

Karakteristik Biologis dan Diferensiasi *Stem Cell* : Fokus pada *Mesenchymal Stem Cell*

Nurul Aini, Boenjamin Setiawan, Ferry Sandra

Stem Cell Division, Stem Cell and Cancer Institute, Kalbe Pharmaceutical Company Jakarta, Indonesia

ABSTRAK

Stem cell telah menjadi fokus perhatian baik bagi kalangan peneliti maupun khalayak umum karena potensinya dalam terapi berbasis sel. Mengingat isu etis yang melingkupi penggunaan *embryonic stem cell*, *adult stem cell* menjadi alternatif pilihan untuk maksud tersebut. Penggunaan *mesenchymal stem cell* dari darah tali pusat menjadi preferensi sebagian peneliti karena sifat plastisitasnya yang tinggi dan imunogenisitasnya yang rendah. Dengan perlakuan yang tepat, *mesenchymal stem cell* ini dapat berkembang menjadi berbagai sel dan selanjutnya dapat dipakai sebagai sumber transplantasi sel untuk terapi berbasis sel. Untuk bisa melangkah ke penggunaan *mesenchymal stem cell* sebagai terapi rutin pada manusia, berbagai usaha dilakukan untuk mengkultur *mesenchymal stem cell* dalam medium xeno-free sebagai upaya mencegah transfer patogen hewan ke manusia.

Kata Kunci : *Stem cell*, *adult stem cell*, *mesenchymal stem cell*, *terapi berbasis sel*.

Pendahuluan

Selama bertahun-tahun para peneliti mencari dan mencoba memahami mengapa sebagian sel dan organ tubuh manusia mampu memperbaiki diri sedangkan sel dan organ-organ lainnya tidak. Sekarang, pencarian itu difokuskan ke bidang *stem cell*. *Stem cell* adalah jenis sel khusus dengan kemampuan membentuk ulang dirinya dan dalam saat yang bersamaan membentuk sel yang terspesialisasi. Meskipun kebanyakan sel dalam tubuh seperti jantung maupun hati telah terbentuk khusus untuk memenuhi fungsi tertentu, *stem cell* selalu berada dalam keadaan tidak terdiferensiasi sampai ada sinyal tertentu yang mengarahkannya berdiferensiasi menjadi sel jenis tertentu. Kemampuannya untuk berproliferasi bersamaan dengan kemampuannya berdiferensiasi menjadi jenis sel tertentu inilah yang membuatnya unik.^{1,2}

Terdapat dua kelompok utama *stem cell* menurut sumbernya, yaitu *embryonic stem cell* yang diisolasi dari *inner cell mass embryo*, dan *adult stem cell* yang diisolasi dari jaringan dewasa. Seperti telah diperkirakan sebelumnya, dewasa ini makin banyak bukti mendukung dugaan kehadiran *stem cell* pada organ dan jaringan, dan bahwa sel-sel jenis ini memiliki kemampuan untuk berkembang jauh melebihi yang dulu dibayangkan. Sejauh mana potensi sel ini dapat dikembangkan untuk kepentingan terapi manusia masih belum jelas, namun pertanyaan-pertanyaan tersebut membuka kemungkinan bagi pemanfaatan *stem cell* di masa datang.^{1,2,3}

Adult Stem Cell versus *Embryonic Stem Cell*

Sejak berhasilnya isolasi *stem cell* dari embrio manusia oleh Thomson pada 1998, prospek kegunaannya dalam terapi sel telah menarik perhatian kalangan peneliti maupun khalayak umum. *Stem cell* jenis ini diperoleh dari *inner cell mass blastocyst*. Mirip seperti yang telah dibuktikan dengan penelitian pada tikus, *human embryonic stem cell* telah terbukti sangat primitif, dapat berproliferasi tanpa batas, dan memiliki kemampuan untuk menurunkan galur semua jenis sel dewasa.⁴ Namun karena proses isolasinya berarti mengganggu perkembangan embrio, minat para peneliti mendapat tentangan dari para politisi dan pemerhati masalah etika penelitian.^{3,5} Lebih jauh lagi, *tumorigenicity* dari *embryonic stem cell* haruslah jelas sebelum melangkah lebih jauh ke tahap terapi.⁶

