

ALLOREAKTIFITAS DARI TRANSPLANTASI SEL PUNCA MESENKIMAL PADA SUMSUM TULANG ALLOGENIK: STUDI MENGENAI TINGKAT SERUM INTERLEUKIN 10 DAN EFEKNYA PADA REAKSI INFLAMASI JARINGAN OTOT

L.G.D Anggitadewi*

Dwikora N. Utomo, Ferdiansyah**, Fedik A. Rantam*****

* PPDS Departmen Orthopedi & Traumatologi Universitas Airlangga / Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo Surabaya.

** Staff Departmen Orthopedi & Traumatologi Universitas Airlangga / Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo Surabaya.

*** Guru Besar / Staff Tropical Disease Center, Divisi Stem Sel, Universitas Airlangga

ABSTRACT

Background: Use of allogeneic MSC for repair of large defects may be an alternative to autologous and allogeneic tissue-grafting procedures. An allogeneic approach would enable MSC to be isolated from any donor, expanded and cryopreserved, providing a readily available source of progenitors for cell replacement therapy. Current knowledge regarding the immunobiology and clinical application of MSC needs to be strengthened further to establish MSC as a safe and effective therapeutic tool in regenerative medicine. This paper discusses alloreactivity of MSCs with particular reference to serum level of interleukin-10 (IL 10), in the engraftment process following allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells injection to the femoral muscle, to explain allogeneic MSCs's role as immunomodulators and their multilineage differentiation potential and possible use in tissue regeneration and repair.

Method: Laboratory experimental study. Serum IL-10 levels were measured in over 16 samples of New Zealand white rabbit, before and for up to 1 weeks following transplantation using a enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) IL-10 kit for rabbit, with a sensitivity of ≥ 78 pg/mL. Eight white rabbit received 2×10^6 injection of allogeneic MSCs into their femoral muscle. In the remaining 8 rabbit, act as control, were injected with phosphate buffered saline. At day 8 post transplantation, injection site on femoral muscle were being obtained for histopathology examination using hematoxylin-eosine staining.

Result: Histopathology examination showed no significant different found from lymphocytes, monocytes, and polymorphonuclear cells between allogeneic MSCs recipients and control group. Comparison of serum IL-10 peak levels were studied in the immediate posttransplant period between day 0 and day 8 in recipients of allogeneic MSCs as well as control group.

Conclusion: Allogeneic MSCs may modulate immunobiological process during their engraftment. This animal study showed favourable result toward MSCs' alloreactivity.

Keywords: allogeneic mesenchymal stem cells, interleukin 10, immunobiology, tissue repair

PENDAHULUAN

Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) sebagai salah satu modalitas terapi dalam *regenerative medicine*, memiliki banyak keunggulan dalam terapi klinis. Di bidang orthopedi, penggunaan *auto stem cells* pada defek tulang dan tendon sudah diteliti dan diterapkan. Namun terdapat ketidakseimbangan jumlah antara *supply and demand*, antara donor dan resipien, dimana jumlah kebutuhan resipien melebihi jumlah ketersediaan donor.

Morbiditas *donor site* juga merupakan faktor yang mempengaruhi pengadaan *stem cell* allogenik, yang merupakan upaya untuk menghasilkan produksi *stem cell* untuk mengatasi keterbatasan donor.

Belum banyak data penelitian mengenai data pemakaian autologus dan allogenik *stem cells* di dunia dan Indonesia. Pencarian berbasis PubMed dengan kata kunci "*bone marrow mesenchymal stem cell clinical application in orthopedic*" memperlihatkan hasil sebanyak 33 penelitian di seluruh dunia.⁴²⁻⁶¹

Penggunaan MSCs allogenik masih menimbulkan kekhawatiran akan timbulnya reaksi penolakan oleh sistem imun *host*.

