

Pengaruh Fibronektin pada Kultur Sel Punca Limbal (SPL) Tikus

Ratih Rinendya Putri^{1*}, Frans Dany¹, Lutfah Rifati²

¹ Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan
Kementerian Kesehatan
email: ratih79@yahoo.com

Abstract

Availability of limbus stem cells (LSC) is very limited considering the number of donors SCL very less as compared to the needs, so it is necessary LSC production *in vitro*. The success of *in vitro* culture of LSC is strongly influenced by environmental conditions, one of which is the use of the extracellular matrix. Selection of the appropriate type of matrix in the LSC culture, can increase proliferation and facilitate the application of transplantation. This study aimed to get activities fibronectin (FN) as extracellular matrix to produce LSC. Research conducted at the Center for Biomedical and Basic Technology of Health. In this study, production of SPL rats performed *in vitro* using the method of explants on a petri dish with FN as the extracellular matrix. SPL proliferation rate that with and without FN analyzed by calculating the population doublings (PD), PD/day and the population doubling time (PDT). SPL characterization was performed by quantifying RNA of CD90 gene, p63, ABCG2 and Krt12 as a marker SPL. The results showed that the PD, PD/day PDT in the SPL with and without FN respectively are 2.13 and 2.11, 0.44 and 0.42, 57.65 and 61.46 ($p > 0.05$). While the RNA quantitative of CD90, p63, ABCG2 and Krt12 SPL on with and without of FN respectively are 17.70 and 19.75, 17.08 and 18.42, 15.23 and 19.09, 17.42 and 18.85 ($p > 0.05$). This shows that the FN isn't effective as an extracellular matrix in *in vitro* culture SPL.

Keywords: limbal stem cells, amniotic membrane, fibronectin

Abstrak

Produksi sel punca limbal (SPL) secara *in vitro* dapat dilakukan untuk memenuhi ketersediaan donor SPL. Keberhasilan kultur *in vitro* pada SPL sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti medium kultur dan penggunaan matriks ekstraseluler. Berbagai matriks ekstraseluler telah tersedia, namun efikasi dan keamanannya harus diperhatikan. Pemilihan jenis matriks yang tepat dalam kultur SPL dapat meningkatkan proliferasi serta mempermudah dalam aplikasi transplantasi. Penelitian ini bertujuan mengamati pengaruh penambahan fibronektin (FN) sebagai matriks ekstraseluler untuk memproduksi SPL tikus secara *in vitro*. Penelitian dilakukan di Laboratorium stem cell Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Litbangkes. Pada penelitian ini produksi SPL tikus dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode eksplan pada cawan petri dengan FN sebagai matriks ekstraseluler. Tingkat proliferasi SPL pada cawan yang tanpa dan menggunakan FN dianalisis dengan menghitung *population doubling* (PD), PD/hari dan *population doubling time* (PDT). Karakterisasi SPL dilakukan dengan melihat ekspresi gen CD90, ABCG2 dan p63 sebagai marker SPL serta gen Krt12 sebagai marker sel epitel kornea. Hasil penelitian menunjukkan bahwa PD, PDT/hari dan PDT pada SPL yang tanpa dan menggunakan FN secara berturut-turut adalah 2.13, 2.11, 0.44, 0.42 dan 57,65 dan 61,46. Sedangkan kuantitas RNA CD90, p63, ABCG2 dan Krt12 SPL pada tanpa dan penggunaan FN masing-masing adalah 17.70, 19.75, 17.08, 18.42 dan 15.23, 19.09, 17.42, 18.85 ($p > 0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa FN tidak mempengaruhi tingkat proliferasi dan karakteristik SPL tikus.

Kata kunci: sel punca limbal, membran amnion, fibronektin

Pendahuluan

Transplantasi sel punca limbal (SPL) dapat digunakan untuk memperbaiki struktur dan fungsi pada kerusakan jaringan limbus atau kornea.^{1,2,3} Berbagai kerusakan jaringan tersebut dapat disebabkan oleh defisiensi sel punca

limbal, trauma oleh zat kimia atau mekanik. Terapi secara autologus telah dilakukan dengan mengisolasi dan mentransplantasi SPL dari jaringan pasien sendiri, namun ada beberapa pasien yang harus mendapatkan terapi secara allogenik.^{4,5} Pada terapi allogenik

terbatasnya jumlah donor menjadi kendala untuk penyediaan SPL, oleh karena itu pengembangan berbagai medium kultur untuk memproduksi SPL perlu terus dilakukan untuk menjaga ketersediaannya SPL.