Sejak itu minat penelitian terhadap *adult stem cell* meningkat pesat. *Adult stem cell* sebagai sumber *stem cell* dewasa relatif aman dari isu etis. Di luar perdebatan mengenai seberapa plastis dan efektif *adult stem cell* dibandingkan dengan *embryonic stem cell*, *adult stem cell* lebih mudah dijumpai di berbagai organ dan jaringan dewasa dengan tingkat ekspansi yang juga tinggi, dan secara teknis lebih mudah diisolasi dibandingkan dengan teknik isolasi *embryonic stem cell* dari *inner cell mass blastocyst*.^{6,7,8}

Adult stem cell seperti semua tipe *stem cell* yang lain, memiliki setidaknya dua karakter khusus. Yang pertama, mereka mampu membuat salinan sel yang identik

dengan dirinya sendiri untuk periode waktu yang lama. Kedua, mampu berdiferensiasi menjadi jenis sel matur dengan karakteristik morfologis dan fungsi tertentu. Tidak diketahui asal muasal yang pasti dari *adult stem cell* ini; beberapa peneliti mengajukan hipotesis bahwa *stem cell* yang dicegah untuk berdiferensiasi ini disebarkan dan diletakkan dengan mekanisme tertentu yang belum diketahui selama periode perkembangan fetal. *Adult stem cell* haruslah *clonogenic*, artinya harus mampu menghasilkan sekumpulan turunan sel yang identik secara genetik, yang kemudian berkembang menjadi semua sel yang tepat sesuai dengan jaringan di tempat ia berada.^{1,2,7}

Tidak seperti *embryonic stem cell* yang memiliki kemampuan tak terbatas untuk berdiferensiasi menjadi sel apapun dalam jaringan, *adult stem cell* meskipun masih bersifat pluripoten diperkirakan telah berkurang kemampuan diferensiasinya dan telah menjadi lebih spesifik untuk berdiferensiasi menjadi sel tertentu yang kesemuanya berkontribusi untuk regenerasi jaringan lokal. Contohnya, *gastrointestinal crypt cells* di sistem pencernaan, *oval cells* di dalam hati, dan *pneumocytes* tipe II di dalam paru-paru, dan berbagai *subset stem cell* di dalam sumsum tulang, darah tepi, otak, korda spinalis, pulpa gigi, pembuluh darah, otot rangka, epitel kulit, kornea, retina dan pankreas.^{1,7}

Plastisitas Adult Stem Cell

Perkembangan lebih lanjut menunjukkan fenomena plastisitas *adult stem cell*, yang berarti bahwa *adult stem cell* dari jaringan dewasa yang sudah terarah menjadi jaringan tertentu, masih mampu berdiferensiasi menjadi sel bagian dari suatu jaringan lain. Pada saat ini belum ada istilah baku untuk menyebut fenomena ini dalam literatur ilmiah. Maka sering disebut sebagai plastisitas, diferensiasi *unorthodox*, maupun transdiferensiasi.^{1,7,9}

Bukti keberadaan fenomena transdiferensiasi pada *adult stem cell* datang dari penelitian yang memakai teknik *transplantasi whole bone marrow*. Pada pemeriksaan histologis jaringan hasil transplantasi di beberapa organ resipien, dijumpai kehadiran sel donor yang berdiferensiasi menjadi sel endotel, sel otot rangka, sel otot jantung, sel oval di hati, hepatosit, dan sel di sistem saraf pusat.^{7,9} Tampaknya, dengan sinyal *micro-environment* yang sesuai, *adult stem cell* dari sumsum tulang mampu bertransdiferensiasi menjadi berbagai macam sel dari organ yang berbeda-beda.^{1,7,9}

Hipotesis mekanisme transdiferensiasi

Semua penelitian yang menyelidiki fenomena plastisitas *stem cell* umumnya menggunakan model jaringan yang terjejas untuk menginduksi mekanisme "homing"

dan *diferensiasi stem cell*. Kerusakan jaringan tampaknya menciptakan lingkungan yang sesuai bagi perubahan orientasi diferensiasi ini. Tampaknya lingkungan jaringan *extrahematopoietic* yang terbentuk setelah apoptosis atau nekrosis (seperti keseimbangan sitokin maupun keadaan *matriks ekstraseluler*) memungkinkan engraftment yang sesuai bagi *stem cell* yang sedang beredar di aliran darah. Yang tidak diketahui adalah apakah *stem cell* melewati fase jaringan spesifik sebelum maturasi, baik melalui transdiferensiasi maupun fusi sel.^{1,9}

