

Produksi *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) dari Sumsum Tulang Belakang Mencit

Ratih Rinendyaputri¹, Ariyani Noviantari¹

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes, Kemenkes RI

E-mail : ratih79@yahoo.com

Abstract

Mesenchymal Stem Cell (MSC) is a source of stem cells are multipotent that can be differentiated into many tipe of cells. MSC can be obtained from various sources one of which is from the bone marrow. But the number of MSCs in the bone marrow is very limited, thus requiring the production of MSC in vitro to obtain considerable amounts on the application or further research. The success of the production is very dependent on various factors such as isolation methods and the use of appropriate culture medium. This study aims to compare the Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and Minimum Essential Medium Eagle (MEM) as a culture medium producing MSC were isolated from bone marrow of mice tibia and femur using flushing methode. Research conducted at the Laboratory of stem cells, Center for Biomedical and Basic Technology of Health. Tibia and femur of mice cleared of fat and decontaminated using alcohol 70% for 2 minutes. Once clean both ends of the bone is cut and in flushing using 1 cc needle with DMEM culture medium and MEM. Medium replacement is done after 48 hours of culture. The results showed that the MSC yield from tibia and femur bone marrow is higher when cultured with MEM rather than DMEM ($p < 0.05$). In this study the production of MSC from bone marrow of mice can be performed by using MEM medium with flushing method.

Key words: *Isolation, Medium, Bone marrow, MSC*

Abstrak

Mesenchymal Stem Cell (MSC) merupakan sumber stem cell yang bersifat multipoten sehingga mampu berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel. MSC dapat diperoleh dari berbagai sumber salah satunya adalah dari sumsum tulang. Namun jumlah MSC dalam sumsum tulang sangat terbatas, sehingga diperlukan produksi MSC secara in vitro untuk mendapatkan jumlah yang cukup pada aplikasi atau penelitian lebih lanjut. Keberhasilan produksi sangat bergantung pada berbagai faktor seperti metode isolasi dan penggunaan medium kultur yang tepat. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan medium kultur Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) dan Minimum Essential Medium Eagle (MEM) untuk produksi MSC yang diisolasi dari sumsum tulang tibia dan femur mencit dengan metode flushing. Penelitian dilakukan di Laboratorium stem cell, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Litbangkes. Tulang tibia dan femur mencit dibersihkan dari lemak dan didekontaminasi menggunakan alkohol 70% selama 2 menit. Setelah bersih kedua ujung tulang dipotong dan di flushing menggunakan jarum 1 cc dengan medium kultur DMEM dan MEM. Penggantian medium dilakukan setelah 48 jam kultur. Hasil menunjukkan bahwa jumlah MSC yang diperoleh dari sumsum tulang tibia dan femur mencit lebih banyak dengan MEM sebagai medium kultur dibandingkan dengan DMEM ($p < 0,05$). Pada penelitian ini produksi MSC dari sumsum tulang mencit dapat dilakukan dengan metode flushing dengan menggunakan medium MEM.

Kata kunci : *Isolasi, Medium, Sumsum tulang, MSC*

Pendahuluan

Mesenchymal stem cell (MSC) atau sel punca mesenkim merupakan sel punca dewasa yang bersifat multipoten. Kemampuan MSC berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel membuka peluang dalam pemanfaatannya sebagai sel terapi.¹ MSC dapat diperoleh dari beberapa sumber seperti dari darah tepi, darah plasenta, gel warthon, jaringan lemak, pulpa, dan sumsum tulang.^{2,3,4,5} Pada hewan model pemanfaatan *stem cell* dapat digunakan untuk pengembangan ilmu biologi, model terapi regeneratif serta sebagai skrining toksisitas obat-obatan. Untuk kebutuhan tersebut maka dibutuhkan MSC dalam jumlah tertentu. Oleh sebab itu produksi MSC secara *in vitro* dari hewan model perlu dilakukan.

Mesenchymal stem cell (MSC) dapat diperoleh dari sumsum tulang hewan model khususnya mencit dalam jumlah yang sangat terbatas, sehingga penggunaan metode produksi MSC secara *in vitro* yang tepat perlu dilakukan. Produksi MSC meliputi proses isolasi, kultur atau ekspansi sel secara *in vitro* dan melakukan karakterisasi terhadap potensi dari MSC. Keberhasilan proses –proses tersebut sangat berpengaruh terhadap produksi MSC secara *in vitro*.⁶ Secara garis besar faktor yang terpenting dalam produksi MSC dari mencit, khususnya pada kultur primer adalah metode isolasi MSC dari sumsum tulang serta pemilihan medium kultur yang tepat.

