

The Potential of Peripheral Blood Mesenchymal Stem Cells For Periodontal Regeneration

Desi Sandra Sari*

*Departement of Periodonsia, Faculty of Dentistry, University of Jember, Jl. Kalimantan 37 Jember. Telp/ Fax: (0331)333536/(0331)331991.e-mail: desi_sari.fkg@unej.ac.id

Abstract

The potential of stem cells is very promising for the treatment of various diseases raises new hope in the treatment of diseases, especially refractory conservatively as periodontitis. Stem cells from peripheral blood (peripheral blood mesenchymal stem cells/PB-MSCs) were reported to have the ability to multi differentiation because they contain a lot of multipotent progenitor cells. PB-MSCs ability to migrate stricken injury for their chemotactic receptor such as CXCR4 and SDF-1 resulting in homing, proliferation and differentiation into cells corresponding to the environment. STRO-1 is a marker located on the cell surface PB-MSCs showed these cells have the potential for differentiation into osteogenic cells that play a role in the treatment of periodontal disease. The purpose of this review to provide an overview of PB-MSCs and their potential use in periodontal regeneration.

Keyword : Periodontal Regeneration, Peripheral blood, Mesenchymal Stem Cells, Osteoblasts cells

Pendahuluan

Periodontitis adalah penyakit inflamasi dengan manifestasi klinis hilangnya jaringan pendukung termasuk ligamen periodontal dan tulang alveolar, dan berpotensi menyebabkan hilangnya gigi. Selama beberapa dekade, periodontitis telah berusaha untuk memperbaiki jaringan periodontal melalui berbagai prosedur bedah dengan *bone graf* dan penggunaan bahan *growth factor* serta membran *guide tissue regeneration*. Setelah bedah periodontal proses penyembuhan dilanjutkan dengan repair dan regenerasi.¹

Regenerasi jaringan periodontal adalah tujuan utama dalam perawatan periodontal. Regenerasi jaringan periodontal merupakan proses menggantikan jaringan periodontal dengan membentuk jaringan baru dan tulang alveolar baru. Pada proses regenerasi ada perlekatan jaringan periodontal termasuk perlekatan gingiva, sementum, ligamen periodontal dan tulang alveolar yang mengelilingi gigi.² Regenerasi periodontal tergantung empat komponen dasar yaitu signalling sel, suplai darah yang memadai, *scaffold*, dan sel yang menyediakan bahan untuk pertumbuhan jaringan baru atau *stem cells*.³

Stem cells adalah sel yang tidak/belum terspesialisasi dan mempunyai kemampuan potensi untuk berkembang menjadi jenis sel spesifik yang bisa membentuk jaringan periodontal. Berdasarkan sumbernya *stem cells* di bagi menjadi *embryonic stem cells* yang diisolasi dari *inner cell mass embryo* yaitu dan bersifat totipoten karena diambil dari blastula 3-5 hari setelah fertilisasasi. Sumber *stem cells* yang lain dari *adult stem cells* yang diisolasi dari jaringan dewasa bersifat multipoten yang dapat dieksplorasi salah satunya dari *peripheral blood mesenchymal stem cells* (PB-MSCs). PB-MSCs memberikan keuntungan aksesnya lebih mudah dan teknik pengambilan sampel tidak menimbulkan rasa sakit daripada *bone marrow*. PB-MSCs memiliki karakteristik yang sama dengan *mesenchymal stem cells bone marrow* dalam kemampuan regenerasi tulang pada penelitian *in vitro* dan *in vivo*.^{4,5}

Pemberian MSCs secara transplantasi dapat memberikan efek terapi pada suatu inflamasi. MSCs dapat bermigrasi menuju daerah inflamasi dan berinteraksi dengan sel inflamasi. Paradigma baru-baru ini menyatakan bahwa MSCs *exogenous* dapat merangsang MSCs *endogenous* untuk mengaktifkan sel progenitor melalui mekanisme parakrin. MSCs bersama-sama akan merangsang sel osteoprogenitor untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas.⁶

Artikel ini akan mengupas kemampuan *mesenchymal stem cells* yang dieksplorasi dari *peripheral blood* untuk regenerasi jaringan periodontal.

