



Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada
<https://akper-sandikarsa.e-journal.id/JIKSH>
 Vol 10, No, 2, Desember 2019, pp;325-330
 p-ISSN: 2354-6093 dan e-ISSN: 2654-4563
 DOI: 10.35816/jiskh.v10i2.181

LITERATUR REVIEW

Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC) Sebagai Sumber Alternatif Sel Blastema Terhadap Regenerasi Anggota Tubuh

Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC) as an Alternative Source of Blastema Cells Against Regeneration of the Body

Kuntum Sureda

Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

Artikel info

Artikel history:

Received; 24 Desember 2019

Revised; 26 Desember 2019

Accepted; 30 Desember 2019

Abstract

Limb regeneration is initiated by blastema cells (BC) and related genes that are only present in mammals confined to the distal fingertips of the phalangeal terminals and neonates. If amputated to proximal phalangeal, regeneration will fail due to lack of blastema cells (BC) in adults and difficulty in isolating and using blastema cells (BC) from neonates. BM-MSC has succeeded in increasing its ability to regenerate various wound tissue and its healing properties, because of this BM-MSC is used as an alternative cell source that produces blastema cells (BC). The original blastema cells (BC) that isolated from neontus and blastema cells (BC) in BM-MSC were compared to the ability of colony formation, cell proliferation, alkaline phosphatase activity (ALP), calcium supply, and osteogenic gene expression. The ability to form colonies was significantly higher in BM-MSC compared to original BC ($P < 0.05$). Alizarin red stain (ARS), calcium and ALP tests show higher levels of mineral deposition in BM MSCs. The qRT-PCR analysis revealed cells from both sources were ready to differentiate into mesodermal lineages. The rate of expression of osteoblastic markers shows the capacity of bone differences is higher at BM-MSC at all time points.

Abstrak

Regenerasi anggota tubuh dimulai oleh sel-sel blastema (BC) dan gen-gen yang terkait yang hanya ada pada mamalia terbatas pada ujung jari distal phalangeal terminal dan neonatus. Jika diamputasi hingga phalangeal proksimal maka regenerasi akan gagal karena kurangnya sel-sel blastema (BC) pada orang dewasa dan kesulitan dalam mengisolasi dan memperluas sel blastema (BC) dari neonatus. BM-MSCs telah diakui kemampuannya untuk meregenerasi berbagai jaringan luka dan sifat penyembuhannya, karena hal ini BM-MSCs dijadikan sebagai sumber sel alternatif yang menghasilkan sel blastema (BC). Sel blastema (BC) asli yang diisolasi dari neontus dan sel blastema (BC) pada BM-MSC dibandingkan berdasarkan kemampuan pembentukan koloni, proliferasi, aktivitas alkaline phosphatase (ALP), kandungan kalsium, dan ekspresi gen osteogenik. Kemampuan pembentukan koloni secara signifikan lebih tinggi pada

BM-MSC dibandingkan dengan BC asli ($P < 0,05$). Alizarin red stain (ARS), kalsium dan uji ALP menunjukkan tingkat deposisi mineral yang lebih tinggi pada BM-MSCs. Analisis qRT-PCR mengungkapkan bahwa sel-sel dari kedua sumber siap berdiferensiasi menjadi garis keturunan mesodermal. Tingkat ekspresi gen marker osteblastik menunjukkan kapasitas diferensiasi tulang yang lebih tinggi pada BM-MSC pada semua titik waktu.

Keywords:

*Blastema cell;
Bone marrow-derived
mesenchymal stem cell;
Limb regeneration;*

Corresponden author:

Email: kuntumsureda93@gmail.com



artikel dengan akses terbuka dibawah lisensi CC BY -4.0

PENDAHULUAN

Regenerasi anggota tubuh adalah proses dinamika yang sangat rumit dan sangat berbeda di antara berbagai spesies di dunia ini (Bryant SV et al, 2002). Pada amfibi seperti kadal air dan salamander memiliki kemampuan untuk membentuk anggota tubuh seutuhnya di level mana pun bahkan setelah di amputasi. Namun, pada mamalia seperti manusia dan tikus, potensi regenerasi anggota tubuh hanya terbatas pada daerah distal phalanx terminal dan pada neonatus. Berbagai upaya telah dilakukan untuk membuat kemampuan regenerasi anggota tubuh pada amfibi yang kuat diterapkan pada regenerasi anggota tubuh pada mamalia dewasa yang terbatas. Memahami bagaimana perbedaan dan persamaan penyembuhan luka antara amfibi dan mamalia akan menunjukkan cara regenerasi tubuh pada amfibi yang bisa diaplikasikan pada mamalia (Dinsmore, 1996; Spallanzani et al, 2009). Regenerasi anggota badan terdiri dari tiga fase berbeda yang biasanya dimulai dengan pembentukan regenerative epitel yang menutupi anggota tubuh yang luka akibat diamputasi. Segera setelah penyelesaian penutupan luka, populasi mesenchymal sel [Sel Blastema (BC)] menumpuk di daerah luka. Secara alami, sel-sel blastema (BC) dianggap sebagai kunci mediator utama regenerasi ujung jari sehingga hilangnya sel-sel blastema (BC) setelah amputasi proksimal menyebabkan pembentukan parut pada mamalia dewasa (Muneoka K, Sassoon D, 1992).

BC diyakini sebagai suatu populasi sel heterogen sel progenitor yang berasal dari fibroblas jaringan penghubung. Ada beberapa biomarker permukaan utama yang ditugaskan untuk BC: antigen sel-1 (Sca-1), endothelial marker (CD31), dan vimentin. Hal ini telah meyakinkan dan menunjukkan bahwa ketiadaan BC dan gen yang terkait, dimana dalam hal ini termasuk gen *Msx1* dan *Msx2*, mengakibatkan kegagalan regenerasi anggota tubuh yang di amputasi pada bagian proksimal di tikus dewasa (Tamura et al, 2010). Pembentukan tulang dianggap sebagai proses utama regenerasi anggota tubuh yang diamati pada amfibi (Ide H, 2012). Dalam hal ini BC memungkinkan untuk proses pembentukan tulang dapat terjadi dengan memicu kaskade jalur pensinyalan sel yang mencakup Bone Morphogenetic Protein (BMP) dan Fibroblast Growth Factor (FGF). Meski demikian, ketersediaan adanya BC adalah masalah yang penting. Penggantian BC oleh sumber sel yang tersedia seperti Sel Punca Mesenchymal (MSC) yang memiliki karakteristik yang sama bisa menjadi strategi yang berharga dalam regenerasi ekstremitas (Fernando et al, 2011; Han M et al, 2003).

Bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs) telah banyak diteliti mengenai kemampuannya untuk meregenerasi berbagai jaringan luka dan sifat penyembuhannya di lebih dari 350 uji klinis di seluruh dunia (Penformis P, Pochampally R, 2011). Baru-baru ini, banyak penelitian yang menggunakan transplantasi BM-MSC pada ujung digit neonates yang diamputasi menghasilkan peningkatan pembentukan tulang (Masaki H, Ide H, 2007). Meskipun banyak penelitian telah dikhususkan untuk aplikasi ini dan peran BM-MSC pada pembentukan tulang, tapi masih sedikit investigasi untuk menjelaskan potensi MSC di Indonesia tentang regenerasi anggota tubuh. Oleh karena itu, artikel ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan atau peran BM-MSC sebagai

sumber sel alternatif untuk tersedianya BCs untuk regenerasi anggota tubuh. Di sini, BC diisolasi dari ujung jari neonatal untuk pertama kali dan ditandai bagaimana morfologi, kemampuan diferensiasi, dan marker pada permukaan sel dan di bandingkan dengan sumber sel blastema (BC) yang berasal dari BM-MSC. Selanjutnya, menilai kemampuan pembentukan tulang kedua sel yang diisolasi oleh alkali aktivitas fosfatase (ALP), penanda tingkat ekspresi osteoblastic, kandungan kalsium, dan pewarnaan alizarin merah (ARS). Hal ini meyakini bahwa BM-MSCs dapat digunakan secara tepat sebagai sumber sel untuk regenerasi anggota tubuh dan mempercepat regenerasi luka.

Metode

Metode yang digunakan adalah menggunakan studi literature yang diambil dari berbagai jurnal internasional maupun nasional, metode ini berupaya untuk meringkas kondisi pemahaman terkini tentang suatu topik. Studi literature menyajikan ulang materi yang diterbitkan sebelumnya, dan melaporkan fakta atau analisis baru. Tinjauan literatur memberikan ringkasan berupa publikasi terbaik dan paling relevan. Kemudian membandingkan hasil yang disajikan dalam makalah.