Isolasi MSC dari mencit dapat diperoleh dari tulang tibia dan femur. Metode isolasi MSC dari sumsum tulang hewan model seperti mencit sangat beragam. Pengembangan metode isolasi MSC dimodifikasi sesuai dengan fasilitas yang dimiliki oleh laboratorium. Metode isolasi MSC dari sumsum tulang tibia dan femur mencit dapat dilakukan dengan metode flushing dan sentrifugasi atau penggabungan dari kedua metode tersebut dan metode eksplan dari potongan tulang. Namun beberapa metode tersebut memiliki kekurangan dan kelebihan masing-masing,

karena metode isolasi tersebut akan berpengaruh terhadap kemurnian sel yang diperoleh, viabilitas serta jumlah sel yang dapat terisolasi.^{6,7,8,9}

Keberhasilan ekspansi dapat dilihat dari tingkat proliferasi serta karakteristik MSC yang dihasilkan.¹⁰ Pemilihan medium kultur serta suplemen yang ditambahkan dalam medium kultur seperti faktor pertumbuhan dapat mempengaruhi proliferasi sel serta menjaga sifat pluripotensi sel punca.^{11,12} Namun menurut Gowda *et al.* (2013), tingkat proliferasi sel punca tidak hanya dipengaruhi oleh kombinasi medium kultur yang digunakan tetapi juga tergantung pada jumlah sel pada awal kultur.¹³

Komposisi medium kultur juga dapat mempengaruhi keberhasilan ekspansi MSC secara *in vitro*. Setiap medium kultur yang komersial mempunyai komposisi berbeda-beda sehingga efektifitas mediumpun berbeda untuk setiap jenis sel punca maupun sumber sel punca itu sendiri. Pada kultur sel punca MSC yang bersumber dari jaringan lemak kuda, proliferasi optimal pada penggunaan medium kombinasi DMEM dan MEM, namun Lee *et al.* (2010) melaporkan bahwa MEM merupakan medium yang optimal untuk kultur MSC dari pulpa gigi manusia.^{13,14}

Informasi penggunaan medium untuk produksi MSC manusia dari berbagai sumber telah dilaporkan, namun medium kultur untuk MSC dari setiap jenis spesies maupun strain hewan coba masih sangat terbatas. Mengingat pentingnya tahap isolasi dan pemilihan medium kultur yang tepat untuk ekspansi dan produksi MSC secara *in vitro* khususnya mencit (*Swiss Webster*), maka perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan medium yang efektif untuk melakukan produksi MSC dari sumsum tulang mencit strain tersebut.

Metode

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell* Pusat Teknologi Dasar Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan – Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dari bulan Maret-Desember 2010.

Isolasi ulang Tibia dan Femur Mencit

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini adalah 5 mencit *Swiss Webster* yang berumur 7 minggu. Mencit di *dislokasio servikalis* untuk kemudian dilakukan pembedahan pada bagian kaki depan dan belakang.

Isolasi dan Kultur Sumsum tulang mencit dengan *flushing*

Isolasi dilakukan dengan memodifikasi yang telah dilakukan oleh Meirelles dan Nardi (2003).⁶ Tulang tibia dan femur di dekontaminasi dengan alkohol 70% selama 2 menit dan dibersihkan dari sisa jaringan yang menempel pada tulang. Tulang dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) kemudian ke dua ujung tulang dipotong menggunakan gunting sehingga tulang tibia dan femur berbentuk seperti pipa. Tulang difiksir menggunakan pinset sehingga mudah dalam melakukan pembilasan (*flushing*) dari salah satu ujung tulang (pastikan medium keluar dari dalam tulang). *Flushing* dilakukan dengan menggunakan *syringe* 1 cc dan medium kultur di dalam BSC II. Setiap 5 pasang tulang tibia dan femur dikultur pada dua medium yang berbeda. Hasil *flushing* tulang tibia dan femur ditampung dalam flask 25cm² dengan tutup berfilter kemudian dikultur dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂, suhu 37⁰C dengan menggunakan medium kultur. Medium kultur yang digunakan adalah Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) *high-glucose* (Sigma, D7777) dan Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Sigma, M0894), masing-masing medium disuplementasi dengan *fetal bovine serum*