Tinjauan Pustaka

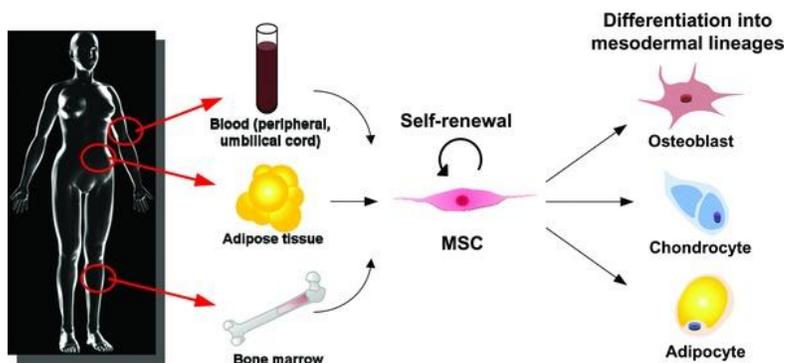
Mesenchymal stem cells pertama kali dijelaskan pada 1970-an oleh Friedenstein yang menggambarkan populasi sel yang berasal dari tulang sumsum yang memiliki bentuk *fibroblas-like* dan bisa menghasilkan adiposit, kondrosit dan osteosit. Sel-sel ini tumbuh dalam bentuk koloni, oleh karena itu dan disebut "*colony forming unit*" atau CFUs. Kemudian, Caplan dan lain-lain menyebut sel-sel ini *mesenchymal stem cells* (MSCs).⁷

1. Karakteristik *stem cells*

Suatu sel bisa dikatakan *stem cells* jika belum berdiferensiasi (*undifferentiated*, mampu memperbanyak diri sendiri (*self renewal*) dan dapat berdiferensiasi menjadi lebih

dari 1 jenis sel (multipoten/pluripoten). *Stem cells* merupakan sel yang belum memiliki bentuk dan fungsi spesifik layaknya sel lainnya pada organ tubuh. *Stem cells* dapat melakukan replika dan menghasilkan sel-sel berkarakteristik sama dengan induknya. Kemampuan memperbanyak diri dan menghasilkan sel-sel yang sama seperti sel induknya ini tidak dimiliki oleh sel tubuh lain. Kemampuan *stem cells* berdiferensiasi dinilai lebih istimewa dibanding sel lain yang lebih matur, karena *stem cells* mampu berdiferensiasi menjadi > 1 jenis sel tubuh. Hal ini berarti *stem cells* bersifat multipoten atau pluripoten. *Stem cells* bersifat pluripoten bila mampu berdiferensiasi menjadi sel tubuh apapun yang berasal dari lapisan embrional yaitu ektoderm, mesoderm dan endoderm dan bersifat multipoten yang hanya mampu berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel.⁸

MSCs memiliki potensi memperbaiki beberapa macam penyakit yang merupakan *adult stem cells*, mempunyai sifat multipoten, *self-renewal*, *plasticity*, *multilineage differentiation* seperti osteoblas, kondrosit dan adiposit. MSCs memiliki beberapa keunggulan, seperti meregenerasi jaringan yang rusak dengan *high-quality* tanpa pembentukan jaringan fibrous, minimal morbiditas pada donor dibandingkan dengan *autografts*, dan risiko rendah untuk terjadi penolakan pada tubuh karena bersifat *hypoinmunogenic responsive*.⁹ Sifat plastisitas *stem cells*, yang berarti bahwa *stem cells* dari jaringan dewasa yang sudah terarah menjadi jaringan tertentu, masih mampu berdiferensiasi menjadi sel bagian dari suatu jaringan lain (Gambar. 1).