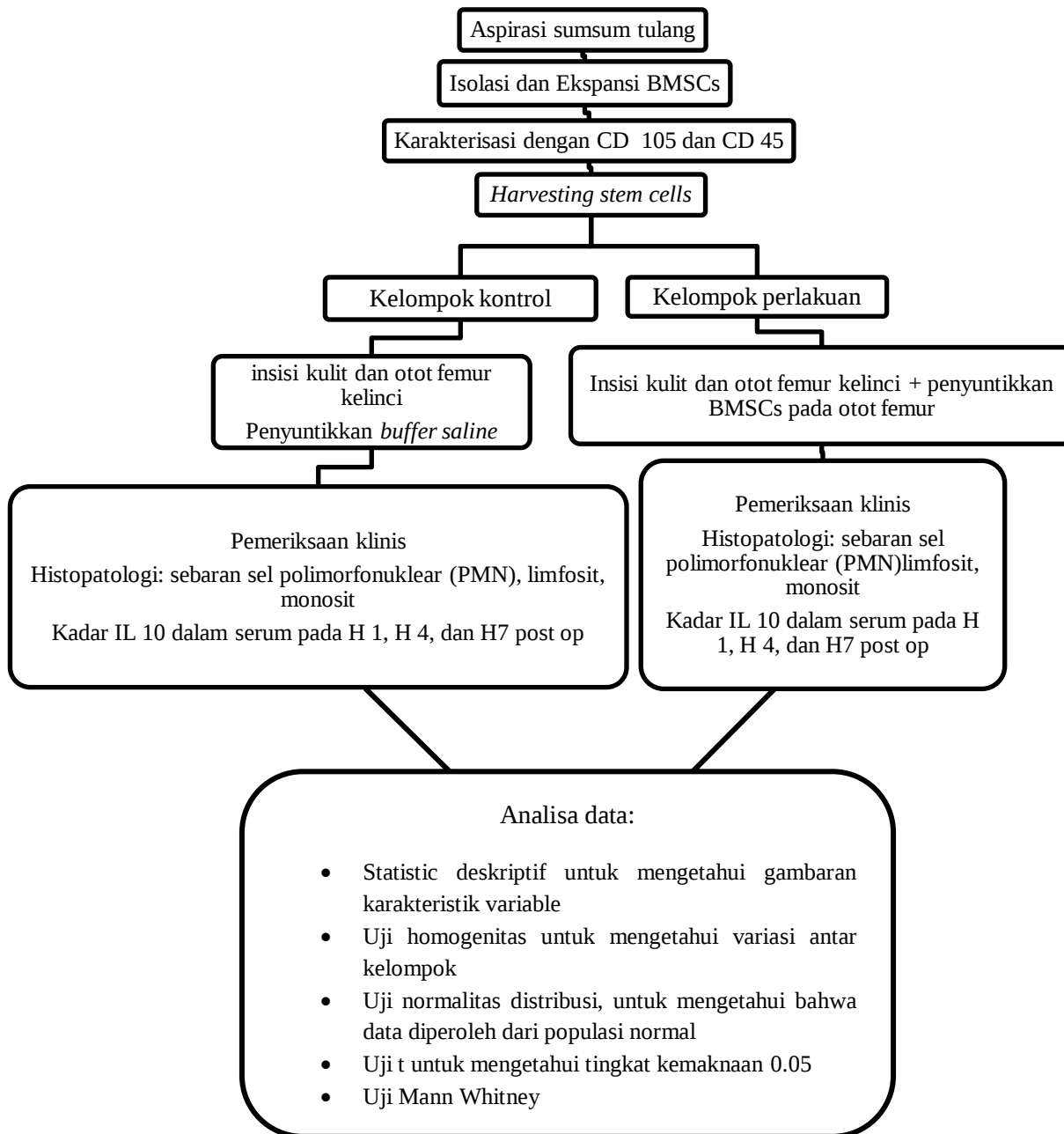
Sistem imun yang berperan pada proses penolakan (*rejection*) timbul karena adanya polimorfisme genetik.