10% (FBS, Sigma), natrium bikarbonat 3.7g/l (Sigma), L-glutamine, *non-essential amino acids* 1% (Sigma), *mercaptoethanol* 0.1mM (Sigma), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) 20 ng/ml (Sigma), dan gentamicin 50 µg/ml (Sigma). Pada kultur primer pada hari ke 1 dilakukan penggantian medium namun ditampung pada flask 25 yang baru. Untuk selanjutnya penggantian medium kultur dilakukan setiap dua hari, penghitungan sel dilakukan setelah 7 hari kultur.

Menghitung jumlah MSC dengan haemocytometry

Penghitungan MSC dilakukan setelah kultur selama 7 hari, untuk memudahkan penghitungan sel dilakukan tripsinasi sehingga MSC menjadi *single cell* dan menjadi suspensi MSC. Larutan trypan blue dicampur dengan suspensi MSC dengan perbandingan 1:1 (pengenceran 2x), kemudian diteteskan pada kamar hitung haemocytometri dan dihitung diawah mikroskop inverted. Jumlah sel merupakan jumlah sel pada kotak kamar hitung haemocytometri dikalikan faktor pengenceran dan volume suspensi dibagi jumlah kotak pada kamar hitung ($\sum \text{sel} = \frac{\sum \text{sel}}{\sum \text{kotak}} \times 2 \times \text{volume suspensi} \times 10^4$).⁸

Diferensiasi MSC dari sumsum tulang mencit menjadi osteosit secara *in vitro*

Penanaman MSC dilakukan di 4-well plate dengan jumlah sel 3x10⁴ per sumur. Hari ke 4 kultur setelah mencapai konflueni 100%, MSC dikultur dengan medium diferensiasi osteosit (Gibco, Stempro A10069) dan medium diferensiasi lemak (Gibco) selama 10-14 hari. Selanjutnya dilakukan pewarnaan menggunakan Alizarin untuk mengetahui kalifikasi pada sel-sel osteosit dan droplet lemak.⁶

Pewarnaan MSC pasca diferensiasi

Fiksasi dilakukan dengan menggunakan 4% paraformaldehide (Sigma, P6148) selama 30 menit. Setelah dilakukan fiksasi, pewarnaan dengan Alizarin Red S (Sigma, A5533) dan Oil Red O (Sigma) selama 5 menit. Pengamatan dilakukan secara mikroskopis dengan inverted mikroskop.⁶

Analisa Data

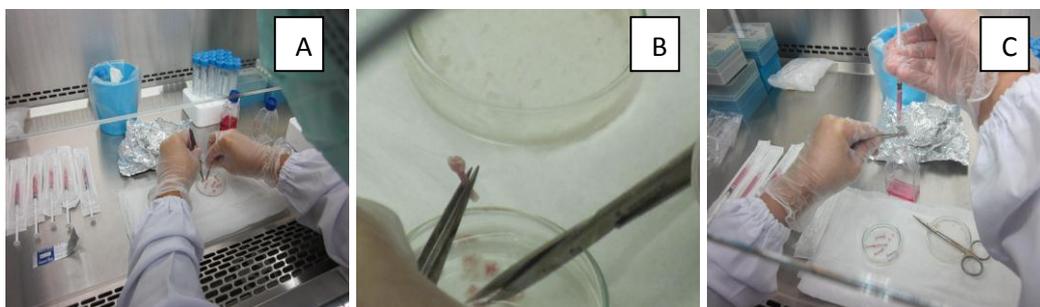
Pengamatan dilakukan secara mikroskopis dan disajikan secara deskriptif, untuk jumlah MSC dianalisis menggunakan annova one way dengan SPSS 15. Jumlah MSC diperoleh dari 5 ekor mencit kemudian diambil rerata jumlah MSC yang telah dikultur dalam 2 medium yang berbeda.