Diferensiasi langsung dan tak langsung

Terdapat beberapa mekanisme yang masih menjadi spekulasi untuk fenomena transdiferensiasi ini. Pada penelitian menggunakan *stem cell* dari sumsum tulang, salah satu dugaannya adalah bahwa ketika ditransplantasikan, sebenarnya kumpulan sel ini membawa sekelompok populasi sel yang sangat pluripotent, yang belum terarah menjadi sel darah. Atau mereka adalah hematopoietic *stem cell* yang dapat bertransdiferensiasi. Sel yang sudah terarah telah memulai rangkaian diferensiasi terminal yang diduga disebabkan oleh perubahan konformasi DNA. Transdiferensiasi menunjukkan kemampuan dari sebuah sel yang sudah terarah untuk mengubah pola ekspresi gennya menjadi sel yang betul-betul berbeda dengan karakter asalnya, dan ini dapat terjadi langsung maupun tak langsung. Transdiferensiasi tak langsung berarti *stem cell* berdiferensiasi diikuti proses maturasi ke jalur alternatif. Transdiferensiasi langsung berarti terdapat transisi langsung pada pola ekspresi gen sel tersebut.^{9,10}

Yang harus diingat adalah bahwa transdiferensiasi *in vivo* tidaklah harus berlangsung dalam keadaan patologis. Hal ini merupakan mekanisme yang normal terjadi pada tumbuhan dan hewan, contohnya yang terjadi pada amfibi selama regenerasi tungkai. Di tahap *in vitro*, *progenitor oligodendrosit* dapat diprogram ulang menjadi *stem cell* saraf ketika dipelihara dalam kultur berkepadatan rendah dan dalam medium yang serum-free.¹¹

Fusi sel

Mekanisme alternatif untuk plastisitas adalah terjadinya fusi sel antara *hematopoietic stem cell* dengan *non-hematopoietic stem cell* membentuk heterokarion, dengan demikian mengubah pola ekspresi gen dari pola asli sel sumsum tulang menjadi pola ekspresi pasangan fusinya. Contohnya, *fusi in vitro fibroblast* dengan myoblast diketahui menghasilkan ekspresi mRNA yang spesifik untuk myocyte dengan nuklei yang spesifik untuk fibroblast.^{7,9}

Mesenchymal Stem Cell di Darah Tali Pusat

Mesenchymal stem cell pertama kali dikarakteristikan

oleh Friedstein dkk lebih dari 30 tahun yang lalu, dan didefinisikan sebagai sel yang multipoten, yang mampu berdiferensiasi menjadi beberapa jalur termasuk kartilago, tulang, tendon, otot, ligamen, dan jaringan lemak.^{9,12,13}

Meskipun merupakan sumber utama *mesenchymal stem cell*, sumsum tulang melibatkan prosedur isolasi yang sangat invasif. Selain itu, jumlah, potensi diferensiasi, dan umur maksimum *mesenchymal stem cell* dari sumsum tulang menurun dengan bertambahnya usia donor.¹⁵ Perkembangan selanjutnya mengarahkan minat isolasi *mesenchymal stem cell* pada sumber alternatif seperti darah tali pusat yang proses isolasinya lebih tidak invasif tanpa membahayakan ibu maupun bayinya.^{16,17,18} Kern dkk membandingkan *mesenchymal stem cell* dari sumsum tulang, darah tali pusat dan jaringan lemak. Ia menemukan bahwa meskipun ketiga sumber ini secara morfologis dan fenotip imunologis memiliki karakteristik *mesenchymal stem cell* yang identik, *mesenchymal stem cell* dari darah tali pusat memiliki kemampuan untuk dikultur dalam periode terlama, dan menunjukkan kemampuan proliferasi tertinggi sehingga dapat diekspansi dalam jumlah yang banyak.¹⁴

Mesenchymal stem cell dari darah tali pusat memiliki imunogenisitas yang rendah

Salah satu masalah yang timbul dari *grafting sel* adalah adanya reaksi penolakan dari *host* terhadap sel *transplant allogeneic* yang *mismatched*. Penelitian membuktikan bahwa *mesenchymal stem cell* dari darah tali pusat dapat mencegah penolakan allogeneic pada manusia maupun hewan coba. Penemuan ini didukung pula oleh bukti-bukti kultur *in vitro*. Terdapat tiga mekanisme yang berkontribusi terhadap kejadian ini. Pertama, *mesenchymal stem cell* dari darah tali pusat adalah sel yang *hypoinmunogenic*, dengan kekurangan molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II dan ekspresi molekul yang menstimulasinya. Kedua, *mesenchymal stem cell* dari darah tali pusat mencegah respon sel T secara tidak langsung melalui modulasi sel dendritik dan secara langsung mengganggu fungsi sel *Natural Killer* (NK) dan fungsi sel T *Cluster of Differentiation 4* (CD4⁺) dan CD8⁺. Ketiga, *mesenchymal stem cell* dari darah tali pusat menginduksi *microenvironment* lokal yang supresif terhadap produksi *prostaglandin* dan *interleukin-10* seperti juga ekspresi *indoleamin 2,3-dioksigenase* yang mendepleksi keseimbangan triptofan. Bradley dkk menunjukkan keuntungan lain pemakaian *stem cell* dari darah tali pusat adalah tidak membutuhkan ketepatan Human Leukocyte Antigen (HLA) 100%.^{19,20}