Antigen transplantasi merupakan produk gen yang polimorfik, berupa golongan darah dan molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) yang berbeda diantara berbagai individu. Transplantasi sumsum tulang untuk menghasilkan *stem cells* dapat menimbulkan *graft versus host reaction*. Oleh karena itu dalam penelitian ini penulis ingin meneliti reaksi imun yang terjadi pada implantasi MSCs allogenik, dalam kepentingan rekayasa jaringan.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini adalah suatu penelitian eksperimental laboratoris, dimana pengumpulan data dilakukan setelah intervensi atau perlakuan pada subyek penelitian. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *cross sectional*, dengan cara pengumpulan data sekaligus pada suatu saat (*point time approach*). Subyek penelitian adalah kelinci putih (*New Zealand white rabbit*), dan obyek penelitian adalah serum dan jaringan otot femur kelinci. Penelitian ini dimaksudkan untuk melihat alloreaktivitas, dinilai dari kadar serum IL 10 serta jumlah limfosit, monosit, serta polimorphonuclear cells (PMN). Demi mendapatkan gambaran tentang alloreaktivitas pada jaringan sekitar setelah dilakukan penanaman *bone marrow derived mesenchymal stem cells* (BMSCs).

Alur penelitian



Binatang coba dipilih secara acak, sejumlah minimal 6 ekor setiap kelompok, kemudian dipelihara dalam kondisi lingkungan dan makanan yang sama.

Penelitian dilakukan secara eksperimental di dalam laboratorium. Penelitian ini menggunakan 1 macam perlakuan yang sama yaitu penanaman BMSCs dalam jaringan otot femur kelinci, dibagi menjadi 2 kelompok

berdasarkan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok K0 merupakan kelompok kontrol sedangkan kelompok K1 merupakan kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok pengamatan terdiri dari 8 ekor hewan coba yang mendapat perlakuan yang sama.

Bahan-bahan yang dipersiapkan untuk kultur sel adalah α MEM, Ficol, dan FBS. Sumsum tulang dituang kedalam

tabung disposable 15 ml yang steril dan ditambahkan PBS 10 ml, kemudian dilakukan resuspensi. Dimasukkan 5 ml Ficol ke dalam tabung disposibel 15 ml yang steril melalui dinding tabung tuangkan campuran marrow dan PBS. Dilakukan sentrifugasi pada temperatur 20°C selama 25 menit dengan kecepatan 1600 rpm. Dari hasil sentrifugasi akan diperoleh 4 lapisan yaitu sel darah merah, *ficol*, *buffy coat*, dan plasma. *Buffy coat* diambil dan diletakkan pada tabung disposibel 15 ml yang steril dengan pipet. Ditambahkan PBS 10 ml yang tujuannya untuk mencuci *buffy coat* yang diperoleh. Dilakukan sentrifugasi kembali dengan suhu 20°C selama 10 menit dengan kecepatan 1600 rpm. Dari hasil sentrifugasi diperoleh pellet, pellet ini kemudian ditambahkan medium penumbuh α MEM sebanyak 2 ml kemudian lakukan resuspensi. Hasil resuspensi dipindahkan kedalam piring petri diameter 10 ml dan ditambahkan 10 ml medium penumbuh α MEM. Inkubasi pada inkubator 37°C dengan kadar CO₂, dan pertumbuhan sel akan diamati setiap harinya.

Pertumbuhan sel terus diamati setiap harinya, pada hari kedua dilakukan pencucian sel, dengan cara medium lama diambil dan dicuci dengan menggunakan PBS, lalu diganti dengan medium baru. Hal ini dilakukan karena pada sumsum tulang didapatkan lemak, sisa sel darah merah dan *stem cells* mesensimal yaitu sel yang melekat pada dinding Petri. Pada hari ke tujuh bila pertumbuhan sel telah konfluen 80% dilakukan *splitting*. Medium lama diambil dan ditambahkan tripsin 2 ml, kemudian tripsin diambil dan dibuang lalu tambahkan lagi 2 ml tripsin kemudian inkubasi 5 menit pada inkubator. Penambahan tripsin yang

pertama dilakukan untuk mencuci sel dan yang kedua dilakukan untuk merontokkan sel. Setelah 5 menit ditambahkan medium penumbuh α MEM sebanyak 2 ml kemudian dilakukan resuspensi untuk memisahkan sel yang rontok agar menjadi sel tunggal. Lalu hasil resuspensi dipindahkan kedalam tabung disposibel 15 ml yang steril untuk kemudian dilakukan sentrifugasi. Pelet yang diperoleh ditambahkan medium penumbuh α MEM diresuspensi dan dipindahkan ke dalam 2 piring petri diameter 10 ml, masing-masing ditambahkan 10 ml medium penumbuh α MEM. Inkubasi kembali kedalam inkubator. Pertumbuhannya diamati setiap hari, passase yang dilakukan sampai dengan passase 4 dimana biasanya jumlah yang diinginkan telah tercapai dan ideal untuk diaplikasikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa terjadi peningkatan konsentrasi serum IL-10 pada kelinci yang otot femurnya sudah ditanami *mesenchymal stem cells* allogenik, serta untuk membuktikan bahwa tidak terjadi peningkatan jumlah limfosit, monosit, dan sel *polimorphonuclear* (PMN) pada otot femur kelinci yang sudah ditanami *mesenchymal stem cells* allogenik.