Hasil

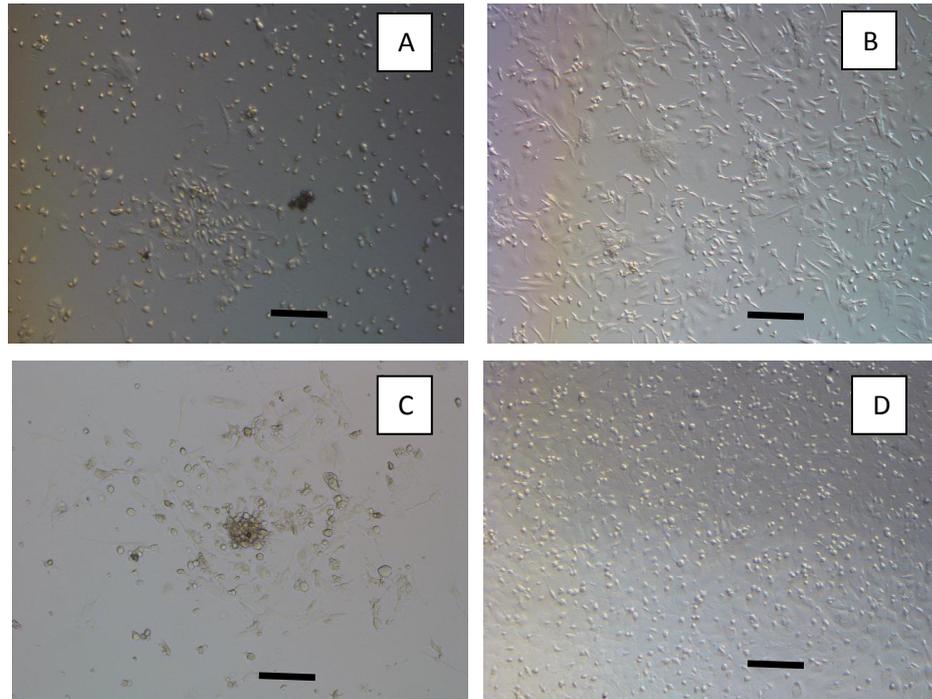
Pada penelitian ini isolasi MSC dilakukan dengan menggunakan metode *flushing* yang dilakukan berulang pada setiap tulang sehingga diperoleh konsentrasi sel yang optimal (Gambar 1).⁶ Pengamatan secara mikroskopis, proliferasi sel terjadi pada penggunaan medium kultur DMEM dan MEM. Pada hari ke 1 dan ke 2, koloni *mesenchymal stem cell* (MSC) yang berbentuk *triangular* dan bulat sudah mulai menempel pada dasar cawan.

Proliferasi MSC dapat diamati pada hari ke 3 dengan ditandai bertambahnya jumlah sel yang menyebar dengan perubahan morfologi menjadi *fibroblast-like*. Pengamatan pada hari ke 7 pada dasar cawan sel yang tumbuh telah didominasi oleh MSC yang mempunyai morfologi bulat, *fibroblast-like* dan *fusiform* (Gambar 2). Sel berbentuk bulat pada hari ke 7 merupakan sel-sel yang telah selesai melakukan pembelahan mitosis.

Pengamatan secara mikroskopis, proliferasi sel terjadi pada penggunaan medium kultur DMEM dan MEM. Pada hari ke 1 dan ke 2, koloni *mesenchymal stem cell* (MSC) yang berbentuk *triangular* dan bulat sudah mulai menempel pada dasar cawan. Proliferasi MSC dapat diamati pada hari ke 3 dengan ditandai bertambahnya jumlah sel yang menyebar dengan perubahan morfologi menjadi *fibroblast-like*. Pengamatan pada hari ke 7 pada dasar cawan sel yang tumbuh telah didominasi oleh MSC yang mempunyai morfologi bulat, *fibroblast-like* dan *fusiform* (Gambar 2). Sel berbentuk bulat pada hari ke 7 merupakan sel-sel yang telah selesai melakukan pembelahan mitosis.



Gambar 1. Tahapan Isolasi MSC dari Tulang Tibia dan Femur. (A) Membersihkan Tulang dari Otot dan Lemak dalam Alkohol 70%, (B) Tulang Tibia dan Femur Dipotong pada Kedua Ekstrimitasnya, (C) Flushing Menggunakan Medium Kultur Kemudian di Kultur dalam Inkubator 5% CO₂ dan 37°C.