Hasil Dan Pembahasan

Regenerasi anggota tubuh dilakukan pada eksremitas yaitu ujung jari distal hewan uji coba yaitu Tikus dewasa (*Rattus norvegicus*). Dalam kondisi normal regenerasi hanya terbatas pada setengah ujung jari distal phalangeal terminal, sedangkan pada ujung jari distal sepertiga phalangeal proksimal gagal regenerasi karena kurangnya sel blastema (BC) dan gen lainnya seperti Msx 1 dan Msx 2. Gen-gen Msx mengatur perilaku seluler seperti proliferasi dan diferensiasi dan juga pola pertumbuhan jari selama pengembangan dan regenerasi ekstremitas. Pembentukan sel blastema (BC) adalah langkah sementara yang penting dalam proses regenerasi tungkai, yang tidak ada dalam ujung jari manusia dan tikus dewasa yang diamputasi secara proksimal (Han M et al, 2003).

BC diisolasi dari ujung jari neonatal untuk pertama kali dan ditandai bagaimana morfologi, kemampuan diferensiasi, dan *marker* pada permukaan sel nya dan di bandingkan dengan sumber sel blastema (BC) yang berasal dari BM-MSC. Baik BC asli maupun BC pada BM-MSC menunjukkan populasi sel heterogen dalam kultur primer, yang menjadi relatif homogen setelah 2-3 bagian. Uji CFU-F menunjukkan bahwa kedua kelompok memiliki kemampuan membentuk koloni, meskipun koloni kultur BC pada BM-MSC punya ukuran, jumlah, dan tingkat pertumbuhan yang lebih besar secara signifikan. Banyak faktor seperti proliferasi sel, kematian sel, migrasi sel, sekresi faktor pertumbuhan, dan matriks berdampak pada ukuran dan jumlah koloni di Uji CFU (Bovette LB et al, 2014). Uji MTT menunjukkan bahwa kemampuan proliferasi sel pada BC asli dan BC pada BM-MSC dalam tingkat yang sama. Hal ini telah mengkonfirmasi bahwa BC yang dihasilkan pada BM-MSC akan menjadi kandidat alternatif yang tepat untuk pengganti sel blastema (BC) karena proses proliferasi yang sangat penting untuk perbaikan jaringan mamalia (Shyh-Chang N et al, 2013).

Sel induk yang terisolasi dari kultur BC asli dan BC pada BM-MSC juga diidentifikasi berdasarkan *marker* permukaan sel tertentu. Analisis dari *marker* permukaan sel menyatakan bahwa kedua populasi sel mengungkapkan bahwa *marker* sel mesenchymal adalah CD73, CD90, dan CD105. Selain itu, CD31, Vim dan Sca-1 dianggap sebagai *marker* khusus untuk BC pada BM-MSC. *Flow cytometry* dan hasil imunofluoresensi dikonfirmasi dengan jelas bahwa ekspresi marker spesifik lebih tinggi pada BM-MSC (Odelberg, 2004).

Kedua kelompok sel memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi kerangka garis keturunan sel. Kedua sel yang terisolasi memiliki potensi diferensiasi yang sama antara kondrosit dan garis turunan osteoblastik. Kemampuan kondrogenik dan osteogenik dari sel-sel yang terisolasi didukung oleh penampilan proteoglikan dan nodul termineralisasi yang diwarnai positif dengan toluidine blue dan alizarin merah. Penelitian telah menunjukkan bahwa BM pada BM-MSC memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel kerangka seperti tulang dan tulang rawan. Penelitian mendeteksi peningkatan regulasi osteogenik dan gen terkait kondrogenik untuk BC pada

BM-MSCs yang telah mengkonfirmasi bahwa mereka milik sumber sel mesenchymal (Tanaka EM, 2003). Akumulasi lipid pada kedua BC pada BM-MSC dan BC asli mengkonfirmasi potensi diferensiasi adipogenik. Namun, BC pada BM-MSC memiliki potensi adipogenik yang lebih besar dibandingkan dengan BC asli. BM-MSC dapat memunculkan jenis-jenis sel lain karena sifat multipotent mereka, sementara BC asli sebagai sel progenitor, memiliki nasib sel yang ditentukan sebelumnya. Jadi, pergeseran diferensiasi BC asli ke garis keturunan osteoblas, tetapi tidak adipogenik, dapat berkontribusi pada aktivasi sinyal BMP dan pembentukan tulang (Duque G, 2008).