Karakter biologis Mesenchymal stem cell

Mesenchymal stem cell yang ditumbuhkan di berbagai laboratorium dengan berbagai teknik memiliki 2 kesa-

maan yaitu : tumbuh di kultur sebagai sel yang melekat dengan lama hidup tertentu, dan memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi *osteoblast*, *chondroblast*, dan *adipocyte* dalam respon terhadap stimuli yang tepat.^{12,13,14} Secara histologis, *mesenchymal stem cell* memiliki bentuk fusiform, fibroblast-like, dan pada fase pertumbuhan *in vitro* awal membentuk koloni.⁸

Dari identifikasi karakter imunologis, spektrum sitokin yang luas (contohnya *fibroblast growth factor-2* [FGF-2], FGF-4, *platelet derived growth factor-BB* [PDGF-BB], *leukemia inhibitory factor*) dan teknik isolasi (contoh : elektromagnetik dan secara fisik) telah digunakan untuk mengidentifikasi dan mengekspansi *mesenchymal stem cells*. Dengan *flow cytometry*, sel ini menunjukkan hasil negatif terhadap CD3, CD7, CD19, CD34, CD45, CD117, CD133, dan CD135, mengindikasikan bahwa sel kelompok ini bukanlah berasal dari sel hematopoetik. Sel jenis ini juga menunjukkan hasil negatif terhadap reseptor matriks CD31 (PECAM-1), CD62L (L-selectin), dan CD62P (P-selectin), dan negatif untuk CD33, CD90, dan HLA-DR.^{8,12,13,14}

Mesenchymal stem cells yang diperoleh dari darah tali pusat diketahui positif untuk integrin CD29 (β 1-integrin), CD49b (α -2 integrin), CD49d (α -4 integrin), dan CD51 (α -v integrin); positif untuk reseptor matriks CD44 (reseptor hialuronat), CD58 (LFA-3), dan CD105 (endoglin); dan positif HLA-ABC.^{8,12,13} Selain itu untuk marker mesenchymal stem cell manusia : SH-2, SH-3, dan SH-4, sel-sel ini memberikan hasil positif kuat.^{12,13}

Kultur jangka panjang mesenchymal stem cell in vitro

Dalam kondisi kultur yang mengandung *fetal bovine serum* (FBS), *mesenchymal stem cell* dari donor muda dapat menjalani 24-40 kali penggandaan populasi (*population doublings*, PD) *in vitro* sedangkan potensi proliferasi dari donor yang lebih tua terlihat lebih rendah. Setelah itu, *mesenchymal stem cell* menunjukkan penghentian pertumbuhan yang berhubungan dengan fenomena penuaan sel. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor termasuk pemendekan telomer yang progresif selama subkultur kontinu *in vitro* karena tidak aktifnya aktivitas telomerase. Penuaan replikatif ini dapat diatasi dengan memaksa ekspresi gen *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT) sehingga mengembalikan aktivitas telomerase.^{12,13}

Potensi dan perlakuan yang dibutuhkan untuk diferensiasi mesenchymal stem cell

Banyak ilmuwan dari berbagai lembaga telah melakukan kultur *mesenchymal stem cell*, masing-masing dengan metode mereka sendiri. Umumnya media kultur yang digunakan adalah media standar dengan

suplemen *fibroblast growth factor* (FGF) untuk menunjang proliferasi sel, antibiotik untuk mengatasi kontaminasi, serta serum baik dari *bovine* (*fetal bovine serum*, FBS) maupun *calf* (*fetal calf serum*, FCS). Kondisi mikroenvironment tampaknya betul-betul berpengaruh pada potensi diferensiasi maupun transdiferensiasi *mesenchymal stem cell* dari darah tali pusat manusia. Implikasinya, kultur sel *in vitro* harus mampu meniru kondisi yang terjadi secara *in vivo* untuk memastikan validitas peristiwa di laboratorium semirip mungkin dengan yang terjadi dalam tubuh.^{12,13,18}

