

PENAMBAHAN INTERLEUKIN-6 PADA MEDIA KULTUR MENINGKATKAN KONSENTRASI PROTEIN PADA MEDIA TERKONDISI SEL PUNCA MESENKIMAL

ADDITION OF INTERLEUKIN-6 TO CULTURE MEDIUM IMPROVES PROTEIN CONCENTRATION IN CONDITIONED MEDIUM MESENCHYMAL STEM CELLS

Marsudi Siburian¹, Nor Sri Inayati²

¹Program Studi Teknik Biomedis, Institut Teknologi Sumatera

²Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Jenderal Soedirman

Korespondensi: author 1. Alamat email: marsudi.siburian@bm.itera.ac.id

ABSTRAK

Pengobatan regeneratif menggunakan Media Terkondisi Sel Punca Mesenkimal (MTSPM) merupakan salah satu metode yang dikembangkan untuk pengobatan Diabetes Melitus (DM). Pengembangan metode produksi MTSPM perlu dilakukan untuk meningkatkan efikasi, salah satunya dengan menginduksi sekresi dari sel punca mesenkimal (SPM) menggunakan senyawa penanda dari penyakit DM yaitu Interleukin-6 (IL-6). Penelitian ini bertujuan untuk menguji efek dari penambahan IL-6 pada media kultur terhadap kultur SPM dan konsentrasi protein pada MTSPM yang dihasilkan. Kultur SPM dilakukan pada temperatur 37°C dan 5% CO₂. Kultur SPM dibagi menjadi tiga kelompok yang diberi media tumbuh berbeda, kelompok I dikultur pada media basal, kelompok II dengan media basal + 1pg/mL IL-6, dan kelompok III dengan media basal +10pg/mL IL-6. Pengujian efek IL-6 dilakukan dengan melakukan penghitungan jumlah SPM pada kultur dan pengukuran total protein pada MTSPM menggunakan metode Qubit Fluorometer. Hasil pengukuran dianalisa secara statistik dengan uji One Way Anova, Kruskal Wallis dan Mann Whitney. Hasil pengujian menunjukkan pemberian IL-6 mampu meningkatkan jumlah sel pada kultur SPM. Total protein pada MTSPM mengalami peningkatan hingga 65% dan 262% untuk 24 jam pertama dan kedua ketika diberi penambahan IL-6 dengan konsentrasi 10pg/mL. Hal ini menunjukkan terdapat lebih banyak senyawa sitokin dan faktor tumbuh dalam MTSPM yang dihasilkan sehingga terdapat kemungkinan terjadinya peningkatan efikasi dari MTSPM tersebut saat dipergunakan dalam terapi DM. Tetapi hal tersebut perlu diteliti lebih lanjut dengan melihat profil sitokin dan faktor tumbuh dalam MTSPM dan juga dilanjutkan dengan uji in vivo pada hewan model DM.

Kata Kunci: Sel Punca Mesenkimal, Interleukin-6, Media Terkondisi.

ABSTRACT

Regenerative medicine using Conditioned Medium-Mesenchymal Stem Cell (CMMSCs) is one of the developed methods for the treatment of Diabetes Mellitus (DM). However, the method to produce CMMSCs still needs to be developed to increase its efficacy, one of which is by inducing secretion from mesenchymal stem cells (MSCs) using marker compounds in DM, such as Interleukin-6 (IL-6). This study aims to examine the effect of Interleukin-6 (IL-6) in the growth medium on the culture of MSCs and the concentration of protein on CMMSCs. The MSCs were cultured at 37°C and 5% CO₂. Culture of MSCs grouped into three which were given different growth mediums, group I cultured in basal medium, group II cultured in basal medium + 1pg/mL IL-6, and group III cultured in basal medium +10pg/mL IL-6. Tests were carried out by calculating the amount of MSCs in culture and measuring the total protein on CMMSCs using the Qubit Fluorometer method. Results were analyzed statistically using the One Way Anova test, Kruskal Wallis, and Mann Whitney test. The results showed that the addition of IL-6 was able to increase the number of cells in the MSCs culture. Total protein in CMMSCs increased up to 65% and 262% for the first and second 24 hours when given the addition of IL-6 at a concentration of 10pg/mL. This shows that there are more cytokine compounds and growth factors in the resulting CMMSC, therefore there is a possibility of an increase in efficacy from the CMMSC when used to treat DM. However, it needs further research to evaluate the cytokine and growth factor profile of the CMMSC and followed up with an in vivo trial using the DM animal model.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, Interleukin-6, Conditioned Medium.