Gambar 1. Sifat *stem cells* multipoten, *self-renewal*, *plasticity*, dan *multilineage differentiation*

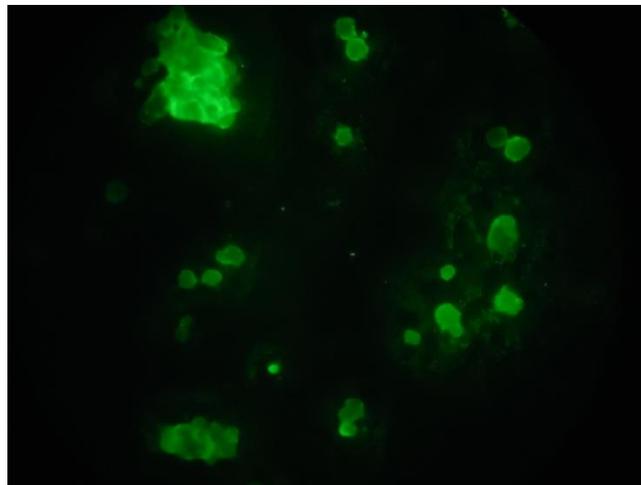
2. Identifikasi PB-MSCs

Identifikasi MSCs pada saat dikultur memiliki minimal 3 kriteria berdasarkan *Mesenchymal and Tissue Stem Cells Committee of The International Society for Cellular*

Theraphy (Tabel.1). Secara histologis, *mesenchymal stem cells* memiliki bentuk fusiform, *fibroblast-like*, dan pada fase pertumbuhan *in vitro* awal membentuk koloni.

Tabel 1.Kriteria untuk Identifikasi MSCs		
1. MSCs pada saat dikultur melekat pada dasar flask, membentuk <i>single cell colony</i>		
2. Fenotif	Positif ($\geq 95\%$)	Negatif ($\leq 2\%$)
	CD 105	CD 45
	CD 90	CD 34
	CD 73	CD14 or CD11b
		CD79 α or CD19
		HLA-DR
3. MSCs dapat berdiferensiasi menjadi sel osteoblas, adiposa dan kondroblas secara <i>in vitro</i>		

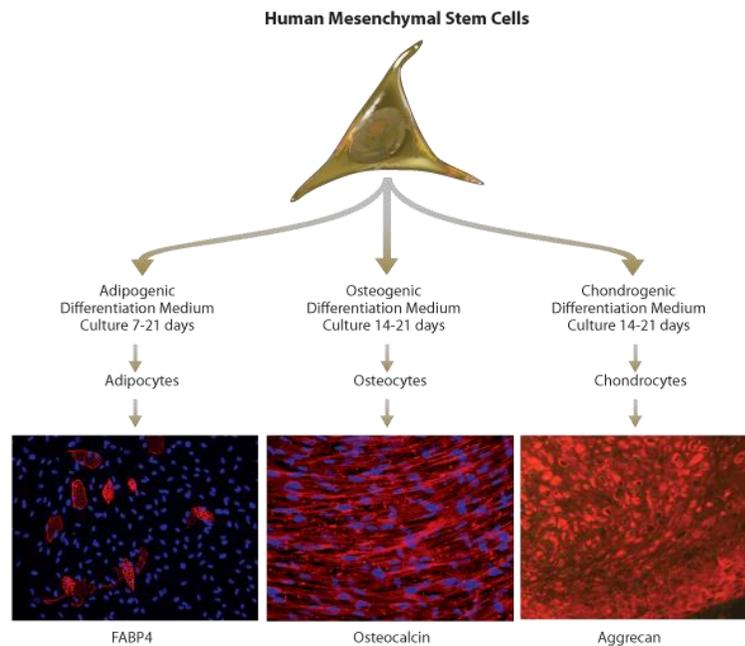
Identifikasi fenotif PB-MSCS dengan imunositokimia, dimana MSCs dibuat *single cell* dengan trypsinasi dan direaksikan dengan primer antibodi yang dilabel dengan FITC (*fluorescence isothiocyanat*) (Gambar. 2).



