

Ekspansi *Endothelial Progenitor Cell*

Frisca, Caroline T. Sardjono, Ferry Sandra

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

ABSTRAK

Ditemukannya *EPC* membawa pengaruh yang besar dalam terapi penyakit pembuluh darah. Keterbatasan jumlah *EPC* dalam sirkulasi darah menjadi hambatan utama dalam pengembangan *EPC* sebagai produk terapi sel. Berbagai upaya telah dilakukan dalam meningkatkan jumlah *EPC* dengan cara mengkultur secara *in vitro* untuk mendapatkan jumlah *EPC* yang dibutuhkan. Dalam artikel ini, akan diuraikan mengenai karakteristik, berbagai upaya ekspansi *EPC* dan metode yang sekarang ini digunakan untuk mengidentifikasi dan menghitung *EPC*.

Kata kunci : *EPC*, sel punca, ekspansi, identifikasi, *Endothelial Progenitor Cell*.

PENDAHULUAN

Kerusakan atau disfungsi sel endotel merupakan stimulus utama untuk terjadinya arterosklerosis¹. Hal ini menyebabkan terjadinya gangguan aliran darah yang dapat berakibat fatal seperti ditemukan pada penyakit distrofi muskular, gagal ginjal akut (CRF), dan *stroke*². Tidak hanya itu, arterosklerosis pada pembuluh darah jantung (kardiovaskular) menyebabkan *infark miokard* akut yang juga termasuk dalam daftar penyakit utama penyebab kematian di dunia.

Ditemukannya *Endothelial Progenitor Cell* (*EPC*) membawa implikasi besar dalam dunia ilmiah dan kedokteran. *EPC* dapat memediasi terjadinya pembentukan pembuluh darah baru (neovaskularisasi dan angiogenesis) dan menjaga integritas pembuluh darah³. Dengan demikian transplantasi *EPC* menjadi suatu alternatif terapi untuk mengatasi penyakit akibat gangguan pembuluh darah⁴.

EPC dapat diisolasi dari berbagai sumber, antara lain darah tali pusat^{1,5,6}, darah tepi^{1,3,7}, sumsum tulang^{1,8,9} dan juga pada jaringan tubuh lainnya, seperti jaringan lemak, hati, jantung, limpa, dan saluran pencernaan^{10,11}. Namun, jumlah *EPC* yang sangat terbatas dari berbagai sumber tersebut membatasi penggunaan *EPC* sebagai terapi. Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk memperbanyak *EPC* dengan cara mengkultur secara *in vitro* (ekspansi) untuk memenuhi jumlah kebutuhan dalam terapi.

Karakteristik dan peran *EPC*

EPC merupakan sel yang memiliki karakteristik seperti sel *punca* (*stem cell*), namun memiliki kemampuan prolif-

erasi dan diferensiasi yang lebih terbatas. Sel ini bersifat unipoten, yaitu dapat berdiferensiasi menjadi sel endotel matang. *EPC* memiliki peran penting dalam pembentukan pembuluh darah dan remodelisasi sel endotelial pada pembuluh darah yang mengalami kerusakan¹²⁻¹⁵.

EPC didefinisikan sebagai bagian dari sel berinti tunggal (*mononuclear cell* atau *MNC*) yang memiliki molekul penanda sel punca hematopoietik, yaitu CD34, suatu glikoprotein yang memediasi pelekatan sel punca pada matriks ekstraseluler sumsum tulang dan CD133, suatu glikoprotein yang dilaporkan merupakan molekul penanda untuk sel punca yang lebih primitif dibandingkan CD34, sampai saat ini fungsi dari molekul CD 133 masih belum diketahui dengan pasti¹⁶. *EPC* yang telah mengalami diferensiasi menjadi sel yang lebih matang secara berangsur-angsur akan kehilangan ekspresi CD34. *EPC* juga dilaporkan memiliki molekul penanda sel endotelial, yaitu KDR (*Kinase Insert Domain Receptor*), suatu protein yang berperan penting dalam menstimulasi proliferasi, perkembangan pembuluh darah baru (*sprouting*), dan angiogenesis. *EPC* juga berperan dalam pelekatan dan interaksi antar sel^{17,18}. Beberapa molekul penanda sel endotelial matang lainnya yang dapat dimiliki oleh *EPC* antara lain sebagai berikut: CD31 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), berperan dalam pelekatan sel endotel dan merupakan molekul yang berperan dalam proses migrasi leukosit melalui jaringan interseluler sel-sel endotel; CD146 (P1H12), berperan dalam memediasi pelekatan antar sel endotel^{19,20}; *Von Willebrand factor* (vWF), berperan dalam proses koagulasi darah; Tie-2 berperan dalam pematangan jaringan sel endotel se-

lama *vaskulogenesis* atau *angiogenesis*, dan *Endothelial nitric oxide synthase* (NOS), berperan dalam pengaturan fungsi pembuluh darah⁷.