How To Cite: Siburian, M., & Inayati, N. (2021). PENAMBAHAN INTERLEUKIN-6 PADA MEDIA KULTUR MENINGKATKAN KONSENTRASI PROTEIN PADA MEDIA TERKONDISI SEL PUNCA MESENKIMAL. *Biomedika*, 13(2), 144-152. doi:<https://doi.org/10.23917/biomedika.v13i2.12881>

DOI: <https://doi.org/10.23917/biomedika.v13i2.12881>

PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) merupakan kelompok penyakit metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia yang disebabkan oleh gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Jumlah penderita DM di Indonesia diperkirakan mencapai 21,3 juta pada tahun 2030 (Khairani, Kurniasih dan Maula, 2019). Salah satu metode yang dikembangkan untuk pengobatan DM adalah pengobatan regeneratif dengan memanfaatkan sel punca (Tiwari, 2015). Jenis sel punca yang banyak dikembangkan untuk pengobatan adalah sel punca mesenkimal (SPM), yang secara etika lebih dapat diterima dibandingkan dengan sel punca embrionik (Rickard, 2002).

Pemanfaatan SPM dalam pengobatan dapat dilakukan dengan menggunakan SPM secara langsung ataupun dengan menggunakan senyawa sitokin hasil sekresi SPM yang disebut dengan Media Terkondisi Sel Punca Mesenkimal (MTSPM). Penggunaan MTSPM dilaporkan dapat menyebabkan perbaikan jaringan pada berbagai kondisi kerusakan jaringan/organ (da Silva Meirelles *et al.*, 2009; Madrigal, Rao dan Riordan, 2014). Beberapa kelebihan penggunaan MTSPM dibandingkan dengan penggunaan sel punca secara langsung

antara lain: pertimbangan keamanan dan etika yang lebih longgar karena tidak melibatkan transplantasi sel hidup; MTSPM dapat dievaluasi keamanan, dosis, dan potensinya seperti agen farmasi konvensional; tidak memerlukan *cryopreservative* (yang berpotensi toksik untuk jangka waktu yang lama) tanpa mengurangi potensi produk; lebih ekonomis dan praktis untuk aplikasi klinik; dapat diproduksi secara massal; dan dapat dimodifikasi sesuai efek spesifik yang diinginkan (Vizoso *et al.*, 2017).

Penelitian terkait pembuatan MTSPM telah dilakukan dengan berbagai variasi dan modifikasi. Variasi dan modifikasi menyebabkan perbedaan media terkondisi yang dihasilkan, baik secara jumlah maupun komposisinya. Salah satu variasi metode pembuatan MTSPM adalah dengan penambahan senyawa penanda penyakit dalam media kultur SPM. Hal ini dapat terjadi karena sekresi dari suatu sel, termasuk SPM, akan dipengaruhi oleh sinyal yang terdapat pada lingkungan hidup sel tersebut (Vizoso *et al.*, 2017).

Proses pembuatan MTSPM yang dipergunakan dalam terapi DM dapat dimodifikasi dengan melakukan penambahan senyawa penanda DM pada media tumbuh SPM.

