

ABSTRAK DAN EKSEKUTIF SUMMARY
LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING



MODEL TERAPI SEL MENGGUNAKAN
MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCS) PADA KELINCI
MIOKARD INFARK MELALUI PENINGKATAN
KEMAMPUAN DIFERENSIASI

Oleh :

dr. Dina Helianti, M.Kes (0004117406)

dr. Candra Bumi, M.Si (0008067406)

UNIVERSITAS JEMBER

DESEMBER, 2013

MODEL TERAPI SEL MENGGUNAKAN *MESENCHYMAL STEM CELLS*
(MSCS) PADA KELINCI MIOKARD INFARK MELALUI PENINGKATAN
KEMAMPUAN DIFERENSIASI

Peneliti : Dina Helianti *, Candra Bumi*
Mahasiswa terlibat : -
Sumber dana : DP2M DIKTI

ABSTRAK

Penyebab utama gagal jantung adalah infark miokard akut. Pada infark, otot jantung mengalami iskemia (hipoksia), peningkatan sekresi sitokin, dan terjadi inflamasi. Terapi sel menggunakan *mesenchymal stem cells* (MSCs) dari *bone marrow* untuk mengatasi infark miokard akut telah menunjukkan hasil yang sangat menjanjikan akan tetapi masih minimnya viabilitas dari terapi ini menjadi kendala. Hal ini disebabkan lingkungan mikro (kondisi hipoksia) menyebabkan peningkatan ROS sehingga MSCs menjadi apoptosis dan kemampuan diferensiasi menjadi MSCs turun. Dengan demikian meningkatkan ketahanan dari MSCs yang berimplantasi menjadi hal penting untuk peningkatan efikasi dari terapi *stem cells*. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan prekondisi hipoksia pada kultur MSCs agar dapat meningkatkan kemampuan regenerasinya sebelum dilakukan transplantasi tikus model infark. Metode yang digunakan tahun I adalah kultur MSCs dari sumsum tulang kelinci *New zeland*. Kultur hipoksia dengan menggunakan Chamber hipoksia. Viabilitas MSCs, diukur dengan MTT assay, derajat apoptosis dengan imunohistokimia dan kadar caspase 9, dengan *colorimetric*. Analisis data dengan menggunakan manova. Hasil penelitian menunjukkan bahwa prekondisi hipoksia pada kultur MSCs menyebabkan MSCs tampak lebih gemuk, viabilitas sel menjadi lebih tinggi, serta terjadi penurunan kadar apoptosis dan aktivitas caspase-9. Hasil penelitian ini dapat membuktikan bahwa MSCs kondisi hipoksia dapat dijadikan sebagai kandidat terapi yang lebih baik dibandingkan MSCs normoksia.

Kata kunci : MSCs, hipoksia, viabilitas sel, apoptosis, infark miokard

MODEL TERAPI SEL MENGGUNAKAN *MESENCHYMAL STEM CELLS*
(MSCS) PADA KELINCI MIOKARD INFARK MELALUI PENINGKATAN
KEMAMPUAN DIFERENSIASI

Peneliti : Dina Helianti *, Candra Bumi*
Mahasiswa terlibat : -
Sumber dana : DP2M DIKTI
Kontak email : dina_helianti@yahoo.co.id
Diseminasi : -