Berdasarkan uji Mann Whitney didapatkan tidak terdapat perbedaan jumlah limfosit pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. ($p = 1,000$). Pada uji Independent T Test menunjukkan tidak terdapat perbedaan monosit pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. ($p = 0,356$). Sedangkan pada uji Mann Whitney menunjukkan tidak terdapat perbedaan

jumlah PMN pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. ($p=0,959$).

Interaksi MSCs allogenik dengan sel imun menimbulkan alloreaktivitas. Alloreaktivitas yang timbul akibat interaksi MSCs dan sel imun yang diamati pada penelitian ini adalah tidak terjadinya reaksi penolakan allogenik MSCs yang ditanamkan pada jaringan otot femur kelinci, yang terlihat pada tidak ada beda signifikan antara hitung sel limfosit, monosit maupun PMN pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol.

Ini dipengaruhi oleh potensi MSCs dalam menghambat secara langsung fungsi dan proliferasi sel T, melalui sekresi prostaglandin E2 (PGE2), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), *transforming growth factor* β 1 (TGF β 1), *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), *haemoxygenase-1* (HO1), serta *soluble* HLA-G5 (sHLA-G5).

Penelitian ini juga mengamati adanya peningkatan konsentrasi IL 10 pada serum kelinci yang mendapat injeksi intramuskuler allogenik MSCs.

Uji komparatif dengan menggunakan independen t test menunjukkan ada beda signifikan antara perbedaan yang signifikan kadar IL-10 pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. ($p=0,000$). Pada penelitian ini kadar IL-10 serum lebih tinggi secara signifikan pada kelompok yang mendapat *stem cells* dibandingkan yang tidak diberi *stem cells*.

Penanaman jaringan allogenik pada tubuh makhluk hidup umumnya akan memicu reaksi imunologis. Kerusakan jaringan yang ditimbulkan oleh luka insisi umumnya juga akan memicu reaksi inflamasi, yang berarti

naiknya kadar interferon γ dalam serum dan kadar IL 10 yang turun.

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) memiliki kemampuan sebagai imunomodulator. Transplantasi allogenik MSCs memodulasi produksi sitokin dengan menghambat maturasi sel dendritik serta aktivasi sel T.¹¹

Efek imunomodulator MSCs juga bekerja melalui penghambatan aktivasi dan proliferasi sel T, menghambat diferensiasi sel B menjadi sel plasma, menghambat proliferasi sel NK, menghambat maturasi sel dendritik. MSCs dapat berperan sebagai anti inflamasi yang poten dengan cara menstimulasi sekresi sitokin anti inflamasi, IL-10, dan menekan pembentukan interferon- γ (IFN- γ) yang diproduksi oleh plasmacytoid dendritic cells (pDCs).⁶² Interleukin 10 memiliki dua efek penting pada sel imun yaitu menghambat reaksi inflamasi serta mencegah reaksi imunologis yang tidak terkontrol.

Transplantasi jaringan dapat memicu reaksi rejeksi (*Graft Versus Host Disease*) serta reaksi inflamasi. Peran MSCs allogenik dalam rekayasa jaringan tidak saja sebagai imunomodulator dalam mengurangi resiko terjadinya GVHD, namun juga meminimalkan reaksi inflamasi yang tidak diinginkan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *Bone marrow derived mesenchymal stem cell* (MSCs) allogenik menimbulkan peningkatan jumlah interleukin 10 (IL 10) pada serum kelinci. *Bone marrow derived mesenchymal stem cell* (MSCs) allogenik tidak menimbulkan peningkatan jumlah