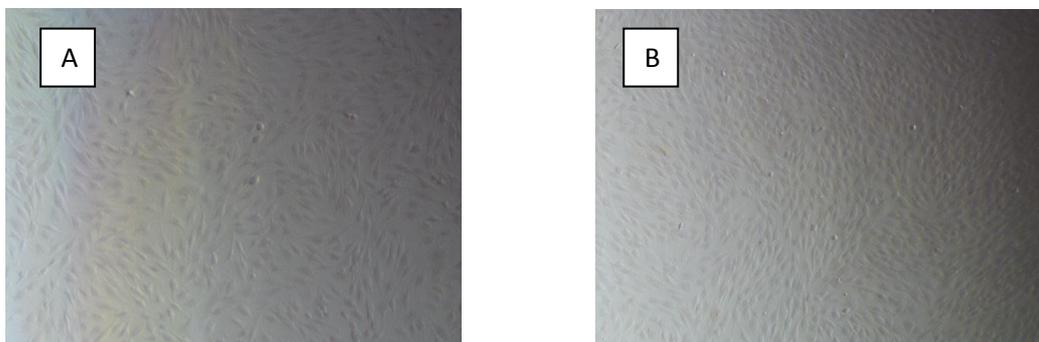


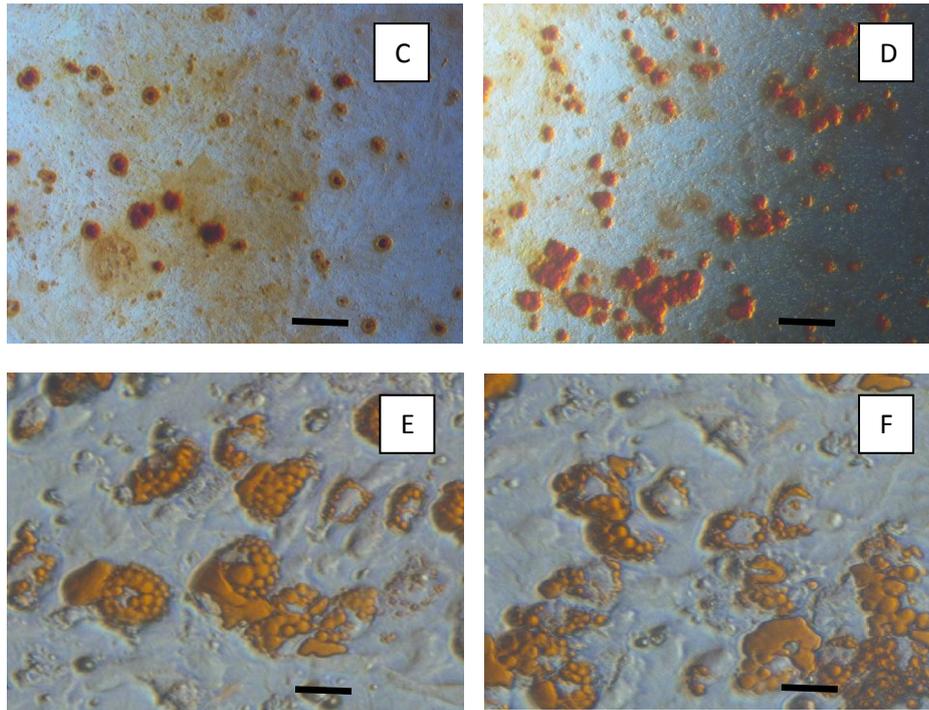
Gambar 2. Pertumbuhan MSC yang diisolasi dari Sumsum Tulang Mencit. (A) Kultur Sumsum Tulang Tibia Hari ke 2 dan (B) Kultur hari ke 7 dengan Medium DMEM, (C) Kultur Sumsum Tulang Femur hari ke 2 dan (D) hari ke 7 Menggunakan Medium MEM. Bar : 150µm

Tabel 1. Konsentrasi MSC pada Medium DMEM dan MEM

	Mean	SD	95% CI	P value
DMEM	285,0 x 10 ³	65,36	238,24-331,76	0,00
MEM	621,8 x 10 ³	102,63	548,38-695,22	

menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)





Gambar 3. Diferensiasi MSC dari Sumsum Tulang Mencit yang Dikultur dengan Medium DMEM dan MEM menjadi Sel Osteosit dan Adiposit. MSC yang Dikultur dengan DMEM dan MEM (A dan B). Pewarnaan Alizarin Setelah Induksi Osteosit dari MSC yang Dikultur dengan DMEM dan MEM (C dan D). Pearnan Oil Red O Setelah Induksi Adiposit dari MSC yang Dikultur dengan DMEM dan MEM (E dan F). Bar : 150µm.

