mạnh và có tiềm năng biệt hóa thành nhiều loại tế bào khác nhau như TBX, tế bào thần kinh, tế bào mỡ, tế bào cơ tim... Trước đây, TBG trung mô dùng cho nghiên cứu và điều trị chủ yếu, được phân lập từ tủy xương, sau đó có nhiều công trình nghiên cứu đã tìm ra được nhiều nguồn TBG trung mô khác có khả năng cung cấp dồi dào hơn tủy xương như: mô mỡ, màng ối, màng bao dây rốn...[1, 2].

Dây rốn trẻ sơ sinh là nguồn cung cấp TBG trung mô có nhiều ưu điểm cả về phương diện kỹ thuật cũng như đạo đức. Nhiều nghiên cứu phôi thai học và kháng nguyên bạch cầu người (Human Leukocyte Antigen: HLA) của tế bào từ dây rốn cho thấy chúng có nguồn gốc từ thai nhi. Nghiên cứu về TBG cho thấy, dây rốn có nhiều loại TBG bao gồm TBG tạo máu, TBG biểu mô, TBG trung mô, TBG nội mô chứa trong máu dây rốn, trong lớp gel Wharton hay trong lớp màng bao dây rốn. Các TBG này có thể dùng ngay để chữa bệnh hoặc làm nguyên liệu để nghiên cứu biệt hoá, tạo ra các chế phẩm tế bào, phục vụ cho chữa bệnh hay phát triển thuốc [4, 5, 6, 7, 8, 9].

Ghép TBG từ tủy xương tự thân đã được dùng trên lâm sàng để điều trị gãy xương lâu liền và khớp giả. Khi được tiêm vào ổ xương gãy, tại đây TBG trung mô của tủy xương biệt hoá in vivo thành các TBX, tái tạo lại ổ gãy xương. Tuy nhiên, nguồn TBG ở tủy xương còn ít khó khăn về số lượng tế bào và quy trình thu thập tế bào tương đối phức tạp. Nhằm tăng hiệu quả điều trị tái tạo xương, TBG cần được tăng sinh về số lượng và biệt hóa in vitro thành lượng lớn tế bào tạo xương trước khi được cấy ghép vào ổ xương gãy... Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nuôi cấy tăng sinh và biệt hóa in vitro TBG trung mô màng dây rốn người thành TBX làm tiền đề cho nghiên cứu ứng dụng loại TBG đặc biệt này vào điều trị trong tương lai.

## **ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **1. Đối tượng nghiên cứu.**

Dây rốn trẻ sơ sinh được sản phụ sinh con tại Bệnh viện khu vực Hà Nội tình nguyện hiến cho mục đích nghiên cứu. Tiêu chuẩn tuyển chọn: sản phụ > 18 tuổi, có tiền sử khỏe mạnh và xét nghiệm sàng lọc không bị các bệnh nhiễm trùng, bao gồm: nhiễm virút viêm gan B, C, HIV, CMV và vi khuẩn giang mai; trẻ sinh một và không có tai biến trong quá trình sinh đẻ.

Môi trường sinh phẩm, hóa chất và vật tư tiêu hao: môi trường DMEM: F12 high glucose, FBS, trypsin-EDTA, antibiotic-antimycotic, do hãng Gibco-Invitrogen, cung cấp. Dexamethasone,  $\beta$ -glycerolphosphate, axit L-ascobic (AsA), alizarin red, DMSO do hãng Sigma cung cấp; đĩa nuôi cấy 100 x 20 mm, Plate 6 giếng, 24 giếng do hãng Corning cung cấp; hóa chất vật tư tiêu hao khác đều đảm bảo đạt tiêu chuẩn phân tích.

Máy móc thiết bị chính: tủ ấm CO<sub>2</sub> (Nuair), tủ hút Bioair, kính hiển vi đảo ngược (Leica), hệ thống xét nghiệm hóa sinh tự động Synmex được trang bị tại Trung tâm Nghiên cứu Y Sinh Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

### **2. Phương pháp nghiên cứu.**

*\* Phân lập và nuôi cấy tăng sinh TBG trung mô màng dây rốn:*

Phân lập và định danh TBG trung mô màng dây rốn được theo quy trình của Phan Toàn Thắng và CS có cải tiến phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [3, 8]. Dây rốn của trẻ sơ sinh được xử lý làm sạch máu, phẫu tích bóc tách lớp màng bao dây rốn, cắt thành miếng nhỏ và nuôi cấy trong đĩa nhựa có chứa môi trường DMEM: F12, bổ sung 10% FBS, 1% kháng sinh, để ở nhiệt độ 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, sau 3 ngày thay môi trường một lần. Nuôi cấy với chế độ trên cho các tế bào tiếp tục phát triển tới khi chiếm 60 - 80% bề mặt nuôi cấy, tiến hành thu hoạch và cấy chuyển tế bào tiếp tục tăng sinh và thu hoạch tế bào sau cấy chuyển lần 4.