Penanda perkembangan penyakit DM adalah meningkatnya kadar glukosa dan terjadinya inflamasi pada pankreas yang ditandai senyawa pro-inflamasi, seperti senyawa *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF- α), *Interferon gamma* (IFN- γ), Interleukin (IL) - 1 β , IL-6 (Nunemaker, 2016; Shin et al., 2015; Tsalamandris et al., 2019). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pemberian senyawa berupa faktor inflamasi seperti TNF- α , IFN- γ , dan IL-1 β dapat meningkatkan potensi regeneratif dan memperbaiki respon antiinflamatori dari SPM melalui perubahan atau peningkatan sekresi sitokin atau faktor tumbuh tertentu (Ryan et al., 2007; Kwon et al., 2013; Noone et al., 2013; Luo dan Zheng, 2016; Redondo-Castro et al., 2017; Rodriguez et al., 2019). Namun belum didapati laporan penelitian terkait penggunaan IL-6 sebagai senyawa stimulan SPM dalam produksi MTSPM. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilihat pengaruh dari penambahan senyawa IL-6 dalam media kultur terhadap jumlah sel yang dihasilkan dan jumlah protein total dalam MTSPM.

METODE

Persiapan dan Perbanyakan Sel (Sun et al., 2017). Sel Punca Mesenkimal yang

dipergunakan berasal dari jaringan tali pusat dan merupakan koleksi Stem Cell And Cancer Institute, Kalbe Farma Tbk.. SPM yang berasal dari jaringan tali pusat dikultur pada media basal α -MEM yang diberi penambahan 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS), 1% Penisilin/Streptomisin (P/S) pada 37°C, 5% CO₂. Setiap 3 hari sekali dilakukan penggantian media kultur. Subkultur SPM dilakukan saat SPM sudah konfluen $\pm$ 80%.

Perlakuan Sel dan Produksi MTSPM

(Li et al., 2017 dengan modifikasi). SPM disubkultur dan dibagi menjadi 3 kelompok. Setelah konfluen (80%), SPM diberi perlakuan seperti terlihat pada tabel 1. Setiap 24 jam, media terkondisi sel punca mesenkimal dikumpulkan dalam tabung steril, kemudian disaring dan disimpan pada temperatur -80°C.

Kelompok	Jumlah Sampel (cawan)	Perlakuan
I	2	Media digantikan dengan media basal α -MEM tanpa serum. Pengumpulan media dilakukan setiap 24 jam lalu diberi penambahan media baru sesuai kelompok perlakuan hingga 2 x 24 jam.
II	2	Media digantikan dengan media basal α -MEM tanpa serum + 1 pmol/L IL-6, Pengumpulan media dilakukan setiap 24 jam lalu diberi penambahan media baru sesuai kelompok perlakuan hingga 2 x 24 jam.

III	2	Media digantikan dengan media basal α -MEM tanpa serum + 10 pmol/L IL-6. Pengumpulan media dilakukan setiap 24 jam lalu diberi penambahan media baru sesuai kelompok perlakuan hingga 2 x 24 jam.
-----	---	--

Penghitungan Jumlah Sel. Perhitungan sel dilakukan sesuai metode dari Abcam. Suspensi sel sebanyak 20 μ L dicampurkan dengan 20 μ L trypan blue. Lalu pipetkan 20 μ L campuran ke ruang hitung hemositometer. Hitung sel di bawah mikroskop pada 4 kamar hitung, yang masing-masing terdiri dari 16 kotak. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\Sigma \text{ sel/mL} = \frac{\Sigma \text{ sel 1} + \Sigma \text{ sel 2} + \Sigma \text{ sel 3} + \Sigma \text{ sel 4}}{2} \times 10^4$$

Pengukuran Protein Total. Sampel MTSPM diukur kadar protein totalnya dengan menggunakan metode Qubit Fluorometer.

Analisis Data (Dahlan, 2018). Analisis data dilakukan dengan menggunakan software IBM SPSS Statistics 23. Distribusi data diuji dengan uji Shapiro-wilk. Data normal diuji dengan One Way Anova, sedangkan data yang tidak terdistribusi normal diuji dengan Kruskal Wallis dan Mann Whitney.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur dan Jumlah SPM. Kultur Sel Punca Mesenkimal (SPM) yang berasal dari jaringan tali pusat atau yang lebih dikenal dengan *Umbilical Cord-Mesenchymal Stem Cells*, berhasil dikultur dengan menggunakan media komplet yang terdiri dari MEM- α , FBS 10%, dan P/S 1%. Kultur yang diamati memiliki karakteristik sesuai dengan karakteristik kultur SPM yaitu melekat pada tempat tumbuhnya, berbentuk spindle, dan memanjang (Ryu et al., 2013) (Gambar 1).