Pembahasan

Pada penelitian ini MSC dari sumsum tulang mencit dapat diisolasi dari tulang tibia dan femur dengan metode *flushing* (Gambar 1). Metode ini merupakan salah satu cara untuk mengeluarkan sumsum tulang dari tulang tibia dan femur, namun populasi MSC pada sumsum tulang masih bercampur dengan *haematopoetik stem cell*, sel-sel fibroblast dan eritrosit.^{8,15} Tahap berikutnya untuk medapatkan MSC perlu dilakukan kultur 7-10 hari (kultur primer), hal ini dilakukan karena salah satu sifat MSC adalah menempel pada dasar cawan. Pada penggantian medium kultur sel-sel lain yang tidak menempel pada cawan akan terbuang. Pada hari ke empat dan seterusnya populasi telah didominasi oleh MSC dengan morfologi *fibroblast-like*. Kultur primer MSC dalam penelitian berhasil tumbuh dengan menggunakan

medium kultur DMEM dan MEM (Gambar 2).

Metode *flushing* merupakan metode konvensional yang cukup mudah dan semua sumsum tulang di dalam tulang mencit dapat diperoleh, sehingga MSC bisa didapat secara maksimal. Hal yang perlu diperhatikan adalah meminimalisasi kontaminasi dengan memastikan keluarnya medium dari arah jarum saat melakukan *flushing*. Metode lain yang dapat dilakukan untuk mengeluarkan sussum tulang mencit adalah dengan meretakkan tulang tibia atau femur kemudian menanam fragmen tulang tersebut dan metode sentrifugasi.^{9,16} Namun penggunaan metode ini memiliki kekurangan, karena pada saat kultur sel bersama dengan fragmen tulang maka beberapa sel pada jaringan tulang akan menempel di dasar cawan hal ini dapat mengurangi kemurnian sel yang

diproduksi. Begitu juga pada metode sentrifugasi dengan ficoll, metode ini membutuhkan jumlah sample sumsum tulang yang lebih banyak, tentu saja hal ini sulit diperoleh dari sumsum tulang hewan model seperti mencit. Selain itu sentrifugasi berulang dapat menyebabkan kerusakan pada membran sel, sehingga mengurangi viabilitas sel-sel mononuclear dan MSC yang ada pada sumsum tulang.¹⁶ Penelitian ini menggunakan metode flushing dan berhasil diperoleh konsentrasi yang tinggi pada kultur primer. Untuk mengoptimalkan metode *flushing* ini Fu *et al.* (2014) memotong tulang femur dan tibia menjadi dua setelah memotong kedua ujung epifise kemudian melakukan *flushing*, hal ini dapat menghindari tertinggalnya sumsum tulang di bagian tengah tulang tibia/femur.

Pasca tripsinasi setelah kultur primer, jumlah MSC yang dapat diperoleh lebih banyak pada penggunaan medium kultur MEM dibandingkan dengan DMEM (Tabel 1). Hasil ini sejalan dengan Meuleman *et al.* 2006. dan Peister *et al.* (2004) yang menyatakan bahwa pada ekspansi MSC dari sumsum tulang manusia dan mencit Balb/c menunjukkan tingkat proliferasinya lebih tinggi pada kultur dengan (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium) IMDM dan MEM dibandingkan dengan RPMI dan DMEM.^{5,14,16} Namun beberapa penelitian melaporkan bahwa Knockout DMEM mempunyai efek yang baik dengan munculnya koloni-koloni baru yang lebih banyak pada kultur MSC dari sumsum tulang *murine dan mencit*.^{8,17} Setiap medium komersial memiliki komposisi asam amino, protein dan glukosa berbeda-beda sehingga penggunaannya harus disesuaikan dengan jenis sel. Menurut Lee *et al.* (2008) salah satu sifat MSC adalah menempel pada dasar cawan kultur (*adherent cell*), sehingga MEM merupakan medium yang tepat dibandingkan dengan RPMI dan DMEM yang memiliki asam amino dan