Produksi SPL dapat dilakukan dengan menginduksi diferensiasi SPL dari *mesenchymal stem cell* (MSC) yang bersumber dari *embryonic stem cell* (ESC), jaringan lemak dan talipusat (Wharton's Jelly).^{6,7,8} Selain itu SPL juga dapat diproduksi dari jaringan limbus donor.^{2,4} Produksi SPL secara *in vitro* memerlukan beberapa faktor lingkungan yang mendukung proliferasi SPL. Faktor-faktor tersebut antara lain komponen matriks ekstraseluler, asosiasi molekul-molekul membran sel, faktor pertumbuhan dan sitokin yang diperlukan untuk komunikasi antar sel.^{5,7}

Matriks ekstraseluler memiliki peranan penting dalam menjaga karakterisasi sel punca pada saat kultur. Matriks merupakan tempat melekatnya sel dimana sel akan mengawali proses proliferasi atau pembelahan sel.⁹ Pada kultur sel epitel kornea dan SPL, matriks juga berperan sebagai fasilitator terhadap regulasi sel seperti transduksi sinyal, adhesi, migrasi dan diferensiasi.⁹ Matriks ekstraseluler seperti fibrin, gel, gelatin, fibronectin, kolagen, *bovine serum albumin* (BSA), serta membran amnion merupakan matriks yang dapat digunakan dalam kultur sel punca.^{4,10,11,12} Hal yang harus diperhatikan dalam pemilihan jenis matriks adalah kemampuannya untuk mendukung pertumbuhan sel saat kultur, dan manfaat matriks pada saat sel ditransplantasi.

Matriks ekstraseluler yang dapat digunakan pada saat transplantasi adalah membran amnion. Membran amnion merupakan biomatriks ekstraseluler yang dapat menghambat inflamasi, memiliki kemiripan struktur dengan matriks basal konjungtiva, dapat diabsorpsi tubuh secara bertahap dan aman karena tidak menimbulkan penolakan imun resipien.^{4,5}

Penggunaan membran amnion dalam bentuk sediaan segar ataupun sediaan beku telah dilaporkan, di sisi lain penggunaan sediaan membran amnion dalam bentuk simpan beku kering (*freeze dry*) setelah proses deselulerisasi sampai saat ini belum dilaporkan.¹³ Sediaan membran amnion simpan kering beku diperlukan matriks ekstraseluler tambahan seperti kolagen atau glikoprotein. Fibronectin merupakan matriks ekstraseluler golongan glikoprotein yang ada pada jaringan limbus dan kornea fetus dan dapat menginduksi aktifitas mitogen.⁵ Fibronectin (FN) telah digunakan untuk kultur MSC namun belum ada yang melaporkan penggunaan FN untuk kultur SPL.⁹

Penelitian mengenai penggunaan matriks ekstraseluler untuk produksi SPL secara *in vitro* terus dilakukan untuk mendapatkan metode dalam memproduksi SPL yang efektif mengingat pada setiap sumber dan jenis sel membutuhkan matriks ekstraseluler yang berbeda-beda. Oleh sebab itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efektifitas FN sebagai matriks ekstraseluler terhadap proliferasi dan ekspresi genetik SPL tikus secara *in vitro*.