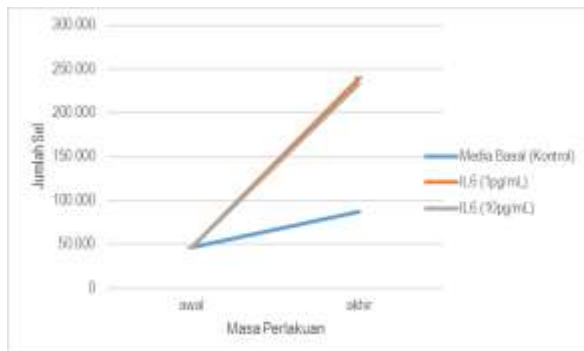


Gambar 1. Kultur sel punca mesenkimal yang diamati dengan perbesaran 100x.

Pengumpulan MTSPM dilakukan dengan mengkultur SPM pada media basal tanpa serum. Selain itu, dilakukan juga penambahan senyawa IL-6 pada media kultur untuk melihat pengaruh senyawa IL-6, yang merupakan salah satu senyawa inflamasi penanda perkembangan DM. Penambahan dilakukan dalam dua konsentrasi, yaitu 1pg/mL dan 10pg/mL. Konsentrasi 1pg/mL merupakan konsentrasi senyawa IL-6

pada jaringan normal, sedangkan konsentrasi 10pg/mL merupakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menyebabkan disfungsi islet pada DM Tipe 2 (Nunemaker, 2016).

Di akhir masa perlakuan dilakukan penghitungan jumlah sel untuk melihat apakah penambahan IL-6 mempengaruhi proliferasi SPM. Hasil menunjukkan bahwa SPM yang diberi IL-6 memiliki jumlah sel lebih tinggi dibandingkan dengan SPM yang dikultur pada media tanpa serum (Gambar 2). Interleukin-6 diduga berperan dalam regulasi proliferasi dari sel punca.



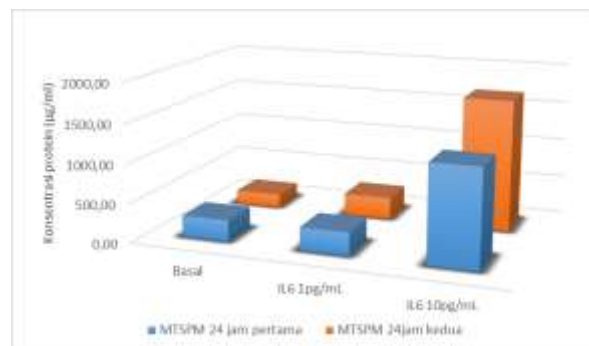
Gambar 2. Pemberian IL-6 meningkatkan jumlah sel, memicu proliferasi.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penambahan IL-6, dengan konsentrasi 10ng/mL, pada kultur SPM dari jaringan adiposa dapat meningkatkan proliferasi melalui aktivasi jalur *Ras-dependent extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2 (Pricola et al., 2009). Selain itu defisiensi dari IL-6 diketahui menyebabkan gangguan pada kemampuan

proliferasi sel punca (Pricola et al., 2009; Tie et al., 2019). Perbedaan jumlah sel tentu saja akan berdampak pada konsentrasi senyawa sitokin dan faktor tumbuh yang disekresikan oleh SPM kedalam media kultur.

Penambahan IL-6 dan Sekresi Protein.

Total protein tersekresikan pada media yang diberi penambahan IL-6 10pg/mL, yang merupakan konsentrasi pada keadaan DM, lebih tinggi dibanding perlakuan lain ($p_{value}=0.00$) (Gambar 3).