sel limfosit, monosit *polimorphonuclear* (PMN) bila ditanam pada otot femur kelinci.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–147.
2. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood) 2001;226:507–520.
3. Barry L, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568–584.
3. Barry L, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568–584.
4. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235–242.
5. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211–228.
6. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC: Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003; 75:389–397.
7. Nasef A, Mathieu N, Chapel A, Frick J, Francois S, Mazurier C, Boutarfa A, Bouchet S, Gorin NC, Thierry D, Fouillard L: Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation* 2007; 84:231–237.
8. Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J: Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I and II mismatched recipient mice. *Blood* 2005;106:4057–4065.
9. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE: Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a non myeloablative setting. *Blood* 2006;108:2114–2120.
10. Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, Hsu SC, Smith J, Prockop DJ: Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *J Mol Ther* 2004; 9:747–756.
11. Aggarwal S, Pittenger MF: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105:1815–1822.
12. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM: Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99:3838–3843.

Saran

Penelitian lebih lanjut mengenai peran MSCs sebagai agen anti inflamasi dan penggunaan klinisnya.

13. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F: Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105:2821–2827.
14. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F: Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101:3722–3729.
15. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K: Mesenchymal stem cell inhibit lymphocytes proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005; 305:33–41.
16. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F: Role of the IFN- γ in the immunomodulatory activity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells* 2005; 24:386–398.
17. Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON: Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol* 2005; 33:928–934.
18. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D: Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; 103:4619–4621.
19. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Pence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noël D: Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 2007;25:2025–2032.
20. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N: Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105:4120–4126.
21. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J: Human mesenchymal stem cell alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105:2214–2219.
22. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K: Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007;109:228–234.
23. Cabannes D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Soulillou JP, Anegón I, Cuturi MC: A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; 110:3691–3694.
24. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F: HLA-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T-lymphocyte and NK function and to induce CD4 + CD25 high FOXP3+ regulatory T cells. *Stem Cells* 2008; 26:212–222.
25. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili` L, Manuelli C, Frosali F, Mazzinghi B, Maggi L, Pasini A, Lisi V, Santarlasci V, Consoloni L, Angelotti ML, Romagnani P, Parronchi P, Krampera

- M, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F: TLR3 and TLR4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing notch signalling. *Stem Cells* 2008; 26:279–289.
26. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringden O: Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol* 2007; 65:336–343.
 27. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A: Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107:367–372.
 28. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16: 557–64.
 29. Koc, ON, Gerson SL, Cooper BW et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfection of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18: 307–16.
 30. Koc, ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 2002; 30: 215–22.
 31. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; 5: 309–13.
 32. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8932–7.
 33. Le Blanc K, Göthertström C, Ringden O et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*. 2005; 79: 1607–14.
 34. Lee ST, Jang JH, Cheong JW et al. Treatment of high-risk acute myelogenous leukaemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of T cell-depleted haematopoietic stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leucocyte antigen haplotype. *Br J Haematol* 2002; 118: 1128–31.
 35. Le Blanc K, Gustafsson B, Remberger M et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007; in press.
 36. Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D et al. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia* 2003; 17: 474–6.

37. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363:1439–41.
38. Cahill RA, Jones OY, Klemperer M et al. Replacement of recipient stromal / mesenchymal cells after bone marrow transplantation using bone fragments and cultured osteoblast-like cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10: 709–17
39. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 389–98.
40. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006; 81: 1390–7.
41. Ringden O, Uzunel M, Sundberg B et al. Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon. *Leukaemia* 2007; inpress.
42. Ahmad Z, Wardale J, Brooks R, Henson F, Noorani A, Rushton N. Exploring the Application of Stem Cells in Tendon Repair and Regeneration. *Arthroscopy*. 2012 Feb 28.
43. Rackwitz L, Eden L, Reppenhagen S, Reichert JC, Jakob F, Walles H, Pullig O, Tuan RS, Rudert M, Nöth U. Stem cell- and growth factor-based regenerative therapies for avascular necrosis of the femoral head. *Stem Cell Res Ther*. 2012 Feb 22;3(1):7.
44. Chen BY, Wang X, Chen LW, Luo ZJ. Molecular Targeting Regulation of Proliferation and Differentiation of the Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells or Mesenchymal Stromal Cells. *Curr Drug Targets*. 2012 Jan 17
45. Ban DX, Ning GZ, Feng SQ, Wang Y, Zhou XH, Liu Y, Chen JT. Combination of activated Schwann cells with bone mesenchymal stem cells: the best cell strategy for repair after spinal cord injury in rats. *Regen Med*. 2011 Nov;6(6):707-20.
46. Kanitkar M, Tailor HD, Khan WS. The use of growth factors and mesenchymal stem cells in orthopaedic. *Open Orthop J*. 2011;5 Suppl 2:271-5.
47. Zhao Z, Hao C, Zhao H, Liu J, Shao L. Injectable allogeneic bone mesenchymal stem cells: a potential minimally invasive therapy for atrophic nonunion. *Med Hypotheses*. 2011 Nov;77(5):912-3.
48. Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2:S77-81.
49. Peng J, Wang Y, Zhang L, Zhao B, Zhao Z, Chen J, Guo Q, Liu S, Sui X, Xu W, Lu S. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a Schwann-cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Brain Res Bull*. 2011 Feb 28;84(3):235-43.
50. Yamada Y, Ito K, Nakamura S, Ueda M, Nagasaka T. Promising cell-based therapy for bone regeneration using

- stem cells from deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow. *Cell Transplant*. 2011;20(7):1003-13.
51. McCarty RC, Xian CJ, Gronthos S, Zannettino AC, Foster BK. Application of autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells to an ovine model of growth plate cartilage injury. *Open Orthop J*. 2010 Jun 23;4:204-10.
 52. Reichert JC, Woodruff MA, Friis T, Quent VM, Gronthos S, Duda GN, Schütz MA, Hutmacher DW. Bovine bone- and marrow-derived progenitor cells and their potential for scaffold-based bone tissue engineering applications in vitro and in vivo. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010 Oct;4(7):565-76.
 53. Hendrich C, Franz E, Waertel G, Krebs R, Jäger M. Safety of autologous bone marrow aspiration concentrate transplantation: initial experiences in 101 patients. *Orthop Rev (Pavia)*. 2009 Oct 10;1(2):e32.
 54. Ebert R, Zeck S, Krug R, Meissner-Weigl J, Schneider D, Seefried L, Eulert J, Jakob F. Pulse treatment with zoledronic acid causes sustained commitment of bone marrow derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation. *Bone*. 2009 May;44(5):858-64.
 55. Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009 Jan;234(1):1-9. Review.
 56. Liu TM, Wu YN, Guo XM, Hui JH, Lee EH, Lim B. Effects of ectopic Nanog and Oct4 overexpression on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Sep;18(7):1013-22.
 57. Kanamoto T, Nakamura N, Nakata K, Yoshikawa H. Articular cartilage regeneration using stem cells. *Clin Calcium*. 2008 Dec;18(12):1744-9. Review. Japanese.
 58. Barachini S, Trombi L, Danti S, D'Alessandro D, Battolla B, Legitimo A, Nesti C, Mucci I, D'Acunto M, Cascone MG, Lazzeri L, Mattii L, Consolini R, Petrini M. Morpho-functional characterization of human mesenchymal stem cells from umbilical cord blood for potential uses in regenerative medicine. *Stem Cells Dev*. 2009 Mar;18(2):293-305.
 59. Sun X, Gan Y, Tang T, Zhang X, Dai K. In vitro proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells cultured in autologous plasma derived from bone marrow. *Tissue Eng Part A*. 2008 Mar;14(3):391-400.
 60. Tokumoto S, Sotome S, Torigoe I, Omura K, Shinomiya K. Effects of cryopreservation on bone marrow derived mesenchymal cells of a nonhuman primate. *J Med Dent Sci*. 2008 Mar;55(1):137-43.
 61. Niemeyer P, Krause U, Kasten P, Kreuz PC, Henle P, Südkam NP, Mehlhorn A. Mesenchymal stem cell-based HLA-independent cell therapy for tissue engineering of bone and cartilage. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006 Jan;1(1):21-7.
 62. Review. El Haddad N. Mesenchymal Stem Cells: Immunology and Therapeutic Benefit. *Stem Cells in Clinic and Research*. 2011. Ch 3: 59-82. USA.