Bahan dan Metode

Isolasi Sel Punca limbal

Sel punca limba (SPL) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan SPL tikus strain *Wistar* jantan atau betina dengan umur 3-4 bulan. Tikus dipelihara dalam kandang kawat dengan pemberian pakan dan minum secara *ad libitum*. Tikus yang diambil organ mata diterminasi dengan melakukan anestesi menggunakan xylazine dosis 0,05mg/kg BB dan ketamin dengan dosis 11mg/kg BB kemudian dilakukan *dislocatio cervicalis*. Organ mata dibawa ke laboratorium menggunakan medium transport (posphat buffer saline/PBS yang mengandung 1% penstrep). Isolasi SPL dilakukan di laboratorium dalam Biosafety Cabinet /BSC II. Organ mata dimasukkan kedalam iodine 1% selama 2 menit kemudian dilakukan isolasi SPL dengan menginisiasi

bagian konjungtiva melingkar kornea terlebih dahulu. Setelah itu dilakukan isolasi SPL yang terdapat diperbatasan antara konjungtiva dan kornea.⁴ Tikus yang sudah diambil organ matanya dimasukkan ke dalam insenerator. Penanganan hewan coba dilakukan oleh dokter hewan yang terlibat dalam penelitian di laboratorium hewan coba Pusat Biomedis dan Teknologi dasar Kesehatan (PBTDK), Balitbangkes.

Sel punca limbal yang diperoleh dicacah menggunakan gunting kemudian dicuci dalam PBS 1% penstrep sebelum dikultur. Sel punca limbal yang telah dipotong kecil dikultur dengan dieksplan pada plate dengan 4 *well* menggunakan medium kultur.

Kultur Sel Punca Limbal

Kultur sel punca limbal dilakukan dengan metode yang dikerjakan oleh Burman dan Sangwan (2000)² dengan sedikit modifikasi. Medium kultur yang digunakan medium α -MEM/F12 dengan 10% FBS, dan suplementasi penstrep 1% ITS (insulin 0,1 mg, transferin 55 μ g/ml, selenium 5 ng/l), EGF/epidermal growth factor (0,01 mg/l), hidro cortisone 0,1 mg/ml) pada suhu 37⁰C, 5% CO₂. Penggantian medium kultur dilakukan setiap 2-3 hari kultur, setelah 13-15 hari kultur dilakukan passase. Pada saat passase dilakukan perhitungan sel dan penanaman kembali pada cawan yang baru.

Setelah pasase ke 2, , SPL dikultur dengan menggunakan membran amnion yang diproduksi oleh BATAN. Membran amnion direndam PBS. Selanjutnya PBS diganti dengan fibronectin dan dilakukan inkubasi selama 18 jam di dalam inkubator 37⁰C. Keesokan harinya, fibronectin dibuang, diganti dengan suspensi SPL dengan jumlah sel 5x10⁵ untuk luas permukaan membran amnion \pm 4,5cm². Penambahan medium dilakukan setelah SPL menempel pada membran amnion, kurang lebih 4 jam setelah sel ditambahkan pada membran.

Menghitung *population doubling* (PD) dan *population doubling time* (PDT) SPL
Penghitungan dilakukan PD dan PDT dilakukan 6 kali pengulangan (3 rangkap). PD merupakan kemampuan SPL pasase 2 melakukan penggandaan dan dihitung dengan persamaan (1). PDT dihitung berdasarkan persamaan (2). Dalam penelitian ini waktu kultur adalah 6 hari (104 jam). Kelompok perlakuan adalah Sel punca limbal (SPL) yang ditanam dalam cawan dengan FN sebagai matriks ekstraseluler sedangkan kelompok kontrol adalah SPL yang ditanam dalam cawan tanpa penambahan fibronectin(FN).

$$PD = \frac{\log_{10}(\text{jumlah sel saat panen}) - \log_{10}(\text{jumlah sel saat ditanam})}{\log_{10}(2)}$$

(1)

$$PDT = \frac{\text{waktu kultur (jam)}}{PD}$$

(2)

Karakterisasi Sel Punca Limbal

Tahap ini diawali dengan tahapan isolasi material genetik berupa RNA (*Ribonucleid Acid*), hal ini bertujuan untuk melihat ekspresi gen CD90, p63, Krt/12 dan ABCG2 pada sampel. Sampel yang dilakukan isolasi RNA adalah Sel punca limbal yang telah dikultur selama 7 hari dengan menggunakan dan tanpa fibronectin. Proses isolasi RNA dilakukan dengan menggunakan manual kit (Qiagen, #52906). Hasil isolasi RNA dilanjutkan dengan uji kualitas menggunakan spektrofotometri yaitu menggunakan NanodropTM, hal ini bertujuan untuk evaluasi hasil isolasi baik konsentrasi maupun kemurniannya. Pengujian kemurnian RNA total dilakukan dengan membandingkan nilai A260 dan A280. Rasio A260/A280 yang baik adalah 1.88-2.00 artinya RNA hasil isolasi bebas dari kontaminasi protein. Hasil spektrofotometri yang positif dilanjutkan dengan proses amplifikasi.