Perlakuan dengan medium dan faktor penginduksi yang berbeda memberikan hasil diferensiasi *mesenchymal stem cell* 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 chondrogenik

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)- β 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.

d. Diferensiasi neurogenik

Medium IMDM disuplementasi dengan basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), asam retinoat, beta mercaptoethanol (BME), setelah dicuci dengan medium D-Hanks kemudian ditambahkan DMSO dan beta hidroxy anisole (BHA)

e. Diferensiasi hepatogenik

Menggunakan IMDM disuplementasi dengan FBS, penisilin dan streptomisin. Selanjutnya digunakan medium IMDM disuplementasi FBS, FGF-4, dan penisilin-streptomisin.^{17,21}

Kultur *mesenchymal stem cell* dalam lingkungan *xeno-free*

Penggunaan *mesenchymal stem cell* dalam terapi berbasis sel memerlukan pengembangan protokol kultur *xeno-free*. Meskipun bukan persyaratan formal dari badan resmi seperti FDA, terdapat peningkatan perhatian pada kemungkinan transmisi infeksi partikel seperti virus dan prion dari hewan ke manusia. Beberapa laporan telah menunjukkan bahwa *mesenchymal*

stem cell dapat dikultur dengan suplementasi serum manusia tanpa efek merugikan dalam proliferasi maupun potensi diferensiasinya secara *in vitro*.^{12,13,16}

KESIMPULAN

Stem cell memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai salah satu alternatif terapi berbasis sel. *Mesenchymal stem cell* dari darah tali pusat kini banyak dipakai sebagai alternatif sumber *stem cell* karena aman dari isu etis maupun kekhawatiran tentang potensi tumorigenisitasnya. Dengan perlakuan yang tepat, sel ini dapat dikembangkan menjadi berbagai jenis sel. Usaha-usaha optimalisasi kultur sel kini tengah dikembangkan untuk merespon kebutuhan terapi yang aman dari cemaran patogen.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kirschstein R, Skirboll LR. Stem Cells : Scientific progress and future research directions. Washington: National Institute of Health, 2001.
2. National Institute of Health. Stem Cell information : The national institute of health resource for stem cell research. Cited March 3, 2007. <http://stemcells.nih.gov/info/basic/basics1.asp>
3. Wikipedia. Stem Cell. Cited March 3, 2007. http://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell
4. Thomson JA, Itzkovitz-Eldor J, Shapiro SS, dkk. Embryonic stem cells lines derived from human blastocyst. Science. 1998; 282: 1145-7.
5. Setiawan B. Aplikasi terapeutik embryonic stem cell pada berbagai penyakit degeneratif. Cermin Dunia Kedokt. 2006; 153: 5-8
6. Yen BL, Huang HI, Chien CC, dkk. Isolation of multipotent cells from human term placenta. Stem Cells 2005; 23: 3-9.
7. Kuehnle I, Goodel MA. The therapeutic potential of stem cell from adult. BMJ 2005; 235: 372-6.
8. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, dkk. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood 2004; 103: 1669-75
9. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow derived stem cells. Blood 2003; 102: 3483-93.
10. Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS. Isolation and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. Stem Cells 2006; 24: 1707-18.
11. Stocum DL. Development: a tail of differentiation. Science 2002; 298: 1901-3.
12. Kassem M. Mesenchymal stem cells : Biological characteristics and potential clinical applications. Cloning Stem cells 2004; 6: 369-73.
13. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2004; 95: 209-14.
14. Kern S, Eichler H, Stoeve J, dkk. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. Stem Cells 2006; 24: 1294-301.
15. D'Ippolito G, Scghiller PC, Ricordi C, dkk. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. J Bone Miner Res. 1999; 14: 1115-22.
16. de Wynter EA. What is the future for cord blood stem cells? Cytotechnology 2003; 41: 133-8.
17. Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, dkk. Differentiating characterization of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. Cell Bio Int. 2006; 30: 569-75.
18. Prayogo R, Wijaya MT. Kultur dan potensi stem cell dari darah tali pusat. Cermin Dunia Kedokt. 2006; 153: 26-8.
19. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cell avoid allogeneic rejection. J Inflamm (London). 2005; 2:8
20. Bradley MB, Cairo MS. Cord blood immunology and stem cells transplantation. Human Immunol. 2005; 66: 431-46.
21. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, dkk. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: Expression of bone, fat and neural markers. Biol Blood Marrow Transplant. 2001; 7: 581-8.