EPC dapat berperan dalam proses yang bersifat fisiologis maupun patologis. Dalam proses yang bersifat fisiologis, *EPC* merupakan sel progenitor yang memiliki kemampuan untuk membelah dan berdiferensiasi menjadi sel endotelial matang¹³. Dengan demikian *EPC* ikut menjaga integritas pembuluh darah melalui fungsinya dalam menggantikan sel-sel endotel yang rusak (reendotelialisasi) dan pembentukan pembuluh darah baru^{21,22}. Dalam proses yang bersifat patologis, *EPC* turut berperan dalam angiogenesis pada penyakit tumor sehingga dapat menyebabkan semakin cepatnya pertumbuhan tumor¹¹.

Upaya ekspansi *EPC*

Seperti telah dikemukakan sebelumnya, bahwa *EPC* dapat diisolasi dari berbagai sumber, dengan jumlah *EPCs* <1% dalam jumlah total sel mononuklear pada sumsum tulang dan <0.01% dalam peredaran darah perifer¹⁵. Sedangkan jumlah *EPC* yang dibutuhkan untuk digunakan dalam terapi manusia dewasa cukup besar jumlahnya. Dilaporkan bahwa diperlukan kurang lebih 3x10⁸ sampai 6x10⁸ sel yang berarti dibutuhkan 8,5-120 liter darah perifer untuk memperoleh *EPC* dalam jumlah cukup^{15,23}.

Untuk mengatasi keterbatasan tersebut, maka banyak penelitian telah dilaksanakan dalam upaya mengekspansi jumlah *EPC*. Penelitian akhir-akhir ini mengemukakan beberapa proses penting yang menjadi komponen utama dalam metode ekspansi jumlah *EPC*. Proses tersebut dimulai dengan proses isolasi *EPC*, proses kultur dengan menggunakan beberapa jenis media, dan proses penentuan jumlah *EPC* yang berhasil dikumpulkan. Masing-masing proses di atas akan diuraikan secara singkat sebagai berikut.

Isolasi *EPC*

Berbagai metode isolasi sel yang akan diekspansi di antaranya yaitu metode isolasi sel berdasarkan karakteristik inti selnya dan molekul penanda yang terletak pada permukaan sel.

Metode isolasi sel yang paling sederhana adalah dengan menggunakan metode sentrifugasi untuk memisahkan fraksi sel berinti tunggal (MNC) dari sel-sel lain di dalam darah. Sel yang disentrifugasi dalam suatu gradien dengan massa tertentu akan dapat dipisahkan berdasarkan densitasnya. Metode ini akan memisahkan sel yang densitasnya lebih tinggi seperti sel darah merah dan sel granulosit dengan sel yang densitasnya lebih rendah sep-

erti MNC, di dalamnya termasuk sel punca, progenitor, limfosit, dan monosit. Salah satu reagen yang sering digunakan dalam metode ini adalah *Ficoll*.

Metode isolasi lainnya adalah berdasarkan molekul penanda pada permukaan sel yang bertujuan untuk mendapatkan fraksi sel yang lebih spesifik dibandingkan metode sentrifugasi. Prinsip dari metode ini antara lain melalui reaksi pemisahan berdasarkan kompleks antara antigen dan antibodi. Antigen yang digunakan dalam metode ini adalah molekul penanda permukaan sel yang akan diisolasi, dan antibodi spesifik terhadap antigen yang digunakan berada dalam keadaan terikat dengan *magnetik microbeads*. Pemisahan dilakukan dalam medan magnet, oleh karena itu metode ini disebut separasi imunomagnetik. Untuk metode ini, diperlukan beberapa perangkat instrumen tambahan seperti *magnetik microbeads* beserta perangkat untuk separasi, antara lain kolom dan separator. Kolom disisipkan di antara separator, yang merupakan medan magnet kuat, sehingga sel dengan antigen tertentu yang sudah diikat oleh antibodi pada *microbeads* akan tertahan di kolom dan dapat dipisahkan untuk digunakan lebih lanjut. Proses ini dapat digunakan untuk mendapatkan fraksi sel yang memiliki molekul penanda tertentu (seleksi positif) atau sebaliknya (seleksi negatif). Aplikasi penggunaan separasi imunomagnetik dalam pengisolasian kandidat sel *EPC* yang sudah dilakukan antara lain untuk mendapatkan fraksi sel yang memiliki molekul penanda CD14, CD34, CD133, atau CD146 untuk digunakan dalam proses selanjutnya¹⁵.

Berbagai metode isolasi dan fraksi sel yang dihasilkan beserta sumber pustakanya dapat dilihat pada **tabel 1**.