Latar Belakang dan Tujuan

Latar Belakang

Penyebab utama gagal jantung adalah infark miokard yang mengarah pada kerusakan permanen dari kardiomyosit dan diikuti oleh *remodelling* patologis dari ventrikel kiri (Braunwald, 2000). Meskipun pada penelitian terdahulu disebutkan terdapat pembelahan dari kardiomyosit setelah infark pada otot jantung, tetapi kemampuan mitosis tersebut menjadi sangat terbatas untuk menggantikan sel-sel yang hilang setelah infark miokard (Beltrami, 2001). Terapi sel menggunakan *mesenchymal stem cells* (MSCs) dari *bone marrow* telah menunjukkan hasil yang sangat menjanjikan dalam hal regenerasi dan mengembalikan fungsi miokardium yang iskemia serta merupakan strategi efektif yang aman untuk terapi gagal jantung iskemia (Mark, 2006 dan Katritsis, 2005). Namun demikian minimnya viabilitas dari transplantasi MSCs pada jantung yang mengalami infark menyebabkan efikasi dari terapi ini menjadi terbatas (Tang, 2005). Penelitian oleh Geng, th 2003, menunjukkan 99% MSCs yang diinjeksikan ke ventrikel kiri dari CB17SCID/tikus dewasa *beige* mengalami kematian setelah 4 hari injeksi, hal ini membuktikan bahwa lingkungan mikro iskemi/*microenvironment* yang iskemi pada miokardium yang infark tidak kondusif untuk ketahanan MSCs. Dugaan mekanisme yang mendasari menurunnya fungsi MSCs adalah sel-sel MSC banyak yang mengalami apoptosis dan kapasitas untuk melekat serta diferensiasi menjadi turun. Dengan demikian meningkatkan

ketahanan dari MSCs yang berimplantasi menjadi hal penting untuk peningkatan efikasi dari terapi *stem cells*.

Tujuan *cardiomyoplasty* seluler adalah mengganti kardiomyosit yang hilang setelah iskemia, menginduksi revaskularisasi pada daerah trauma, dan mencegah *remodelling* patologis setelah infark (Toma, 2002). Saat ini *cardiomyoplasty* seluler menggunakan MSCs menjadi alternatif utama terapi untuk meningkatkan fungsi pada penyakit otot jantung (Hamano, 2002). Kandidat yang ideal untuk *cardiomyoplasty* seluler adalah sel yang mempunyai kemampuan berdiferensiasi penuh sebagai otot jantung (Wang, 2000). Populasi sel tersebut dapat ditemukan pada sumsum tulang dewasa. Saat ini diketahui bahwa populasi sel adheren yang diisolasi dari sumsum tulang dan diekspansikan secara *in vitro*, merupakan sumber potensial dari *undifferentiated mesenchymal stem cells*. (Toma, 2002).

Pengeluaran MSCs dari *bone marrow* sebagai respon terhadap stimulus untuk mobilisasi merupakan interaksi yang kompleks dalam *microenvironment* pada *marrow* setempat. Beberapa faktor yang mungkin berperan sebagai penyebab kematian awal dari sel MSC dipengaruhi oleh saat isolasi dan injeksi sel, hipoksia, atau ketidakberadaan *survival factor*. Adanya kondisi hipoksia pada miokardium yang infark, akan menstimulus respon imun untuk bereaksi dan mengakibatkan terjadinya proses potensi redoks yang menghasilkan peningkatan stress oksidatif pada sel otot jantung. Peningkatan ROS menyebabkan modulasi dari molekul proinflamatori seperti molekul TNF- α yang akhirnya mengaktifkan jalur aktivasi mitogen activated protein kinase (MAPK). Aktivasi MAPK selanjutnya menyebabkan kondisi patologis yang mengaktifkan kaskade apoptosis melalui caspase-3 (Kirchhoff, *et al.*, 2002; Kong, *et al.*, 2007). Mengingat proses apoptosis menjadi faktor utama patogenesis kegagalan MSCs berimplantasi pada daerah jantung yang infark, maka penghambatan beberapa molekul yang terlibat pada apoptosis merupakan hal yang tepat untuk meningkatkan efektifitas terapi menggunakan *mesenchymal stem cells* (MSCs).

Pada kultur sel konvensional diperlukan kondisi konsentrasi oksigen 21% yang disebut sebagai normoksia, namun sebaliknya pada kondisi *invivo* MSCs tidak terpapar oksigen dengan konsentrasi yang tinggi. MSCs dapat berkembang pada

lingkungan mikro tertentu dengan konsentrasi oksigen bervariasi antara 1% -7% dalam sumsum tulang dan antara 10% - 15% dalam jaringan adiposa (Chow, 2001 dan Bizzari, 2006). Hal tersebut menunjukkan bahwa kultur invitro membutuhkan perlakuan seperti kondisi lingkungan mikro fisiologisnya.