Amplifikasi material genetik RNA dilakukan 2 tahap yaitu 1) pengubahan RNA menjadi cDNA atau RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) menggunakan kit (Invitrogen, 12574-026) dan 2) amplifikasi cDNA menggunakan realtime PCR dengan SYBR Green PCR Master Mix (AB, #4385610). Tahap pertama dilakukan denaturasi RNA pada suhu 70°C selama 5 menit, kemudian tahap kedua adalah sintesis komplementari DNA (cDNA) dengan inkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit, 42°C selama 60 menit dan 80°C selama 5 menit. Tahap terakhir tambahkan 50µl NFW.

Amplifikasi cDNA menggunakan mesin *Applied Biosystem 7500 fast Realtime PCR system* (AB 7500 realtime PCR) dengan tahapan aktivasi enzim 95°C selama 3 menit, denaturasi 95°C selama 1-3 detik dan aneling/ektensi 60°C selama 20 detik (40 cycle). PCR dilakukan dengan primer spesifik gen CD90, p63, Krt/12 dan ABCG2. Primer yang digunakan primer spesifik yang di desing dan telah dibuktikan dengan pengecekan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) pada gene bank (www.ncbi.nlm.nih.gov) sehingga diharapkan hasil amplifikasi murni gen-gen tersebut. Metode *threshold cycle* (Ct) digunakan untuk mengetahui kuat

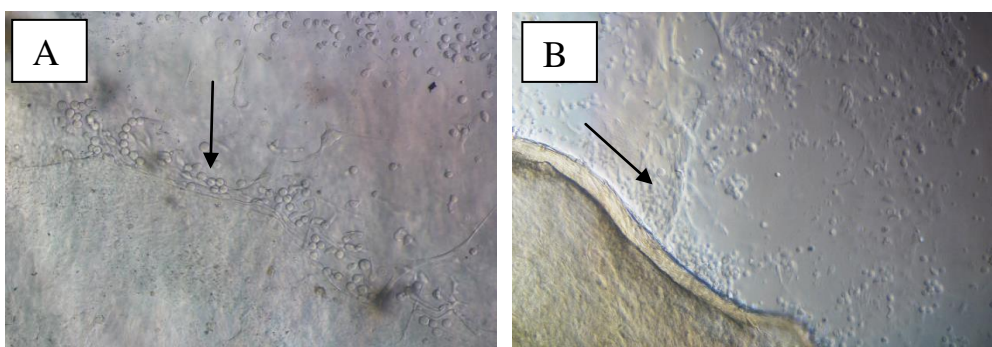
lemahnya ekspresi gen. , selain itu sistem mesin telah dilengkapi dengan kalibrator dye ROX sebagai internal quality kontrol pada setiap reaksi serta 18SS sebagai *housekeeping gene*.

Pengolahan dan Analisis Data

Data dari penelitian ini akan dianalisis secara deskriptif dan data PD, PD/hari, CT dari ekspresi gen Krt12, ABCG2, p63 dan CD 90 dianalisis dengan uji T-test independent. Sedangkan data PDT dianalisis dengan uji Mann Whitney menggunakan SPSS 16.

Hasil

Pada pengamatan mikroskopis, sel punca limbal dapat tumbuh di sekitar eksplan dari jaringan yang dikultur secara *in vitro* setelah hari ke 2 kultur (Gambar 1). Morfologi sel yang tumbuh masih beragam (heterogen) dengan bentuk heksagonal dan fibroblastik. Hasil eksplan limbus pada penggunaan dan tanpa fibronectin sebagai matriks ekstraseluler menunjukkan adanya proliferasi sel punca limbal. Hal ini secara mikroskopis dapat diamati dengan adanya migrasi sel punca limbus disekitar eksplan pada kedua perlakuan.