*\* Biệt hóa in vitro TBG trung mô thành TBX:*

Biệt hóa TBG trung mô thành TBX, sử dụng tế bào ở lần cấy chuyển thứ 4. Khảo sát thay đổi thành phần môi trường cơ bản DMEM-F12 Ham glutamax, FBS và bổ sung các chất cảm ứng biệt hóa tế bào: 100 nM dexamethasone, 0,25 mM axit L-ascobic và 100 mM  $\beta$ -glycerolphosphate (bảng 1).

*Bảng 1: Thành phần môi trường biệt hóa được khảo sát.*

Môi trường BH1	Môi trường BH2	Môi trường BH3	Môi trường BH4	Môi trường BH5
----------------	----------------	----------------	----------------	----------------

- DMEM - 1 $\mu$ M dexamethasone - 10 $\mu$ M $\beta$ -glycerol phosphate - 0,25 mM ascobic axit - 1% kháng sinh	- DMEM - 10% FBS - 1 $\mu$ M dexamethasone - 10 $\mu$ M $\beta$ - glycerol phosphate - - 0,25mM ascobic acid - 1% kháng sinh	- F12 + DMEM (1:1) - 1 $\mu$ M dexamethasone - 10 $\mu$ M $\beta$ -glycerol phosphate - - 0,25mM axit ascobic - 1% kháng sinh	- F12 + DMEM (1:1) - 10% FBS - 1 $\mu$ M dexamethasone - 10 $\mu$ M $\beta$ -glycerol phosphate - - 0,25mM axit ascobic - 1% kháng sinh	- Basal medium - Osteogenesis - 1% kháng sinh
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------

Sau khi lựa chọn được môi trường cơ bản cho biệt hóa, để môi trường có thành phần bổ sung cho cảm ứng biệt hóa thích hợp nhất, tiến hành khảo sát thay đổi nồng độ dexamethasone,  $\beta$ -glycerolphosphate ( $\beta$ -GP), axit L-ascobic (AsA). Mỗi thành phần được khảo sát ở nồng độ khác nhau, các thành phần và yếu tố khác được giữ cố định, môi trường dùng làm đối chứng là môi trường nuôi cấy TBG trung mô không bổ sung các thành phần biệt hóa.

*Bảng 2: Nồng độ chất cảm ứng biệt hóa được khảo sát.*

Dexamethasone (nM)	Đối chứng	1	10	100	500	1000
$\beta$ -glycerolphosphate (mM)	Đối chứng	1	5	10	20	30
L- axit ascobic (mM)	Đối chứng	0,005	0,05	0,25	0,50	1

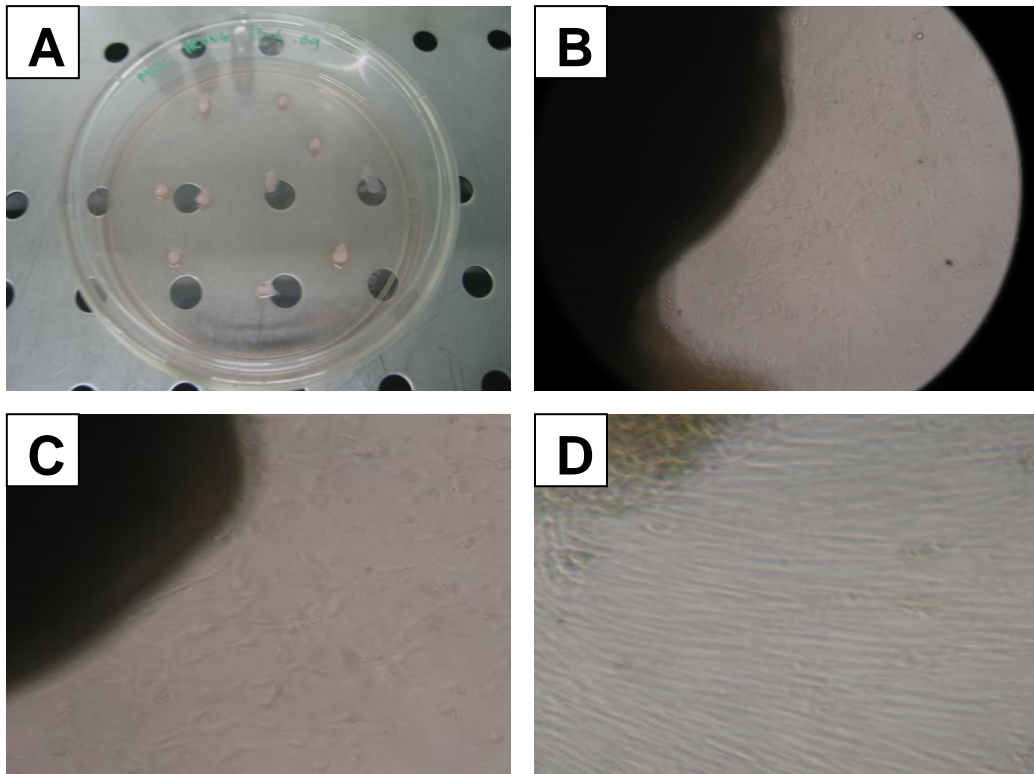
\* Kiểm tra sự tích lũy canxi của tế bào sau biệt hóa:

Canxi xuất hiện trong TBX biệt hóa từ TBG màng dây rốn được đánh giá thông qua khả năng bắt màu của canxi với thuốc nhuộm alizarin red và xét nghiệm định lượng canxi bằng kỹ thuật phân tích hóa sinh thường quy. Tế bào sau khi nuôi cấy biệt hóa được 21 ngày, loại bỏ môi trường biệt hóa cũ khỏi giếng nuôi cấy, rửa tế bào với D-PBS, cố định tế bào bằng formalin 4% trong 30 phút. Rửa 2 lần với nước cất và nhuộm tế bào bằng alizarin red 2%, thời gian 2 - 3 phút. Rửa lại bằng nước cất 3 lần, hình ảnh tế bào có đám lắng đọng canxi được quan sát trên kính hiển vi soi ngược. Song song với nhuộm tế bào với thuốc nhuộm alizarin red, phá vỡ tế bào bằng siêu âm, ly tâm và định lượng canxi trong dịch nổi bằng máy phân tích hóa sinh Sysmex.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

### 1. Nuôi cấy tăng sinh TBG trung mô.

Các mẫu dây rốn sau khi thu thập và xử lý, sau 2 ngày và 4 ngày nuôi cấy mô, mẫu mô bắt đầu bám dính trên bề mặt đĩa nuôi. Đến ngày thứ 6, một số mẫu mô bám dính có hiện tượng co nhỏ lại và bắt đầu xuất hiện tế bào bò ra từ miếng mô, bám dính vào bề mặt đĩa nuôi nhưng chưa có hình dạng hình thoi đặc trưng. Đến ngày thứ 10, đa số vị trí tế bào phát triển, trải rộng trên bề mặt nuôi cấy và có hình dạng đặc trưng là tế bào hình thoi, kích thước khoảng 20 $\mu$ m, có nhiều nhánh bào tương. Đến ngày thứ 14, tế bào phát triển đạt mật độ 70-80% bề mặt nuôi cấy. Các miếng mô được chuyển sang nuôi cấy ở đĩa nuôi cấy mô mới và những tế bào còn lại trong đĩa nuôi cấy tiếp tục nuôi với môi trường nuôi cấy mới cho đến khi tế bào phát triển phủ kín bề mặt đĩa nuôi cấy.