Kultur invitro pada konsentrasi oksigen tinggi (hiperoksia) dapat mengakibatkan stres oksidatif melalui produksi *reactive oxygen species* (ros) yang merupakan radikal bebas yang dapat merusak lemak, protein dan DNA sehingga merubah metabolisme sel (Wiseman, 1996). Ros yang tinggi dapat mengakibatkan apoptosis, *senescence* dari sel. Pada konsentrasi O₂ yang sedang bahkan rendah dapat terbentuk ros intraseluler yang dapat meningkatkan efisiensi metabolisme (Rosova, 2008). Oleh karena itu diperlukan prekondisi hipoksia pada kultur MSCs agar dapat meningkatkan kemampuan regenerasinya sebelum dilakukan transplantasi. Sehingga konsentrasi O₂ harus ditentukan sesuai dengan lingkungan mikro fisiologisnya dan asal usul dari jenis sel puncanya. Dengan demikian pada penelitian ini ingin mengkaji pengaruh perbedaan konsentrasi oksigen (hipoksia/normoksia) terhadap derajat apoptosis melalui *caspase 9*, *senescence*, dan migrasi dari *bone marrow* MSCs (BMSCs).

Tujuan penelitian pada tahun pertama ini adalah

- a. Membuktikan adanya perbedaan profil jumlah sel apoptosis, kadar caspase 9 dan proliferasi sel terhadap kondisi kultur BMSCs hipoksia.
- b. Membuktikan adanya penurunan jumlah sel apoptosis, penurunan kadar caspase 9, dan peningkatan viabilitas kondisi kultur BMSCs hipoksia dibandingkan dengan kondisi kultur BMSCs normoksia.

Metodologi yang digunakan

Pada penelitian ini menggunakan dua tahap yaitu:

1. Isolasi dan kultur MSCs dari sumsum tulang kelinci New Zealand yang kemudian diidentifikasi menggunakan flowcytometry (CD 105 dan CD 45).

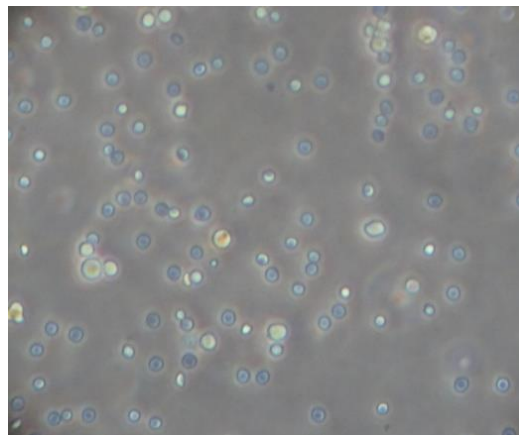
2. Kultur BMSCs dikondisikan normoksia (O₂ 21%) dan hipoksia (O₂ 5%) dengan memasukkan flask kultur ke dalam inkubator khusus (*Modular Incubator Chamber*), untuk kondisi hipoksia diatur aliran udaranya berupa 5% CO₂ dan N₂ 95% sampai dengan pasase 3 (P3) untuk dianalisis viabilitas, apoptosis, dan kadar caspase 9. Viabilitas MSCs, diukur dengan MTT assay, derajat apoptosis dengan imunohistokimia dan kadar caspase 9, dengan *colorimetric*. Analisis data dengan menggunakan manova.