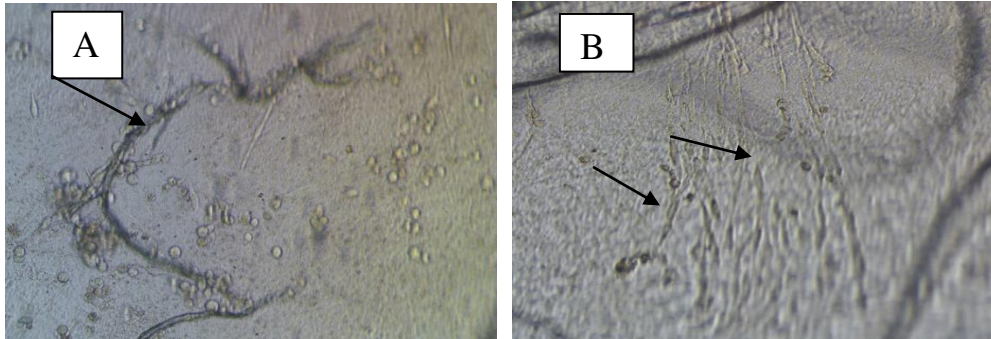
Gambar 1. Metode ekplan pada kultur sel punca limbal (SPL) tikus. Kultur menggunakan (A) dan tanpa fibronectin (FN) (B) keduanya menunjukkan adanya pertumbuhan sel (tanda panah).

Kultur dan pasase SPL secara *in vitro* dapat dilakukan 4 sampai dengan 5 kali

untuk memperoleh jumlah sel yang cukup transplantsi maka SPL dapat ditanam pada

matriks ekstraseluler seperti membran amnion. Pada penelitian ini membran amnion diperoleh dari Bank Jaringan BATAN (Gambar 2). SPL mampu tumbuh

pada membran amnion yang telah dicoating dengan fibronektin. Hal ini ditunjukkan dengan adanya perubahan morfologi sel punca limbal di atas permukaan membran amnion.



Gambar 2. Kultur sel punca limbal (SPL) tikus secara *in vitro* pada hari ke 3. SPL yang dikultur di atas membran tanpa fibronetin (FN) (anak panah) (A) dan SPL dengan FN (B).

Tingkat proliferasi sel punca limbal tikus secara *in vitro* pasase ke 2 pada kontrol dan penggunaan fibronectin (FN) memiliki

population doubling (PD) dan *population doubling time* (PDT) yang sama (Tabel 1).

Tabel 1. PD dan PDT limbal tikus pasase 2 yang dikultur secara *in vitro*

	PD	PDT (jam)	PD/hari
Kontrol	2,13±0,48	57,65±18,3	0,44±0,09
Perlakuan (FN)	2,11±0,44	61,46±18,3	0,42±0,11

Jumlah RNA Krt12, ABG2 dan p63 pada SPL yang dikultur menggunakan kultur tanpa FN (kontrol), namun jumlah RNA CD90 menunjukkan adanya peningkatan pada sel yang dikultur dengan fibronektin dibandingkan dengan sel yang

fibronectin (FN) sebagai *attachment factor* tidak menunjukkan perbedaan dengan dikultur tanpa penambahan fibronektin ($p < 0,05$) (Tabel 3).

Tabel 2. Kuantitasi RNA berdasarkan ΔCt pada kelompok kontrol dan perlakuan

	Krt 12	ABCG2	p63	CD90
Kontrol	18,85±0,76	17,42±0,52	19,09±3,03	15,23±2,65
Perlakuan (FN)	18,42±1,87	17,08±1,56	19,75±2,18	17,70±2,90