protein yang menghambat adhesi sel pada flask/cawan.^{1,14}

Keberhasilan ekspansi MSC tidak hanya tergantung pada jenis medium namun suplement yang ditambahkan ke dalam medium kultur juga dapat mempengaruhi proliferasi sel. Beberapa penelitian menambahkan suplemen 10-20% FBS dan *fetal calf serum* (FCS), namun ada pula yang menggantikannya dengan *growth factor* untuk meningkatkan proliferasi.^{11,14,18} Pada penelitian ini suplement 10% FBS dan 20ng/ml bFGF sebagai *growth factor* pada medium kultur telah menunjukkan tingkat proliferasi yang tinggi (Tabel 1). Tetapi kemampuan proliferasi MSC tidak hanya dipengaruhi faktor dari luar/lingkungan seperti penggunaan medium maupun suplement yang digunakan namun juga strain mencit dapat mempengaruhi potensi MSC. Menurut Ooi *et al.* (2008) strain Balb/c mempunyai kemampuan diferensiasi yang lebih lama dibandingkan dengan strain CBA/Ca dan ICR.¹⁹

Penambahan serum dan glukosa pada kultur medium dapat mempercepat proliferasi MSC namun pada fase berikutnya akan terjadi penurunan yang lebih cepat dibandingkan pada medium kultur bebas serum, hal ini diduga karena sel akan lebih cepat dalam metabolisme sehingga menghasilkan produk metabolisme seperti oksidan yang toksik untuk sel.^{17,20} Kondisi ini akan mempengaruhi kualitas MSC karena hal ini dapat memicu perubahan karakter biologi seperti penuaan sel (*senescence*), terjadinya perubahan kariotipe serta memicu transformasi MSC ke arah keganasan.^{17,21,22} Penuaan sel secara morfologi sel ditandai dengan perubahan bentuk sel menjadi besar dan berbentuk *flat/flattened*. Untuk menghindari hal tersebut pemilihan medium yang tepat sangat penting untuk mendapatkan lingkungan yang optimal untuk proliferasi MSC, sehingga jumlah dan kualitas MSC

yang sesuai standar dapat diproduksi dalam waktu kultur yang tidak lama.¹⁴

Karakterisasi MSC perlu dilakukan untuk mengetahui kemampuan plastisitas atau potensi MSC yang telah dikultur dan pasase pada beberapa waktu. Untuk mengetahui potensi tersebut dapat dilakukan dengan melakukan pemeriksaan marker spesifik (imunotipe) untuk MSC dan mendiferensiasikan MSC menjadi berbagai tipe sel. Beberapa imunotipe yang disyaratkan untuk marker MSC adalah CD13, CD29, CD90, CD73, CD44, CD105, CD146 dan negatif terhadap CD14, CD34, CD45.^{23,24} Menurut Ooi *et al.* (2013) setiap strain mencit yang berbeda memiliki variasi persentase imunotipe MSC setelah mengalami kultur dan pasase berulang.¹⁹

Kemampuan diferensiasi MSC dapat menjadi indikator untuk mengetahui multipotensi MSC yang telah berhasil diproduksi. Kemampuan MSC menjadi beberapa tipe sel seperti osteosit, adiposit dan kondrosit merupakan salah satu indikasi multipotensi MSC yang berhasil diproduksi secara *in vitro*.^{2,19} Pada penelitian ini kualitas MSC yang telah dikultur menggunakan kedua medium (DMEM dan MEM) menunjukkan kualitas MSC yang baik. Hal ini ditunjukkan dengan sifat multipotensi MSC yang mampu berdiferensiasi menjadi osteosit dan adiposit (Gambar 3).

Kesimpulan

Minimum Essential Medium Eagle (MEM) merupakan medium kultur yang tepat untuk produksi MSC secara *in vitro* dengan metode *flushing* untuk isolasi MSC dari sumsum tulang tibia dan femur mencit.

Saran

Karakterisasi MSC perlu dilakukan untuk mengetahui kualitas MSC yang

diproduksi menggunakan medium kultur MEM dan DMEM.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Balitbangkes atas pemberian dana penelitian, Prof. Arief Boediono atas masukan dan nasehat selama melakukan penelitian. Teman-teman tim di laboratorium stem cell PBTDK Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbankes, Kementerian Kesehatan yang telah membantu berjalannya penelitian, saya ucapkan terimakasih