Hasil

Isolasi MSCs

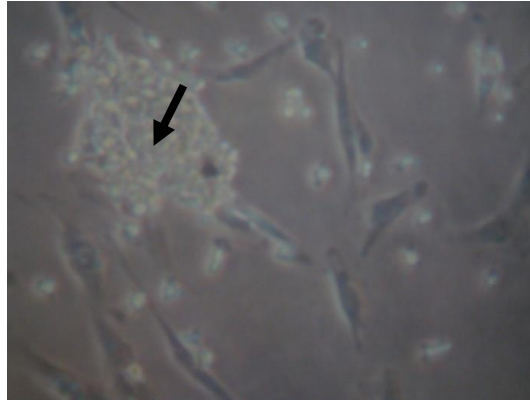
Isolasi MSCs diambil dari sumsum tulang kelinci (New Zealand) pada daerah trochanter mayor tulang femur sebanyak 8-10 ml. setelah melalui beberapa tahap/prosedur isolasi MSCs, sel kemudian dimasukkan ke dalam inkubator 37 °C 5% CO₂ dalam chamber hipoksia. Setelah 2x24 jam medium dalam kultur disk diganti dan sel dicuci untuk menghilangkan efek toksik akibat lisisnya sel hematopoetik. Sel diamati pertumbuhannya setiap hari dan setiap tiga hari medium diganti sampai terbentuk monolayer.

Pada hari pertama tampak sel masih berbentuk bulat dan belum menempel ke dasar plate.



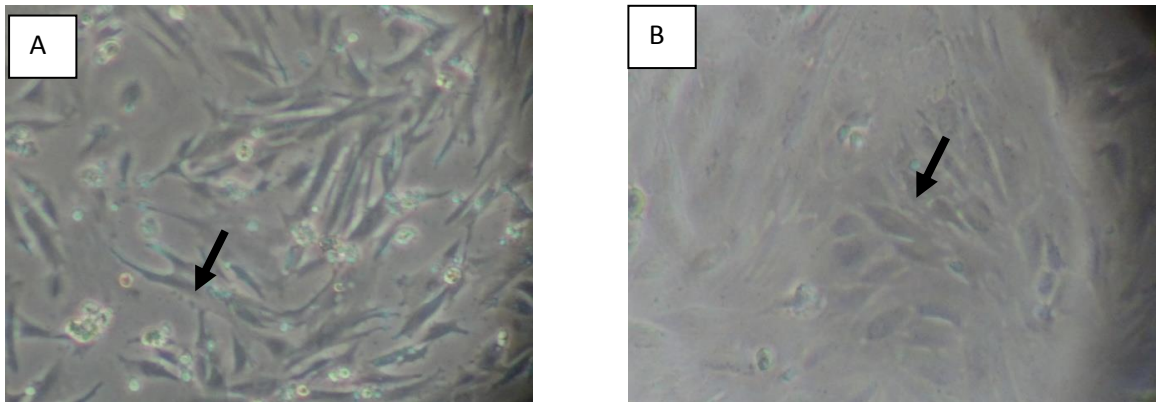
Gambar 1. Sel mononuclear cells pada hari pertama isolasi dari sumsum tulang kelinci New Zealand. Tampak masih berbentuk bulat.

Pada 2 x 24 jam sel harus dicuci untuk memisahkan antara MSC dengan sel hemopoetik. MSC akan melekat pada dasar plate sedangkan sel hemopoetik tidak.



Gambar 2. Panah menunjukkan CFU (colony Forming Unit) yang terbentuk dan akan berubah menjadi MSCs.

Setelah 3 x 24 jam medium kultur perlu diganti dan diobservasi sampai terbentuk monolayer, kemudian dilakukan perbanyakan sel untuk kebutuhan pemeriksaan.