Pembahasan

Kultur sel punca limbal (SPL) tikus

Produksi sel punca limbal dapat dilakukan dengan melakukan kultur pada bagian limbus menggunakan metode eksplan maupun enzimatik.¹⁰ Kultur limbus pada penelitian ini dilakukan dengan metode eksplan dan menunjukkan pertumbuhan serta proliferasi sel pada pengamatan hari ke 3 kultur baik pada cawan yang menggunakan matriks maupun yang tidak menggunakan fibronectin sebagai matriks ekstraseluler (Gambar 1). Proliferasi dan diferensiasi SPL menjadi sel epitel kornea sangat tergantung kondisi kultur. Komposisi medium kultur, penggunaan serum serta faktor pertumbuhan yang tepat dan dengan konsentrasi yang optimal dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi SPL saat di kultur *in vitro*.⁵

Dalam penelitian ini penambahan FN tidak mempengaruhi laju proliferasi SPL merujuk pada nilai PD dan PDT kelompok kontrol dan perlakuan (Tabel 1). Hal tersebut kemungkinan untuk meningkatkan proliferasi SPL diperlukan penambahan faktor-faktor penginduksi pluripotensi lain. Penelitian lain melaporkan bahwa matriks ekstraseluler seperti fibrin dapat meningkatkan migrasi SPL pada kultur *in vitro* maupun pada uji klinis.^{11,12,14,15} Pada kultur SPL tikus penggunaan FN sebagai matriks ekstraseluler dapat digunakan sebelum transplantasi SPL menggunakan membran amnion. Fibronectin (FN) dapat merupakan molekul adesi yang dapat meningkatkan migrasi sel serta berpotensi memicu pertumbuhan sel.^{5,11} Hal ini akan sangat membantu dalam transplantasi pada kerusakan kornea atau jaringan limbal.

Meskipun penambahan FN tidak meningkatkan PD dan PDT pada SPL tikus, pada penelitian penggunaan FN, secara kualitatif, dapat meningkatkan jumlah SPL yang menempel pada membran amnion (Gambar 2). Pada penelitian ini penempelan sel limbus pada membran amnion akan meningkatkan proliferasi sel, hal ini ditunjukkan dengan

tingkat konfluensi sel yang lebih cepat pada membran amnion dengan fibronectin. Membran amnion telah digunakan pada transplantasi berbagai penyakit degeneratif dengan menggunakan berbagai tipe sel punca.^{17,18} Pada penelitian ini membran amnion diperoleh dari BATAN yang telah di simpan beku/*freeze dry* dapat digunakan untuk memproliferasi SPL tikus. Hal ini dapat terjadi karena reseptor integrin pada SPL dapat berikatan dengan FN yang memiliki molekul adesi. Ikatan FN dengan integri SPL merupakan awal dari aktifitas sel yang lain seperti proliferasi maupun migrasi sel.^{11,19}

Penggunaan membran amnion yang telah mengalami proses aseluler dari sel epitel pada membran amnion tidak menunjukkan peningkatan proliferasi SPL namun dapat memicu migrasi SPL.¹³ Membran amnion yang telah disimpan beku juga dilaporkan dapat digunakan untuk kultur SPL, meskipun pada membran amnion pasca simpan beku memiliki faktor pertumbuhan lebih rendah dibandingkan yang segar.²⁰ Keberhasilan kultur SPL dapat ditunjukkan dengan terekspresinya gen yang menjadi marker SPL seperti p63 dan ABSC2.^{13,21}

Karakteristik sel punca limbal (SPL) tikus

Populasi SPL yang mengekspresikan gen p63 menunjukkan adanya *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) yang memiliki sifat multipotensi seperti *mecenchymal stem cell* (MSC).^{22,23} Secara molekuler karakter MSC harus mengekspresikan CD105, CD90, CD73 positif serta mampu berdiferensiasi menjadi sel osteosit, kondrosit serta adiposit.^{6,23,24} Pada penelitian ini SPL yang dapat terisolasi menggunakan metode eksplan menunjukkan adanya RNA p63 dan CD90 yang tinggi (Tabel 2). Penelitian yang dilakukan oleh Bray et al. (2012) bahwa MSC menunjukkan SPL yang diperoleh dari kultur jaringan limbus manusia mengekspresikan gen p63 dan CD90.^{6,14,24} Populasi MSC yang diperoleh