Gambar 2. MSCs yang diidentifikasi dengan marker CD 105 tampak warna berpendar menjadi hijau

Peripheral blood yang dikumpulkan sebanyak 2 ml rata-rata mendapatkan 1-2 juta sel *peripheral blood mononuclear cells*. Setelah 10-14 hari dikultur sel akan tumbuh kira-kira memenuhi 80% dasar permukaan petridish. Pada kultur PB-MSCs rata-rata 0,5-1 juta sel yang menempel pada permukaan diperoleh setelah passase 0 yaitu setelah 2 minggu di

seeding dan sekitar 5,37 juta akan didapatkan MSCs setelah passase ke 2. Kemampuan PB-MSCs untuk berdiferensiasi menjadi sel progenitor memerlukan waktu yang berbeda-beda. Diferensiasi MSCs ke arah sel adipogenik memerlukan waktu kurang lebih 7-21 hari dan diferensiasi ke arah osteogenik kurang lebih 14-21 hari dan diferensiasi ke arah kondrogenik 14-21 hari (Gambar 3).¹⁰



Gambar 3. Waktu Diferensiasi MSCs ke arah progenitor sel

Perlakuan dengan medium dan faktor penginduksi yang berbeda memberikan hasil diferensiasi MSCs menjadi berbeda pula, seperti akan diuraikan di bawah ini.

a. Diferensiasi osteogenik

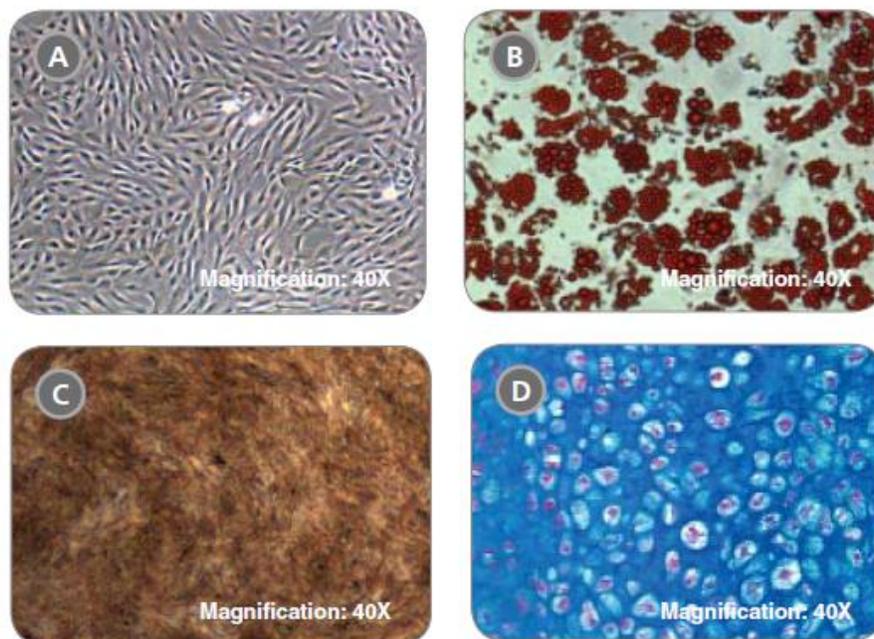
Medium osteogenik terdiri dari Iscove Modified Dulbecco's Medium (IMDM) disuplementasi dengan deksametason, asam askorbat, gliserol, atau gliserofosfat.

b. Diferensiasi kondrogenik

Medium yang umum dipakai terdiri dari Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) tinggi glukosa disuplementasi dengan deksametason, sodium pirofosfat, prolin, *Tumor Growth Factor* (TGF)- insulin, transferin, asam seleneic, Bovine Serum Albumin (BSA), dan asam linoleat.

c. Diferensiasi adipogenik

Menggunakan IMDM disuplementasi FBS, deksametason, bovine insulin, 1-metil-3-isobutilamin, dan indometasin (Gambar 4).¹¹



Gambar 4. (A) MSCs dikultur pada medium pasase ke-3 (B) Diferensiasi MSCs menjadi sel adiposa (Oil-Red-O staining), (C) Diferensiasi MSCs menjadi sel osteogenic (Alizarin red staining) (D) Diferensiasi MSCs menjadi sel kondrosit (Alcian Blue staining)