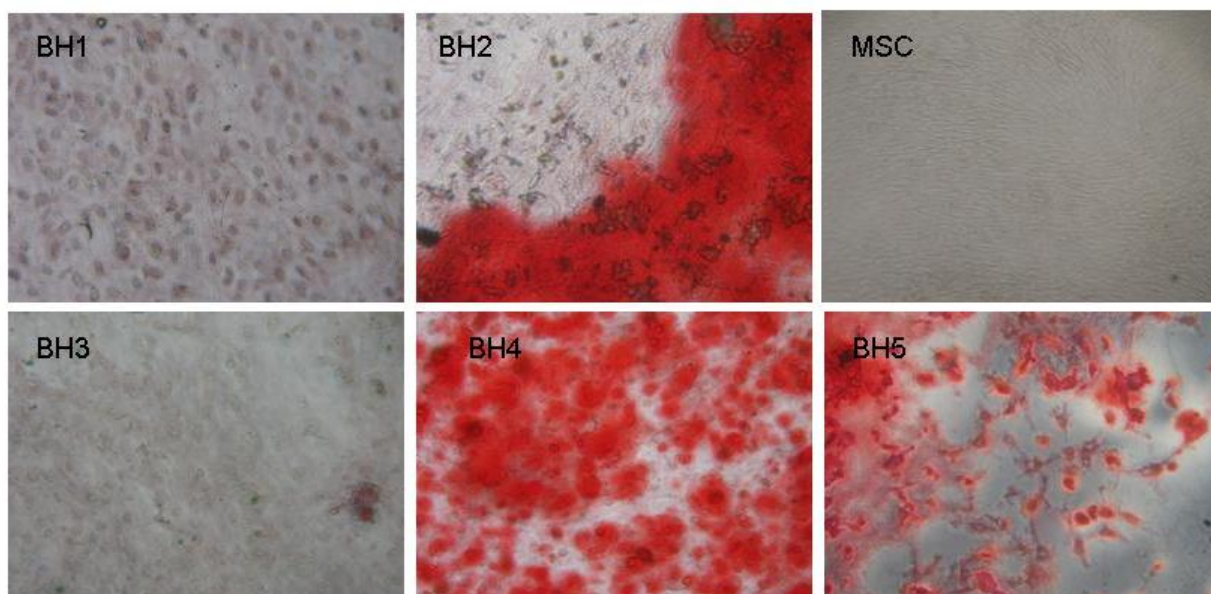
Hình 1: Kết quả phân lập, nuôi cấy tăng sinh TBG.

(A) các miếng màng dây rốn nuôi cấy; (B) tế bào bò từ miếng màng dây rốn sau 6 ngày nuôi cấy; (C) sau 10 ngày nuôi cấy; (D) sau 14 ngày nuôi cấy.

Tế bào khi đã mọc kín bề mặt đĩa nuôi cấy, thu hoạch và cấy chuyển ra nhiều đĩa mới. Khi mới cấy chuyển, tế bào trôi lơ lửng trong môi trường nuôi cấy, không có hình dạng đặc trưng. Sau 2 ngày, tế bào bám dính trên bề mặt nuôi cấy, có hình dạng đặc trưng và bắt đầu tăng sinh. Đến ngày thứ 4, tế bào đã trải rộng trên bề mặt nuôi cấy. Sau 8 ngày, các tế bào phát triển đạt mật độ 60 - 80% bề mặt đĩa nuôi được sử dụng cho biệt hóa tế bào thành TBX.

## 2. Kết quả khảo sát môi trường cơ bản để biệt hóa TBG trung mô thành TBX.

Tế bào cấy chuyển đến passage thứ 4, có khả năng bám dính và tăng sinh trên bề mặt nuôi cấy. Tế bào phát triển đạt 60 - 80% diện tích bề mặt, hút bỏ môi trường cũ, bổ sung môi trường biệt hóa. Môi trường biệt hóa được khảo sát với môi trường cơ bản là nuôi cấy TBG trung mô có bổ sung và thay đổi một số thành phần và cố định các yếu tố khác, nhằm lựa chọn được môi trường thích hợp cho biệt hóa TBG trung mô thành TBX.



Hình 2: Hình ảnh tế bào biệt hóa sau 21 ngày nuôi cấy được nhuộm bằng alizarin red.

MSC: TBG trung mô (nhóm chứng không biệt hóa); BH1; BH2; BH3; BH4, BH5: Tế bào nuôi cấy trong môi trường có thành phần biệt hóa khác nhau.