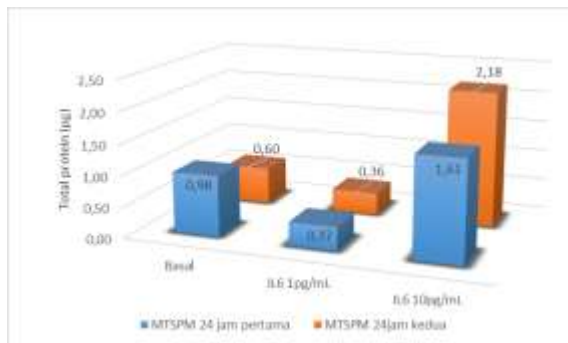


Gambar 3. Total Protein MTSPM: Total protein yang diberi penambahan IL-6 lebih tinggi dibandingkan basal.

Sedangkan pada kelompok II dengan penambahan IL-6 pada konsentrasi normal (1pg/mL) menghasilkan total protein yang tidak berbeda signifikan dengan kultur SPM di media basal pada 24 jam pertama ($p_{value}=0.41$) dan berbeda signifikan pada 24 jam kedua ($p_{value}=0.00$). Untuk melihat apakah penambahan IL-6 memberikan efek pada jumlah protein tersekresikan maka dilakukan penghitungan

jumlah protein tersekresikan per sel pada tiap perlakuan.

Hasil perbandingan total protein dan jumlah sel menunjukkan bahwa penambahan IL-6 ke dalam media kultur SPM berpengaruh terhadap sekresi protein dari sel (Gambar 4).



Gambar 4. Total protein tersekresikan per sel. Rata-rata tiap sel pada kultur dengan penambahan IL-6 10pg/mL mensekresikan protein lebih banyak dibanding sel pada kelompok lainnya. $p_{value}=0.00$; Berbeda signifikan jika $p_{value} < 0.05$.

Penambahan IL-6 sebanyak 1pg/mL ke dalam media kultur menurunkan sekresi protein, dengan rata-rata protein yang disekresikan tiap SPM adalah 0,37pg untuk 24 jam pertama dan 0,36pg untuk 24 jam kedua. Nilai tersebut lebih rendah dan berbeda signifikan dengan rata-rata protein tersekresikan pada kelompok basal, yaitu 0,98pg dan 0,6pg, ($p_{value}=0.00$). Hal berbeda ditunjukkan pada kelompok penambahan IL-6 10pg/mL, total protein yang disekresikan SPM pada media tumbuhnya lebih tinggi dibanding dua perlakuan lainnya. Rata-rata protein yang disekresikan oleh tiap sel untuk kelompok

perlakuan IL-6 10pg/mL adalah yaitu 1,61pg/sel dan 2,18pg/sel. Jika dibandingkan dengan kelompok I, maka konsentrasi protein pada kelompok III meningkat sebanyak 65% pada 24 jam pertama dan 242% pada 24 jam kedua.

Selain itu, hasil penelitian menunjukkan bahwa total protein tersekresikan pada 24 jam pertama dan 24 jam kedua berbeda nyata pada kelompok I dan III ($p_{value}=0.00$), sedangkan pada kelompok II total protein tersekresikan tidak berbeda nyata ($p_{value}=0.63$). Hasil ini menunjukkan terjadinya perubahan pola sekresi protein pada SPM setelah 24 jam pertama pengumpulan MTSPM. Hal ini dapat disebabkan oleh perubahan metabolisme sel akibat berkurangnya sumber protein yang dapat dipergunakan oleh sel untuk proses metabolismenya karena dalam proses pengumpulan MTSPM tidak dilakukan penambahan fbs ke dalam media kultur. Hasil berbeda dari kelompok II dapat disebabkan oleh rendahnya sekresi protein sehingga di 24 jam kedua masih dapat mensekresikan protein dengan jumlah yang sama dengan 24 jam pertama.