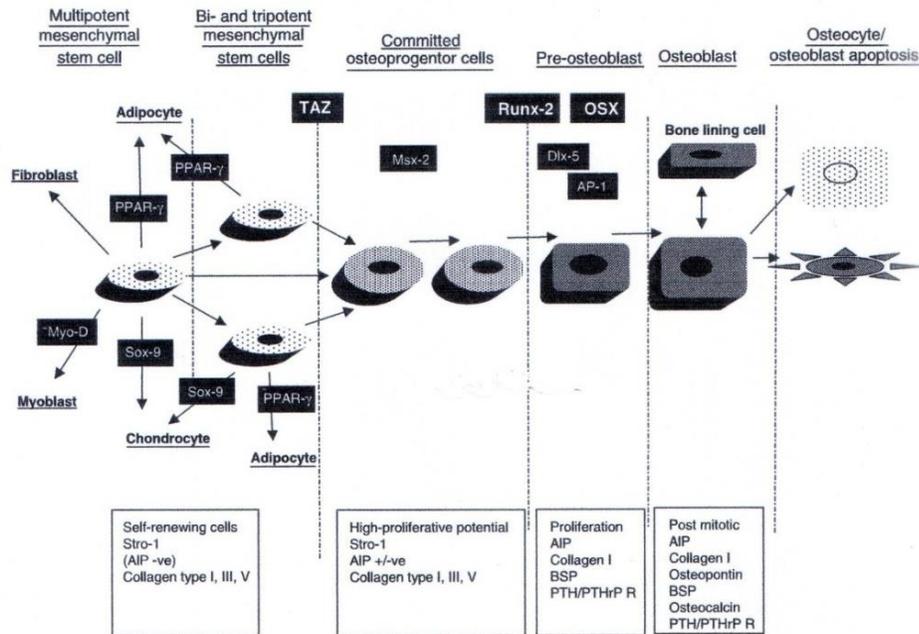
3. Potensi PB-MSCs dalam pembentukan sel osteoblas

Ketika MSCs di kultur dalam media yang osteogenik mereka mengekspresikan marker pembentuk tulang osteoblas, yang merupakan sel yang bertanggung jawab untuk pembuatan matrik dan mineral selama pembentukan tulang baru *in vivo*. Diferensiasi MSCs ke arah osteogenik secara *in vitro* telah dibagi menjadi tiga tahap. Tahap pertama terdiri dari hari 1-4 di mana pada puncaknya jumlah sel terlihat. Ini diikuti dengan awal diferensiasi pada hari 5-14, yang diekspresikan oleh protein *Alkaline fosfatase* (ALP). Setelah hari ke-14 tingkat ALP mulai menurun. Pada tahap ini awal ekspresi dari kolagen

tipe I. Pada tahap final dari hari 14 sampai 28 ditemukan ekspresi yang tinggi dari osteocalcin dan osteopontin, diikuti oleh deposisi kalsium dan fosfat. Osteocalcin merupakan marker spesifik dari sel osteoblas.¹²

Terekspresinya faktor transkripsi STRO-1 pada permukaan MSCs mengindikasikan bahwa MSCs memiliki prekursor osteogenik yang dapat terdiferensiasi menjadi osteoblas. Sel PB-MSCs mengekspresikan reseptor kemotaktik *chemokine receptor type 4* (CXCR4) yang merupakan reseptor dari *Stromal Derivat Factor* (SDF-1) terdapat pada berbagai tipe sel stroma termasuk MSCs endogenous. CXCR4/SDF-1 akan mengatur regulasi migrasi MSCs yang terdapat pada sirkulasi sehingga terjadi *homing* menuju ke daerah yang mengalami inflamasi, selanjutnya terjadi proliferasi dan diferensiasi menjadi sel osteoprogenitor.

Diferensiasi osteogenik juga meregulasi tahapan dalam pembentukan osteoblas yang melibatkan sejumlah gen spesifik dan pada tiap tahapan tersebut nampak ciri fenotip. Sel progenitor osteoblas melalui jalur Wnt/ β -catenin dan BMP/Smad 1/5/8 menstimulasi peningkatan ekspresi faktor transkripsi *Runt-related transcription factors-2* (Runx-2) dan Osterix (Osx). Sel osteoprogenitor berdiferensiasi menjadi sel pre osteoblas karena faktor transkripsi Runx2 dengan bantuan *Msh Homeobox 2* (MSX-2). Pada tahap akhir TGF- β menghentikan differensiasi dan mineralisasi dari osteoblas dengan menghambat gen Runx-2 sehingga sel tidak terus berproliferasi (Gambar 5).¹³