Môi trường TBG trung mô được khảo sát thay đổi các yếu tố, DMEM, F12, 10% FBS, cố định 1% kháng sinh và yếu tố cảm ứng biệt hóa thành tế bào tạo xương: 0,1  $\mu\text{M}$  dexamethasone, 0,25 mM L- axit scorbic và 10  $\mu\text{M}$   $\beta$ - glycerol-phosphate. Kết quả sau 21 ngày nuôi cấy, đánh giá sự biệt hoá tế bào thông qua khả năng tích tụ của canxi trong bào tương nhờ phương pháp nhuộm với thuốc nhuộm alizarin red. Tế bào nuôi cấy biệt hóa trong môi trường BH1: có bổ sung yếu tố cảm ứng biệt hóa, sử dụng môi trường cơ bản là DMEM, nhưng không bổ sung FBS; môi trường BH3: bổ sung các yếu tố cảm ứng biệt hóa, sử dụng môi trường cơ bản là DMEM:F12, nhưng không bổ sung FBS, tế bào không bắt màu với alizarin red, điều này chứng tỏ các tế bào này không có lắng đọng canxi trong tế bào chất. Với các môi trường BH2, BH4, BH5, tế bào bắt đầu chuyển từ dạng dài sang hình dạng đặc trưng của TBX là dạng tròn và cuối cùng là hình hạt đậu (osteoblast). Khi được cảm ứng biệt hóa, hầu như tất cả tế bào đều ngừng phân chia. Đây cũng là một dấu hiệu cho thấy tế bào gốc đã biệt hóa thành tế bào chức năng. Khi nhuộm với alizarin red, tế bào tròn hay hình hạt đậu bắt màu đỏ cam. Màu đỏ cam là phức hợp của thuốc nhuộm với ion calcium hiện diện trong tế bào chất (tính chất đặc trưng của nguyên bào xương). Tế bào bắt màu với alizarin red ở môi trường BH2 so với tế bào ở môi trường BH4 và BH5 không nhiều. Tế bào ở môi trường BH4, BH5 gần như toàn bộ bắt màu với alizarin red, tuy nhiên tế bào ở môi trường BH4. Kết quả trên đã chứng tỏ TBG trung mô đã chuyển sang dạng TBX với hình thành muối canxi trong tế bào chất.

### 3. Kết quả khảo sát nồng độ chất cảm ứng biệt hóa.

Kết quả sau khi khảo sát thay đổi nồng độ dexamethasone,  $\beta$ -glycerolphosphate, L- axit ascorbic với mỗi một thành phần được khảo sát ở nồng độ khác nhau, thành phần và yếu tố khác được cố định. Sau 21 ngày nuôi cấy biệt hóa tiến hành thu hoạch tế bào và định lượng hàm lượng canxi.

**Bảng 3:** Lượng canxi tích lũy trong tế bào cảm ứng biệt hóa bằng các chất cảm ứng khác nhau ở những nồng độ khác nhau.

Dexamethasone (nM)	Nồng độ canxi (mM/l)	$\beta$ -GP (mM)	Nồng độ canxi (mM/l)	L - AsA (mM)	Nồng độ canxi (mM/l)
ĐC	< L	ĐC	< L	ĐC	< L
1	< L	1	< L	0,005	< L
10	< L	5	< L	0,05	< L
100	0,27	10	0,36	0,25	0,39
<b>500</b>	<b>&lt; L</b>	<b>20</b>	<b>&lt; L</b>	<b>0,50</b>	<b>&lt; L</b>
<b>1000</b>	<b>&lt; L</b>	<b>30</b>	<b>&lt; L</b>	<b>1</b>	<b>&lt; L</b>

(ĐC: Đối chứng; < L: Thấp dưới ngưỡng phát hiện)

Kết quả khảo sát thay đổi nồng độ dexamethasone: ở nồng độ 1, 10, 500, 1000 nM cho kết quả định lượng canxi thấp dưới ngưỡng phát hiện của hệ thống phân tích, ở nồng độ 100 nM, kết quả định lượng canxi cao nhất: 0,27 mM/l;  $\beta$ -GP ở nồng độ 1, 5, 20, 30 mM kết quả định lượng canxi cũng thấp dưới ngưỡng phát hiện, ở nồng độ 10 mM cho kết quả định lượng là 0,36 mM/l. Đối với nồng độ khảo sát của L-AsA cũng cho kết quả tương tự như hai thành phần trên, ở nồng độ bổ sung vào môi trường biệt hóa: 0,005; 0,05; 0,5; 1,0 mM định lượng nồng độ canxi thấp dưới ngưỡng phát hiện, ở nồng độ bổ sung 0,25 mM cho kết quả định lượng nồng độ canxi là 0,39 mM/l.

Kết quả này cho thấy, đối với dexamethasone ở nồng độ bổ sung 1 và 10 nM,  $\beta$ -GP ở nồng độ 1 và 5 mM, L-AsA ở nồng độ 0,005 và 0,05 mM chưa phải là nồng độ thích hợp đủ để cảm ứng cho tế bào biệt hóa theo hướng tích tụ canxi và chưa đủ lượng canxi để hệ thống có thể phát hiện được các kết quả này đều thấp dưới ngưỡng phát hiện của hệ thống. Còn đối với dexamethasone ở nồng độ bổ sung 500 và 1000 nM;  $\beta$ -GP ở nồng độ 20 và 30 mM; L-AsA ở nồng độ 0,5 và 1 mM trong quá trình nuôi cấy biệt hóa vì nồng độ bổ sung vào môi trường có thể quá cao so với nồng độ cần thiết cho tế bào cảm ứng biệt hóa nên khi quan sát, theo dõi trong suốt quá trình nuôi cấy, có nhiều tế bào không bám dính và bị chết, do đó ở nồng độ này cũng chưa thích hợp, số lượng tế bào tích tụ canxi còn lại không đủ để hệ thống định lượng được nên kết quả cũng cho dưới ngưỡng phát hiện.