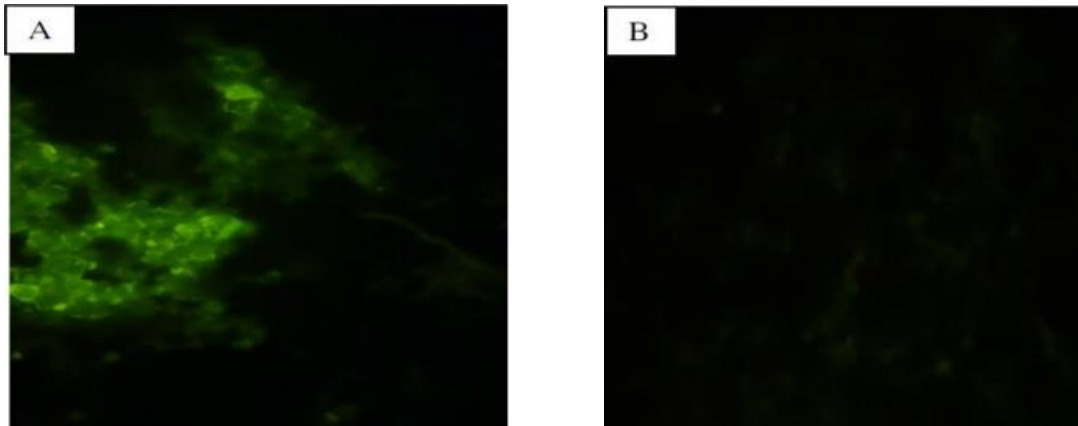


Gambar 3. Hasil MSCs setelah dikultur selama 3x24 jam. Sel tampak berbentuk spindel. A. Tampak Sel MSCs Normoksia tampak kurus. B. Sel MSCs hipoksia tampak lebih gemuk

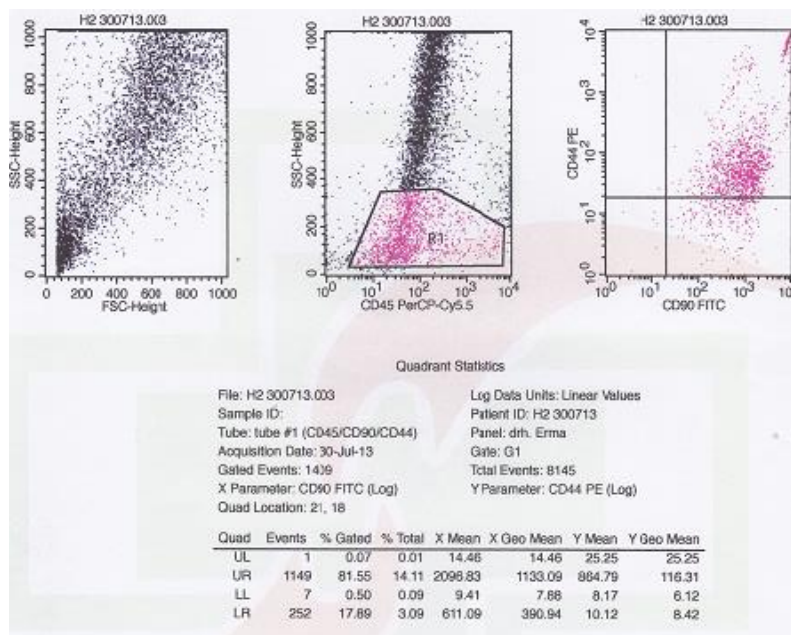
Berdasarkan gambar di atas tampak sel spindel membentuk koloni-koloni, terjadi komunikasi antar sel sehingga dapat berproliferasi dengan baik. Setelah 3 minggu terbentuklah monolayer baik pada sel hipoksia maupun normoksia. Sel hipoksia tampak lebih gemuk dibanding sel MSCs normoksia.

Identifikasi CD 45 dan CD 105

Identifikasi CD45 dan CD105 dengan pemeriksaan imunositokimia dan imunohistokimia menggunakan pemeriksaan Fluocytometri.



Gambar 4. Identifikasi ekspresi CD105 dan CD45 sel MSCs (O2 5%) menggunakan imunositokimia berlabel FITC. A. Menunjukkan ekspresi CD105+. B. Ekspresi CD45- /tidak terekspresi