Interleukin-6 diketahui dapat mempengaruhi ekspresi gen melalui beberapa

jalur persinyalan, diantaranya melalui jalur *Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK/STAT) melalui aktivasi glikoprotein 130 (gp130) yang kemudian mengaktivasi *Signal Transducer And Activator Of Transcription 3* (STAT3), melalui jalur *Ras/Mitogen Activated Protein Kinase* (Ras/MAPK) melalui aktivasi protein *growth factor receptor-binding* (Grb2) dan shc yang akan meningkatkan aktivitas fosforilasi dari protein serin/treonin kinase, dan melalui jalur *Phosphatidylinositol-3-Kinase/Protein Kinase B* (PI3K/Akt) melalui perantara protein gp130 yang kemudian memfosforilasi berbagai target yang meregulasi diferensiasi sel dan kemampuan bertahan hidup dari sel (Luo dan Zheng, 2016). Penelitian lainnya melaporkan bahwa terdapat 807 ekspresi gen yang dipengaruhi oleh konsentrasi IL-6 pada tubuh manusia (Lin et al., 2014). Penelitian lain menggunakan kultur sel endotelial menunjukkan bahwa peredaman ekspresi IL-6 mempengaruhi 42 ekspresi gen, diantaranya terdapat 8 gen penyandi sitokin yaitu FGF2, HGF, CXCL2, TGFB1, GAS6, IL1A, CXCL11, TNFSF4 (Ljungberg et al., 2020).

Berdasarkan hasil penelitian ini dan literatur penelitian terkait peranan IL-6 pada sel,

dapat diartikan bahwa perbedaan konsentrasi IL-6 dapat menyebabkan perubahan kemampuan proliferasi SPM dan juga kemampuan dalam sekresi sel. Penambahan IL-6 dengan konsentrasi 1pmol/mL menyebabkan peningkatan kemampuan proliferasi tetapi menyebabkan ekspresi protein yang dapat disekresikan berkurang. Sedangkan penambahan IL-6 dengan konsentrasi 10pmol/mL menyebabkan peningkatan proliferasi dan peningkatan sekresi protein dari SPM.

SIMPULAN DAN SARAN

Kultur sel punca mesenkimal dengan penambahan IL-6 10pg/ml menghasilkan peningkatan jumlah sel pada kultur dan total protein yang lebih tinggi pada MTSPM dibandingkan dengan kultur menggunakan media basal dan IL-6 1pg/ml. Total protein yang dihasilkan lebih tinggi 65% dan 262% pada MTSPM 24 jam pertama dan kedua dibandingkan dengan kultur yang hanya diberi media basal. Hal ini menunjukkan terdapat lebih banyak senyawa sitokin dan faktor tumbuh dalam MTSPM yang dihasilkan sehingga terdapat kemungkinan terjadinya peningkatan efikasi dari MTSPM tersebut saat dipergunakan dalam terapi. Tetapi hal tersebut perlu diteliti lebih lanjut dengan melihat profil sitokin dan

faktor tumbuh dalam MTSPM dan juga dilanjutkan dengan uji *in vivo* pada hewan model DM.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kemenristek/BRIN yang telah membiayai penuh penelitian ini, sesuai dengan kontrak penelitian No. 009/SP2H/LT/DRPM/2020. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Stem Cell And Cancer Institute, Kalbe Farma Tbk. yang sudah bersedia memberikan sampel sel punca mesenkimal.

DAFTAR PUSTAKA

da Silva Meirelles, L., Fontes, A.M., Covas, D.T., Caplan, A.I., 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.002>

Dahlan, S.M., 2018. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan, 5th ed. Salemba Medica, Jakarta.

Khairani, Kurniasih, N., Maula, R., 2019. InfoDATIN 2018. Pus. Data dan Inf. Kementerian. Kesehat. RI 1–10.

Kwon, Y.W., Heo, S.C., Jeong, G.O., Yoon, J.W., Mo, W.M., Lee, M.J., Jang, I.H., Kwon, S.M., Lee, J.S., Kim, J.H., 2013. Tumor necrosis factor- α -activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and

angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1832, 2136–2144. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.08.002>

Li, P., Zhou, H., Di, G., Liu, J., Liu, Y., Wang, Z., Sun, Y., Duan, H., Sun, J., 2017. Mesenchymal stem cell-conditioned medium promotes MDA-MB-231 cell migration and inhibits A549 cell migration by regulating insulin receptor and human epidermal growth factor receptor 3 phosphorylation. *Oncol. Lett.* 13, 1581–1586. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5641>