Gambar 5. Skema diagram tahapan sel osteoblas dari MSCs

Pembahasan

Mesenchymal stem cells dapat menginduksi *stem cell* lain yang ada diberbagai organ tubuh untuk berproliferasi dan bergerak menuju jaringan yang mengalami kerusakan seperti periodontitis. Regenerasi tulang alveolar dengan MSCs dapat merangsang *stem cells* lain yang berada dalam tubuh sendiri dan mampu merangsang *stem cells* yang berada di dalam tubuh itu sendiri untuk bersama-sama melakukan regenerasi tulang alveolar yang rusak. Salah satu hal yang diduga menyebabkan ini karena adanya faktor yang dikeluarkan MSCs yaitu sitokin dan *growth factor*.⁸

MSCs dapat merangsang *growth factor*, yaitu *transforming growth factor-beta* (TGF- β), *insulin-like growth factor* (IGF), *Bone morphogenetic protein* (BMP), *Fibroblast growth factors* (FGF), *Platelet-derived growth factor* (PDGF) dimana *growth factor* dapat merangsang MSCs untk berproliferasi dan berdiferensiasi.¹⁴

Penelitian dengan PB-*MSCs allogenic* yang di *seeding* dengan *calcium phosphate* dapat meningkatkan regenerasi tulang ulna kelinci pada model *critical-sized defect*.¹⁵ Pemberian *MSCs allogenic* dapat memberikan efek terapi pada suatu inflamasi karena PB-*MSCs* digunakan kurang lebih 71% untuk transplantasi *allogenic*.⁶

Perawatan dengan sel PB-MSCs yang di *seeding* dengan *scaffold* dapat meningkatkan healing *critical size bone defect* dengan diameter 4 mm pada calvaria mencit. Regenerasi tulang diukur dengan micro-CT setelah 8 minggu dimana proses healing sudah nampak sekitar 69,65% dibanding dengan yang *scaffold* saja tanpa sel PB-MSCs yaitu 14,94% .¹⁶

Potensi *stem cells* di kedokteran gigi juga ditemukan pada jaringan periodontal sehingga akhir-akhir ini banyak peneliti telah mencoba mengaplikasikan *stem cells* dalam rekayasa jaringan pada bidang kedokteran gigi, misalnya digunakan untuk regenerasi jaringan keras dan jaringan lunak rongga mulut yang dikombinasikan dengan sinyal morfogenesis untuk pertumbuhan jaringan, yang biokompatibel dan memberikan strategi baru yang menjanjikan untuk perbaikan jaringan .¹⁷

Pada penelitian Wan dkk ditemukan pembentukan tulang hampir sama antara *allogenic* dan *autologous* PB-MSCs dan BM-MSCs. PB-MSCs juga ditemukan pada pada rat, mouse dan guinea pig. Bagaimanapun juga dalam kondisi penyakit seperti truma dan penyakit sistemik jumlah PB-MSCs meningkat..¹⁵

Koloni BM-MSCs lebih tinggi sekitar 20 kali daripada PB-MSCs hal ini mengindikasikan bahwa MSCs lebih banyak di *bone marrow* daripada di *peripheral blood* . Tetapi potensi kedua sumber sel tersebut dalam implantasi secara *in vivo* kearah osteogenik hampir sama. Hal inilah yang menyebabkan PB-MSCs sebagai alternatif sumber BM-MSCs.¹⁵

Kesimpulan

Stem cells selalu ada dalam bentuk tidak berdiferensiasi menjadi sel tertentu sampai ada sinyal tertentu yang mengarahkan, selain itu kemampuan berproliferasi bersamaan dengan kemampuan berdiferensiasi menjadi jenis sel tertentu inilah yang membuatnya unik. MSCs dapat memberikan suatu defek menakjubkan pada perbaikan jaringan lokal melalui modulasi lingkungan lokal dan aktivasi sel progenitor endogen sehingga menimbulkan efek terapi termasuk pada jaringan periodontal.