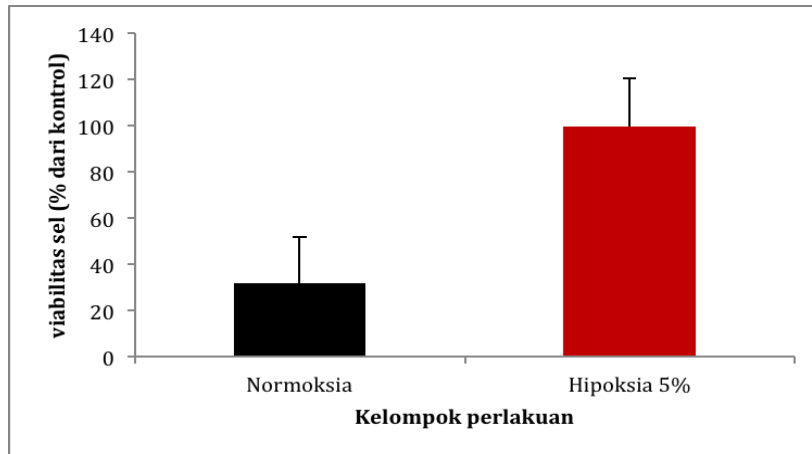


Gambar 5. Hasil fluocytometri CD44+/CD90+ terekspresi 81,55% setelah hipoksia 5%.

Berdasarkan hasil fluocytometri terekspresi CD44+/CD90+ sebanyak 81,55% sedangkan CD44-/CD90+ sebanyak 17,89%.

Efek Kultur Hipoksia O₂ 5% terhadap viabilitas sel MSCs

Viabilitas sel diukur menggunakan MTT assay mendeteksi terbentuknya kristal formazan pada sel yang dibaca dengan spektrofotometer 595 nm.

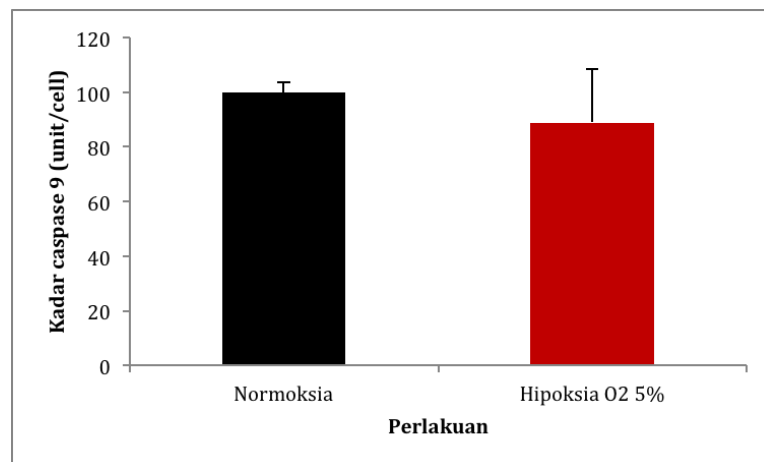


Gambar 7. Diagram hasil pemeriksaan MTT assay

Berdasarkan gambar 7 didapatkan bahwa sel MSCs pada kultur hipoksia mempunyai viabilitas lebih tinggi ($99,7 \pm 20,85$) dibanding normoksia ($31,96 \pm 19,78$).

Efek Kultur Hipoksia O₂ 5% terhadap kadar Caspase-9 pada MSCs.

Setelah terbentuk MNC, sel diinkubasi dengan kadar O₂ 5% dan dilakukan pengamatan aktivitas caspase 9.

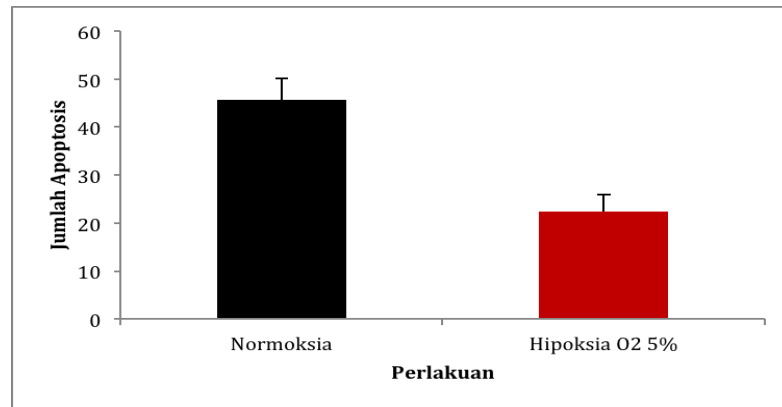


Gambar 8. Gambar Hasil Pengukuran Caspase 9 pada Kultur MSCs.