Gen MSX dianggap sebagai gen spesifik regenerasi yang biasanya diekspresikan dalam BC asli. Gen ini mengatur pertumbuhan sel, diferensiasi sel, pembentukan tulang, dan sangat penting untuk pembentukan anggota tubuh fungsional. Hasil qRT-PCR telah menunjukkan perubahan signifikan dalam tingkat ekspresi *Msx1* dan *Msx2* di BC asli dan BC pada BM-MSC. Demikian pula berdasarkan hasil imunofluoresensi terdapat peningkatan drastis dalam kadar gen *MSX1* dan *MSX2* dalam BC pada BM-MSC. Sejalan dengan hasil ini, *Bmp4* dan *Fgf8* secara signifikan juga diregulasi dalam BC pada BM-MSC. Evaluasi ekspresi protein oleh imunofluoresensi juga mengkonfirmasi peningkatan regulasi BMP4 dalam BC pada BM-MSC. BMP4 memainkan peran kunci dalam pengembangan tulang dan perbaikan kerangka, serta respon regenerasi endogen (Bandyopadhyay A et al, 2006). FGF8, sebagai salah satu dari molekul pensinyalan kritis selama pembentukan blastema, terhubung ke inisiasi, hasil, dan pertumbuhan pola anggota tubuh vertebrata (Han MJ et al, 2001).

Agar bisa menjelaskan dengan tepat kemampuan pembentukan tulang BC pada BM-MSC, pentingnya mengevaluasi diferensiasi osteoblastik BC asli dan BC pada BM-MSC dengan penilaian aktivitas ALP, kandungan kalsium, dan qRT-PCR pada titik waktu yang berbeda. ALP, sebagai *marker* awal untuk diferensiasi osteoblastik, meningkat secara signifikan pada kedua jenis sel dalam 7 hari pertama. Yang diketahui bahwa diferensiasi osteogenik awal dimulai dengan peningkatan aktivitas ALP, levelnya menurun ketika gen osteoblastik lain diregulasi sebelum deposisi kalsium. Sesuai dengan Hasil ALP, kandungan kalsium meningkat secara signifikan pada BC pada BM-MSCs ketika aktivitas ALP menurun. Diferensiasi osteogenik dikonfirmasi oleh ARS yang secara khusus mengecek nodul yang termineralisasi. Berdasarkan hasil saat ini, terdapat peningkatan progresif dalam jumlah nodul termineralisasi selama 3 minggu osteoinduksi untuk BC pada BM-MSC (Sugawara Y et al, 2002).

Analisis ekspresi gen *Runx2*, Kolom I dan OCN Juga mengalami peningkatan terkait gen osteogenik dalam kelompok BC asli dan BM-MSCs. *Runx2*, sebagai *marker* awal diferensiasi, dikenal untuk mengaktifkan gen terkait osteogenik, termasuk kolagen I, osteopontin, osteocalcin, dan sialoprotein tulang (Franceschi RT, Xiao G, 2003). Dengan demikian, perubahan *Runx2* meningkat setiap hari ke 7 dan 14, dan menurun pada hari ke 21. Kolom I adalah salah satu protein matriks ekstraseluler pertama yang dihasilkan selama induksi tulang. Tingkat ekspresi yang lebih tinggi dari Kolom I membuktikan kemampuan membentuk tulang pada BC pada BM-MSC. OCN adalah *marker* osteogenik lain yang mulai berekspresi selama masa akhir diferensiasi. Meningkatnya regulasi *Ocn* pada hari ke 21 berbanding lurus BC pada BM-MSC dan BC asli dapat menginduksi pembentukan ECM pada akhir. Karena itu, data qRT-PCR konsisten dengan yang dikumpulkan nodul mineral terdeteksi oleh ARS dan kandungan kalsium yang mendukung kemampuan pembentukan tulang pada BC pada BM-MSC (Jeon O et al, 2008).

BMP4 sebagai faktor kunci selama perkembangan tulang dan mempercepat proses pembentukan tulang. Analisis qRT-PCR menunjukkan tingkat ekspresi sedikit lebih tinggi dari gen osteoblastik dalam kelompok BC pada BM-MSC. Oleh karena itu, peningkatan aktivitas osteogenik BC pada BM-MSC relatif lebih tinggi terhadap BC asli yang mungkin berhubungan dengan ekspresi gen BMP4.