Daftar Rujukan

1. Lee KD. Application of mesenchymal stem cell: An updated review. *Chang Gung Med J.* 2008;31:228-36.
2. Trivanović D, Kocić J, Mojsilović S, Krstić A, Ilić V, Djordjević IO, Santibanez JF, Jovčić G, et al. Mesenchymal Stem Cells Isolated from Peripheral Blood and Umbilical Cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Isolated from Peripheral Blood and Umbilical Cord Wharton's Jelly. *Srp Arh Celok Lek.* 2013 Mar-Apr;141(3-4):178-86.
3. Gimble JM., Katz JA., and Bunnell AB. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ Res.* 2007;100:1249-60. DOI: 0.1161/01.RES.0000265074.83288.09
4. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13625-0.
5. Peister A, Mellad AJ., Larson LB, Hall MB, Gibson FL, and Prockop JD. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood.* 2004; 103:1662-8.
6. Meirelles LS and Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *British Journal of Haematology.* 2003;123:702-11.
7. Maggini J, Mirkin G, Bognanni L, Holmberg J, Piazzi IM, Nepomnaschy N, Costa H, Canones C, Raisen S, Vermeulen M, Geffner MJR. Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Turn Activated Macrophages into a Regulatory-Like Profile. *PLoS One.* 2010; 5(2):9252

8. Bitencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, Oliveira APE, Deffune E. Isolation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Acta Ortop Bras.* 2006;14(1):22-4.
9. Cai Y, Liu T, Fang F, Xiong C, and Shen S. Comparisons of Mouse Mesenchymal Stem Cells in Primary Adherent Culture of Compact Bone Fragments and Whole Bone Marrow. *Stem Cells International.* 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/708906H>
10. Haggmann S, Moradi B, Frank S, Dreher T, Kämmerer PW, Richter R and Gotterbarm T. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskeletal Disorders.* 2013;14:223.
11. Zittermann IS and Issekutz CA. Medium Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, FGF-2) Potentiates Leukocyte Recruitment to Inflammation by Enhancing Endothelial Adhesion Molecule Expression. *American Journal of Pathology.* 2006;168(3).
12. Ayatollahi M, Salmani KB, Geramizadeh B, Tabei ZS, Soleimani M, Sanati HM. Conditions to improve expansion of human mesenchymal stem cells based on rat samples. *World J Stem Cells* 2012 January 26; 4(1):1-8.
13. Gowda S, Hari A, Chougule B, Reddy KM, Chandanan A, Sodhi M, Koshy N, Fonseca L, Totey S. *J Stem Cell Res Ther.* 2013;3:5. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7633.1000154>
14. Lee S, Sohn Y, Choi Y, Park N, and Yoon H. Culture of Mesenchymal Stromal Cells from Dental Pulp: Culture Medium Study for Effective Expansion and Characterization. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2010;7(2):248-54.
15. Rombouts WJC and Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia.* 2003;17:160–70.
16. Fu G, Qin G, Chen J, Zhang Y. Long-term culture and growth characteristics of mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Medica Mediterranea.* 2014;30:143.
17. Jung S, Sen A, Rosenberg L and Behie LA. Human mesenchymal stem cell culture: rapid and efficient isolation and expansion in defined serum free medium. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6:391-403.
18. Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, et al., Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *European journal of haematology.* 2006;76:309.
19. Ooi Y, Rahmat Z, Jose S, Ramasamy R, Vidyadaran S. Immunophenotype and differentiation capacity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from CBA/Ca, ICR and Balb/c mice *World J Stem Cells* 2013 January 26; 5(1): 34-42.
20. Saki N, Jalalifar MA, Soleimani M, Hajizamani S, Rahim F. Adverse Effect of High Glucose Concentration on Stem Cell Therapy. *IJHOSCR.* 2013;7(3).
21. Izadpanah R, Kaushai D and Kriedt C. Long-term in vitro expansion alter the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 2008;68:4229-38.
22. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA., Fu B., Patel V., Soe B., Sonoyamana W., Zheng J, Baker CC., Chen W., Ried T., Shi A. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cell leads to malignant transformation. *Stem Cell.* 2006;24:1095-103.
23. Ryu H, Kang B, Park S, Kim Y, Sung J, Woo H, Kim WH and Kweon O. Comparison of Mesenchymal Stem Cells Derived from Fat, Bone Marrow, Wharton's Jelly, and Umbilical Cord Blood for Treating Spinal Cord Injuries in Dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 2012;74(12):1617–30, doi: 10.1292/jvms.12-0065.
24. Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, Prigione A, Adjaye J, Kassem M, Aldahmash A. Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential. *Stem Cell Rev and Rep.* 2013;9:32–43 DOI 10.1007/s1201