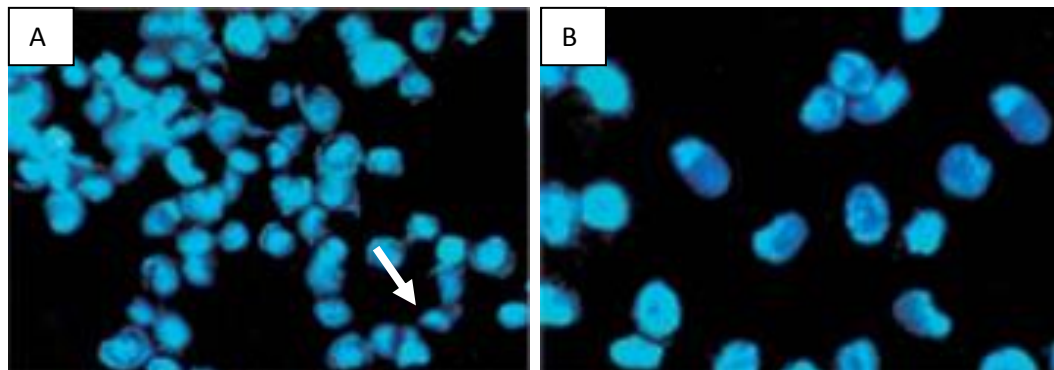
Paparan kondisi hipoksia menurunkan aktivitas caspase-9 ($88,88 \pm 19,43$) dibandingkan dengan kelompok normoksia ($100 \pm 3,75$).

Efek Kultur Hipoksia O₂ 5% terhadap apoptosis sel pada kultur MSCs.

Gambaran sel apoptosis, ditandai dengan MSCs yang mengalami sel *shrinkage*, membran menggelembung (*blebbing*), dan inti sel fragmentasi



Gambar 9. Gambar Hasil Pengukuran Apoptosis pada Kultur MSCs.



Gambar 10. Deteksi apoptosis kultur MSCs menggunakan pewarnaan *fluorescence dye Hoechst 33342*. Kondisi normoksia. B kondisi hipoksia. Panah putih menunjukkan sel apoptosis

Paparan kondisi hipoksia menurunkan terjadinya apoptosis sel ($22,40 \pm 3,58$) dibandingkan dengan kelompok normoksia ($45,60 \pm 4,56$).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa prekondisi hipoksia pada kultur MSCs menyebabkan MSCs tampak lebih gemuk, viabilitas sel menjadi lebih tinggi, serta terjadi penurunan kadar apoptosis dan aktivitas caspase-9. Hasil penelitian ini dapat membuktikan bahwa MSCs kondisi hipoksia dapat dijadikan sebagai kandidat terapi yang lebih baik dibandingkan MSCs normoksia pada infark miokard.

Daftar Pustaka

- Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, 2001, Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98: 2396-2402.
- Geng, YJ., 2003, Molecular mechanisms for cardiovascular stem cell apoptosis and growth in the heart with atherosclerotic coronary disease and ischemic heart failure, *Science, Ann NY Acad*, 1010;687-697.
- Katritsis, DG., Sotiropoulou, PA., Karvouni, E., Karabinos, I., Korovesis, S., Perez, SA., Vوريدis, EM., apamichailM, 2005, Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv.* 65:321–329.
- Kong, H., Liu, N., Huo, X., Wang, B., Zhang, H., Gao, M., and Qi, G., 2007, Cell multiplication, apoptosis, and pAkt protein expression of bone mesenchymal stem cells of rat under hypoxia environment, *JNMU*, 21;233-239.
- Rosova, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., Noltab, JA., 2008, Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal, *Stem Cells*, 26:2173–2182.
- Stamm, C., Westphal, B., Kleine, HD., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, CA., Freund, M., Steinhoff, G., 2003, Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration, *Lancet*, 361; 45–46.
- Tang, YL., Zhang, YC., Qian, Shen, LP., Phillips, MI., 2005, Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated hemeoxygenase-1 vector, *J Am Coll Cardiol.*, 46;1339–1350.