Dexamethasone có khả năng hoặc kích thích hoặc ức chế biệt hóa thành xương phụ thuộc vào nồng độ của nó. Nồng độ cao của dexamethasone sẽ cảm ứng biệt hóa thành tế bào mỡ, trong khi đó, với nồng độ thấp hơn, chất này sẽ kích thích TBG trung mô biệt hóa thành xương [2]. Axít ascorbic dễ dàng làm quá trình biệt hóa thành xương, bao gồm kích thích sự tổng hợp collagen, ngoài ra nó còn có tác động tăng sinh tế bào [2, 4, 10]. Cuối cùng,  $\beta$ -glycerolphosphate là yếu tố quan trọng kích thích hình thành chất nền được khoáng hóa khi kết hợp với dexamethasone và axít ascorbic [10]. Kết quả định lượng canxi ở nồng độ chất cảm ứng dexamethasone (100 nM),  $\beta$ -GP (10 mM), L-AsA (0,25 mM) lần lượt cho kết quả định lượng canxi là: 0,27 mM/l; 0,36 mM/l; 0,39 mM/l. Kết quả này so với những nồng độ khác đã được khảo sát là nồng độ thích hợp nhất để bổ sung vào môi trường biệt hóa TBG trung mô màng dây rốn thành TBX.

## KẾT LUẬN

Đề tài đã phân lập, nuôi cấy tăng sinh được TBG trung mô từ màng bao dây rốn trẻ sơ sinh làm nguồn nguyên liệu cho biệt hóa tế bào. Bước đầu đã cảm ứng biệt hóa được TBG trung mô màng dây rốn thành tế bào tạo xương trên in vitro. Qua khảo sát 5 công thức môi trường, lựa chọn được công thức BH4 với các thành phần bổ sung cho cảm ứng biệt hóa là: dexamethasone nồng độ 100 nM,  $\beta$ -GP: 10 mM, L - AsA: 0,25 mM cho hiệu quả cảm ứng biệt hóa cao nhất.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Văn Đông, Phạm Mạnh Hùng. Công nghệ TBG và tạo clon. Tạp chí Thông tin Y học. 2006, 8, tr.4-11.
2. Phan Kim Ngọc, Phạm Văn Phúc, Trương Định. Công nghệ TBG. NXB Giáo dục. 2009.
3. Phạm Thúy Trinh, Trương Định, Trương Thị Thu Huyền, Phạm Văn Phúc, Đỗ Minh Trung, Lê Văn Đông. Nghiên cứu phân lập TBG trung mô từ màng bao dây rốn trẻ sơ sinh. Tạp chí Thông tin Y Dược. Số Miễn dịch. 2010, tr.1-6.
4. Cheong H.H, Masilamani J, Phan T.T, Chan S.Y. Cord lining progenitor cells: potential in vitro adipogenesis model. Int J Obes (Lond). 2010, 34 (11), pp.1625-1633.
5. Hwai-Shi Wang, Shih-Chieh Hung, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's Jelly of the human umbilical cord. Stem cells. 2004, 22, pp.1330-1337.
6. Katsuhiko Kita, Gerd G. Gauglitz, Thang T. Phan, David N. Herndon and Marc G. Jeschke. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic Human umbilical cord lining membrane. Stem cells and Deverlopment. 2010, 19(4), pp.491-501.
7. Miki T, Lehmann T, Cai H, et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells, Stem Cells. 2005, 23, pp.1549-1559.
8. Phan TT, Lim IJ. Isolation and cultivation of stem/progenitor cells from the amniotic membrane of umbilical cord and uses of cells differentiated therefrom. US Patent Application filing date 21 October, 2005. Patent N<sup>o</sup>. 1-2007-00574.
9. Snejana Kestendjieva, Dobroslav Kyurkchiev, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. Cell Biology International. 2008, 32, pp.724-732.
10. Tatjana Schilling, Ulrich Nöth, et al. Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells. Molecular and cellular endocrinology. 2007, 271, pp.1-17.