Lin, H., Joehanes, R., Pilling, L.C., Dupuis, J., Lunetta, K.L., Ying, S.-X., Benjamin, E.J., Hernandez, D., Singleton, A., Melzer, D., Munson, P.J., Levy, D., Ferrucci, L., Murabito, J.M., 2014. Whole Blood Gene Expression and Interleukin-6 Levels. *Genomics* 104, 490–495. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.10.003>

Ljungberg, L.U., Zegeye, M.M., Kardeby, C., Fälker, K., Repsilber, D., Sirsjö, A., 2020. Global Transcriptional Profiling Reveals Novel Autocrine Functions of Interleukin 6 in Human Vascular Endothelial Cells. *Mediators Inflamm.* 2020, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/4623107>

Luo, Y., Zheng, S.G., 2016. Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: Interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Front. Immunol.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00604>

Madrigal, M., Rao, K.S., Riordan, N.H., 2014. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J. Transl. Med.* 12, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0260-8>

Noone, C., Kihm, A., English, K., O'Dea, S., Mahon, B.P., 2013. IFN- γ stimulated human umbilical-tissue-derived cells potently suppress NK activation and resist NK-mediated cytotoxicity in vitro. *Stem Cells Dev.* 22, 3003–3014. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0028>

Nunemaker, C.S., 2016. Considerations for Defining Cytokine Dose, Duration, and

- Milieu That Are Appropriate for Modeling Chronic Low-Grade Inflammation in Type 2 Diabetes. *J. Diabetes Res.* 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/2846570>
- Pricola, K.L., Kuhn, N.Z., Haleem-Smith, H., Song, Y., Tuan, R.S., 2009. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. *J. Cell. Biochem.* 108, 577–588. <https://doi.org/10.1002/jcb.22289>
- Redondo-Castro, E., Cunningham, C., Miller, J., Martuscelli, L., Aoulad-Ali, S., Rothwell, N.J., Kielty, C.M., Allan, S.M., Pinteaux, E., 2017. Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0531-4>
- Rickard, M., 2002. Key Ethical Issues in Embryonic Stem Cell Research. *Inf. Res. Serv.* 1–15.
- Rodriguez, L.A., Mohammadipoor, A., Alvarado, L., Kamucheka, R.M., Asher, A.M., Cancio, L.C., Antebi, B., 2019. Preconditioning in an Inflammatory Milieu Augments the Immunotherapeutic Function of Mesenchymal Stromal Cells. *Cells* 8, 1–31. <https://doi.org/10.3390/cells8050462>
- Ryan, J.M., Barry, F., Murphy, J.M., Mahon, B.P., 2007. Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* 149, 353–363. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03422.x>
- Ryu, Y.J., Cho, T.J., Lee, D.S., Choi, J.Y., Cho, J., 2013. Phenotypic characterization and in vivo localization of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Mol. Cells* 35, 557–564. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0112-z>
- Shin, J.J., Lee, E.K., Park, T.J., Kim, W., 2015. Damage-associated molecular patterns and their pathological relevance in diabetes mellitus, *Ageing Research Reviews.* Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.06.004>
- Sun, L., Li, D., Song, K., Wei, J., Yao, S., Li, Z., Su, X., Ju, X., Chao, L., Deng, X., Kong, B., Li, L., 2017. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis in vitro. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02786-x>
- Tie, R., Li, H., Cai, S., Liang, Z., Shan, W., Wang, B., Tan, Y., Zheng, W., Huang, H., 2019. Interleukin-6 signaling regulates hematopoietic stem cell emergence. *Exp. Mol. Med.* 51, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0320-5>
- Tiwari, P., 2015. Recent trends in therapeutic approaches for diabetes management: A comprehensive update. *J. Diabetes Res.* 2015, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/340838>
- Tsalamandris, S., Antonopoulos, A.S., Oikonomou, E., Papamikroulis, G.A., Vogiatzi, G., Papaioannou, S., Devereux, S., Tousoulis, D., 2019. The role of inflammation in diabetes: Current concepts and future perspectives. *Eur. Cardiol. Rev.* 14, 50–59. <https://doi.org/10.15420/ecr.2018.33.1>
- Vizoso, F.J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J., Perez-Fernandez, R., 2017. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 18.