Pustaka

- 1) Teughels, W, Godts, C, Quirynen, M & Jakubovics, N 'Biofilm and Periodontal Microbiology', in N Karimbux (ed.), *Carranza's Clinical Periodontology 12th Edition*, 2015, Elsevier Saunders, Canada.
- 2) Illucia, Vera, Cabanilles, Fernandez & Loscos, Periodontal Regeneration in Clinical Practice, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2006, pp. 382-392.
- 3) Lin, N, Gronthos, S & Bartold, P, Stem Cells and Periodontal regeneration, *Australian Dental Journal*, 2008, pp. 108-121.
- 4) Kamal, A, Diah, I, Dilogo, I, Siregar, N, Hutagalung, E, Yusuf, A, Mariya, S, Husodo & K, Comparison of cultured mesenchymal stem cells derived from bone marrow or peripheral blood of rat, *J Exp Integr Med*, 2014, vol 4, pp. 17-22.
- 5) Zheng, Park, Kim, Cho, Heo, Koak, Lee, Park & Kim, Bone Regeneration of Blood-derived Stem Cells within Dental Implant, *Journal of Dental research*, 2015, vol 94, no. 9, pp. 1318-1325.
- 6) Eggenhofer, E, Luk, F, Dahlke, MH & Hoogduijn, M, The life and fate of mesenchymal stem cells, *Frontiers in Immunology*, 2014, pp. 1-6.
- 7) Rantam, F, Ferdiansyah & Purwati, *Stem Cell Mesenchymal, Hematopoetik dan Model Aplikasi*, Airlangga University Press, 2014, Surabaya.
- 8) Halim, D, Murti, H, Sandra, F, Boediono, A, Djuwantonono, T & Setiawan, B, *Stem Cell Dasar Teori dan Aplikasi kKinis*, 2010, PT Erlangga, Jakarta.
- 9) Sanz, A, Carri, F & Chaparro, A, Mesenchymal stem cells from the oral cavity and their potential value in tissue engineering, *Periodontology 2000*, 2015, vol 67, pp. 251-267.
- 10) Chong, P-P, Selvaratnam, L, Abbas, A & Kamarul, T, Human Peripheral Blood Derived Mesenchymal Stem Cells Demonstrate Similar Characteristics and Chondrogenic Differentiation Potential to Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells, *Journal of orthopaedic research*, 2012, vol 30, no. 4, pp. 634-642.
- 11) Aini, N, Setiawan, B & Sandra, F, Karakteristik Biologis dan Diferensiasi Stem Cell : Fokus Pada Mesenchymal Stem Cell, *Cermin Dunia Kedokteran*, 2008, vol 35, no. 2, pp. 64-67.
- 12) Birmingham, Niebur, McHugh, Shaw, Barry & McNamara, Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cell is Regulated by Osteocyte and Osteoblast Cells in a Simplified Bone Niche, *European Cells and Materials*, 2012, vol 23, pp. 13-27.
- 13) Tatsuya, Y, Fumio, T & Kazuhiro, O, A Cell Line with Characteristics of The Dental Pulp Stem Cell For Mineralized and RunX2/Cba1/Os2 activity by Bone Morphogenetic Protein-2, *Journal Stem Cell Rev Res*, 2010, pp. 4191-4200.
- 14) Rodrigues, M, Griffi, LG & Wells, A, Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells, *Stem Cell Research & Therapy*, 2010, pp. 1-12.
- 15) Wan, C, He, Q & Li, G, Allogenic Peripheral Blood Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Enhance Bone Regeneration in Rabbit Ulna Critical-Sized Bone Defect Model', *Journal of Orthopaedic Research* , 2006, vol 24, pp. 610-617.
- 16) Li, S, Huang, K, Wu, Sanyal, M, Hu, M, Longaker, M & Lorenz, P, Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Candidate Cells Responsible for Healing Critical-Sized Calvarial Bone Defects, *Stem Cell Translational Medicine*, 2015, vol 4, pp. 1-10.
- 17) Pejcić, Kojović, Mirković & Minić, Stem Cells for Periodontal Regeneration, *BJMG*, 2013, vol 1, pp. 7-11.