dari jaringan limbus dapat mensupport pertumbuhan SPL pada kultur *in vitro*.²⁴

Penggunaan FN pada kultur SPL tikus dari jaringan limbus tikus tidak berpengaruh pada kuantitas RNA ABCG2, p63 dan CD90 yang menjadi marker SPL maupun jumlah RNA Krt12 yang merupakan marker sel epitel kornea. (Tabel 2). Penggunaan suplemen dalam medium kultur sangat mempengaruhi proliferasi dan diferensiasi SPL. Pada penelitian ini suplemen pada medium kultur yang digunakan adalah 10% FBS, ITS, hidrokortison dan EGF. Komposisi tersebut juga dilaporkan oleh Shahdadfar et al. (2012), namun pada hasil penelitiannya penambahan serum autologus untuk proliferasi SPL menunjukkan tingkat proliferasi serta ekspresi SPL yang lebih baik.⁴ Penambahan serum autologus dapat mengurangi suplemen yang berasal dari hewan sehingga dapat mengurangi kontaminasi dan transmisi penyakit dari hewan.^{4,21}

Dapat terdeteksinya RNA Krt12 pada penelitian ini menunjukkan bahwa SPL yang dikultur menggunakan komposisi medium pada penelitian ini kemungkinan dapat mengalami diferensiasi spontan. Hal ini ditunjukkan dengan rendahnya nilai Ct gen Krt12 pada kontrol maupun perlakuan. Penambahan EGF pada medium dapat menginduksi *transforming growth factor-β* (TGF-β) yang akan memicu diferensiasi SPL menjadi sel epitel kornea.²¹ Kandungan growth factor di dalam serum yang mengandung TGF-β juga diduga penyebab diferensiasi spontan saat kultur SPL.^{4,21,24}

Kesimpulan

Penggunaan FN tidak mempengaruhi tingkat proliferasi dan karakteristik SPL tikus.

Saran

Perlu dilakukan uji efektifitas membran sebagai matrik ekstraseluler pada transplantasi produk SPL secara *in vivo*.

Ucapan Terimakasih

Terima kasih Kepala Badan Litbangkes dan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan (PBTDK) atas pemberian dana penelitian, masukan dan nasehat selama melakukan penelitian dengan dana DIPA 2014. Teman-teman tim di laboratorium stem cell PBTDK Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kementerian Kesehatan serta BATAN yang telah membantu dalam proses penelitian, menyediakan bahan untuk penelitian serta berdiskusi selama menjalankan penelitian, saya ucapkan terimakasih.

Daftar Rujukan

1. Burman S and Sangwan V. Cultivated limbal stem cell transplantation for ocular surface reconstruction. *Clinical Ophthalmology*. 2008;2(3):489-502.
2. Albert R, Vereb Z, Csomos K, Moe MC, Johnsen EO, Oldstad OK, et al. Cultivation and Characterization of corneal Limbal Epithelial Stem Cell on Lens Capsule in Animal material-Free medium. *PLOS ONE*. 2012;7(10):1-11.
3. Lekhanont K, Choubtum L, Chuck RS, Sangiampornpanit T, Chuckpaiwong V and Vongthongsri A. A Serum-and feeder-free technique of culturing human corneal epithelial stem cells on amniotic membrane. *Molecular Vision*. 2009; 15:1294-302.
4. Shahdadfar A, Haug Ka, Pathak M, Drolsum L, Olstad OK, Erik O, Johnsen EO, Petrovski G, Moe MC, Nicolaissen B. Ex vivo expanded autologous limbal epithelial cells on amniotic membrane using a culture medium with human serum as single supplement. *Experimental Eye Research*. 2012;97:1-9.
5. Shimazaki J, Aiba M, Goto E, Kato N, Shimmamura S, Tsuboto K. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Am J Ophthalmol*. 2002;109:1285-90.
6. Sancak İG, Ozen A, Pinarli FA, Tiryaki M, Ceylan A, Acar U and Delibasi T. Limbal Stem Cells in Dogs and Cats Their Identification Culture and Differentiation into Keratinocytes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2014;6: 909-14. DOI: 10.9775/kvfd.2014.11355