Simpulan Dan Saran

Sel Blastema (BC) yang dihasilkan oleh BM-MSC menghasilkan Sel Blastema (BC) yang serupa bahkan lebih signifikan daripada BC asli. Berbagai aspek dari potensi perkembangan sel, proliferasi sel, dan yang terpenting, modulasi imun dan respons inflamasi tampak serupa. *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) selain menyediakan akses sebagai sumber alternatif sel, dapat mempercepat regenerasi luka melalui potensi diferensiasi tulang yang tinggi. Karena hal itu, MSC dapat digunakan sebagai sumber sel yang tepat dalam hal ini yaitu sel blastema (BC) sebagai aplikasi terapi untuk regenerasi anggota tubuh. Studi tambahan pada model hewan yang menggunakan MSC yang dimodifikasi atau direkayasa dapat memberikan pemahaman yang lebih baik tentang proses regenerasi dari amputasi proksimal ujung jari.

Daftar Rujukan

- Bandyopadhyay A, Tsuji K, Cox K, Harfe BD, Rosen V, Tabin CJ. 2006. Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2(12): e216.
- Boyette LB, Creasey OA, Guzik L, Lozito T, Tuan RS. 2014. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells display enhanced clonogenicity but impaired differentiation with hypoxic preconditioning. *Stem Cells Transl Med.*3(2): 241-254
- Bryant SV, Endo T, Gardiner DM. 2002. Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells. *Int J Dev Biol.* 46(7): 887-896.
- Dinsmore CE. 1996. Urodele limb and tail regeneration in early biological thought: an essay on scientific controversy and social change. *Int J Dev Biol* 40:621-7; PMID:8877433
- Duque G. 2008. Bone and fat connection in aging bone. *Curr Opin Rheumatol.* 20(4): 429-434.
- Fernando WA, Leininger E, Simkin J, Li N, Malcom CA, Sathyamoorthi S, et al. 2011. Wound healing and blastema formation in regenerating digit tips of adult mice. *Dev Biol.* 350(2): 301-310.
- Franceschi RT, Xiao G. 2003. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem.* 88(3): 446-454.
- Han M, Yang X, Farrington JE, Muneoka K. 2003. Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice. *Development.* 130(21): 5123-5132.
- Han MJ, An JY, Kim WS. 2001. Expression patterns of Fgf-8 during development and limb regeneration of the axolotl. *Dev Dyn.* 220(1): 40-48.
- Ide H. 2012. Bone pattern formation in mouse limbs after amputation at the forearm level. *Dev Dyn.* 241(3): 435-441.
- Jeon O, Rhie JW, Kwon IK, Kim JH, Kim BS, Lee SH. 2008. In vivo bone formation following transplantation of human adipose-derived stromal cells that are not differentiated osteogenically. *Tissue Eng Part A.* 14(8): 1285-1294
- Masaki H, Ide H. 2007. Regeneration potency of mouse limbs. *Dev Growth Differ.* 49(2): 89-98.
- Muneoka K, Sassoon D. 1992. Molecular aspects of regeneration in developing vertebrate limbs. *Dev Biol.* 152(1): 37-49.
- Odelberg SJ. 2004. Unraveling the molecular basis for regenerative cellular plasticity. *PLoS Biol.* 2(8): E232.
- Penforis P, Pochampally R. 2011. Isolation and expansion of mesenchymal stem cells/multipotential stromal cells from human bone marrow. *Methods Mol Biol.*; 698: 11-21.
- Shyh-Chang N, Zhu H, Yvanka de Soysa T, Shinoda G, Seligson MT, Tsanov KM, et al. 2013. Lin28 enhances tissue repair by reprogramming cellular metabolism. *Cell.* 155(4): 778-792.
- Spallanzani L. *Nouvelles Recherches.* 2009. Part 1-2: Sur Les Decouvertes Microscopiques Et La Generation Des Corps Organises (1769), pg 680. Whitefish, Montana: Kessinger Publishing.

- Sugawara Y, Suzuki K, Koshikawa M, Ando M, Iida J. 2002. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. *Jpn J Pharmacol.* 88(3): 262-269.
- Tamura K, Ohgo S, Yokoyama H. 2010. Limb blastema cell: a stem cell for morphological regeneration. *Dev Growth Differ.* 52(1): 89-99.
- Tanaka EM. 2003. Cell differentiation and cell fate during urodele tail and limb regeneration. *Curr Opin Genet Dev.*; 13(5): 497-501.