7. Eva M, Martínez-Conesa EM, Espe E, Reina M and Casaroli-Marano RP. Characterization of ocular surface epithelial and progenitor cell markers in human adipose stromal cells derived from lipoaspirates. *IOVS*. 2012;53(1):513-20.
8. Ahmad S, Stewart R, Yung S, Armstrong L, Stojkovic M, Figueiredo F and Lako M. Differentiation of Human Embryonic stem cell into corneal epithelial-like cell by In vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cell*. 2007;25:1145-55.
9. Mei H, Gonzalez S and Mei SXD. Extracellular matrix is an important component of limbal stem cell niche. *J. Funct. Biomater.* 2012;3:879-94. doi:10.3390/jfb3040879
10. Sudha B, Madhavan HN, Sitalakshmi G, Malathi S, Krishnakumar S, Mori Y, Yoshika H and Abraham S. Cultivation of human corneal limbal stem cell in Mebiol gel-A thermo reversible gelation polymer. *Indian J Med Res*. 2006; 124:655-64.
11. Kimura K, Kawano S, Mori T, Inoue J, Hadachi H, Saito T, and Nishida T. Fibronectin may modulate the directional migration of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:4492-4499. DOI:10.1167/iovs.09-4380
12. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M and Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*. 2010;363:147-55.
13. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, Daniels JT. Short The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Daniels Biomaterials*. 2009;30:1056-65.
14. Krishnan S, Iyer GK and Krishnakumar S. Culture and characterisation of limbal epithelial cells and oral mucosal cells. *Indian J Med Res*. 2010;131:422-8
15. Meyer-Blazejewska EA, Kruse FE, Bitterer K, Meyer C, Hofmann-Rummelt C, Peter H. Preservation of the Limbal Stem Cell Phenotype by Appropriate Culture Techniques. *IOVS*. 2010;51(2):765-74
16. Guell JL, Morral M, Gris O, Elies D, Manero F, Saenz N. Barcelona cicinnati technique for limbal transplantation. *J Emmetropia*. 2012;3(3):1-5.
17. Javadi MA, Einollahi B, Rafie AB, Baharvand H, Ebrahimi M, Rafati N, Kanavi MR. Early Results of Autologous Cultivated Limbal Stem cell Transplantation in Total Limbal Stem cell Deficiency. *Iranian J Ophthalmic Res*. 2006;1(2):71-9.
18. Sabapathy V, Sundaram B, Sreelakshmi VM, Mankuzhy P, Kumar S. Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Plasticity Augments Scar-Free Skin Wound Healing with Hair Growth. 2014; DOI: 10.1371/journal.pone.0093726.
19. Ichikawa H, Nakata N, Abo Y., Shirasawa S., Yokoyama T., Yoshie S., Yue F., Tomatsune D., Sasaki K. Gene pathway analysis of the mechanism by which the Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 inhibits apoptosis in isolated thawed human embryonic stem cell. *Cryobiology*. 2012; 64: 12-22.
20. Ihsan P. The difference of epidermal growth factor concentration between fresh and freeze-dried amniotic membrane. *Jurnal Oftalmologi Indonesia (JOI)*. 2009;7(2):62-6.
21. Loureiro RR, Cristovam PC, Martins CM, Covre JL, Sobrinho JA, Ricardo JRS, Hazarbassanov RM. Comparison of culture media for ex vivo cultivation of limbal epithelial progenitor cells. *Molecular Vision* 2013; 19:69-77. <http://www.molvis.org/molvis/v19/69>
22. Li G, Zhu Y, Xie H, Chen S, Tseng S. Mesenchymal stem cells derived from human limbal niche cells. *Cornea*. 2012;53:5686-97.
23. Oh J, Kim R.H, Shin K, Park N and Kang M.K. $\Delta Np63\alpha$ Triggers epithelial-mesenchymal transition and confers stem cell properties in normal human keratinocytes. <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111.244939>
24. Bray LJ, Heazlewood CF, Atkinson K, Huttmacher DW, Harkin DG. Evaluation of methods for cultivating limbal mesenchymal stromal cells. *Cytherapy*. 2012;14(8):936-47. doi: 10.3109/14653249.2012.684379.