Tabel 1 Metode isolasi dan fraksi sel yang dihasilkan untuk ekspansi *EPC*

Metode	Fraksi sel	Sumber pustaka
Sentrifugasi (densitas-gradien)	MNC	24-28
Separasi imunomagnetik	CD14	29
	CD34	16,18,30
	CD133	21,31
	CD146	32

Kultur/ Ekspansi *EPC*

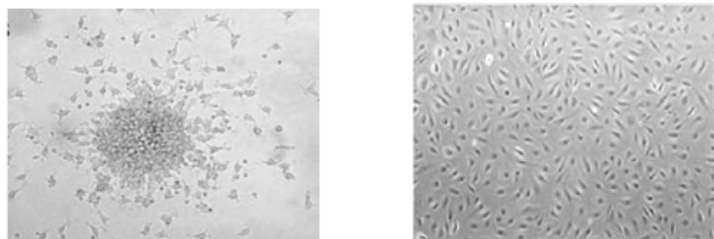
Dalam upaya ekspansi jumlah *EPC* secara *in vitro* pada umumnya digunakan media basal beserta kombinasi bahan tambahan yang ditujukan untuk meningkatkan proliferasi sel dan diferensiasinya menjadi *EPC*. Media basal yang umum digunakan antara lain *Endo-*

thelial Basal Medium-2 (EBM-2), M-199, dan *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM)^{1,7,8}. Komposisi campuran medium tiap studi berbeda-beda. Media basal tersebut umumnya ditambahi serum untuk mendukung pertumbuhan sel dan antibiotik untuk menghindari tumbuhnya kontaminasi¹. Selain itu, media basal juga seringkali ditambah dengan berbagai suplemen, seperti *bovine pituitary extract* atau *bovine brain extract*, atau faktor-faktor pertumbuhan untuk membantu pertumbuhan dan diferensiasi menjadi sel endotelium, seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *basic Fibroblast Growth Factor* (b-FGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF), dan *Insulinlike Growth Factor -1* (IGF-1)³³.

Penentuan jumlah EPC

Dilakukannya penentuan jumlah EPC pada peredaran darah tepi manusia dapat memberikan informasi yang penting dalam keberhasilan pengkulturan EPC. Ditambah lagi, jumlah EPC dapat digunakan sebagai penanda (*marker*) biologi untuk mengevaluasi fungsi pembuluh darah¹. tetapi metode penghitungan EPC yang telah digunakan pada banyak studi menghasilkan variabilitas pada jumlah EPC yang telah dilaporkan, mengingat belum adanya definisi tunggal di antara para peneliti untuk EPC. Beberapa studi melaporkan beberapa variasi dalam definisi EPC yang juga dipakai sebagai acuan dalam penghitungan jumlah EPC.

- a. Berdasarkan morfologi
Sel berbentuk *spindle* dan membentuk koloni bulat atau sel berbentuk *cobblestone* didefinisikan sebagai EPC.
- b. Berdasarkan fenotipe, yaitu antigen permukaan sel. Pada kebanyakan studi, EPC diidentifikasi dan dihitung melalui *flowcytometry*, yaitu dengan identifikasi sel-sel yang memiliki molekul penanda sel hematopoietik dan sel endotel, yaitu CD34, CD133, dan KDR^{9,12,22}.
- c. Berdasarkan karakteristik fungsional
EPC dapat dikarakterisasi secara fungsional melalui beberapa metode, antara lain pengikatan dengan lektin, kemampuan endositosis senyawa lipoprotein, atau kemampuan untuk membentuk struktur



Gambar 1 Sel berbentuk *spindle* dengan koloni berbentuk bulat dalam kultur *in vitro* pada hari ke 5 (Kiri). Sel berbentuk *cobblestone* dalam kultur *in vitro* pada hari ke 19 (Kanan)^{9,26,30}. Kedua morfologi sel tersebut diklaim sebagai EPC.

menyerupai pembuluh darah secara *in vitro*. Bermacam-macamnya pendefinisian EPC (Tabel 2) menyebabkan bervariasinya jumlah EPC yang diperoleh dari studi-studi yang telah dilakukan. Berdasarkan morfologinya, jumlah EPC pada 1 ml darah manusia dewasa segar adalah $1,6 \times 10^5$ sampai 3×10^5 sel^{31,34}. Sedangkan berdasarkan fenotipenya (CD133+/KDR+), dilaporkan jumlah EPC pada peredaran darah tepi dewasa normal yaitu sekitar 0,002% dari total sel mononuklear atau rata-rata 66 sel/ml¹⁷. Oleh karena itu standarisasi dalam pendefinisian EPC sangat diperlukan.

Tabel 2 Macam jenis pendefinisian untuk penghitungan EPC

Jenis Analisa	Keterangan	Sumber pustaka
Morfologi	Sel berbentuk spindle dengan koloni berbentuk bulat (Gambar 1 kiri)	21,27,28
Fenotipe	Sel berbentuk cobblestone (Gambar 1 kanan)	25,29,30
	CD146+ CD34+/CD45+	8,17,24
Fungsional	CD34+/VEGFR-2+ atau CD133+/VEGFR-2+	
	Pengikatan dengan lektin dan endositosis lipoprotein	3,7

Tantangan dalam ekspansi EPC

Hingga saat ini, upaya ekspansi EPC masih dipersulit dengan adanya berbagai tantangan. Tantangan tersebut di antaranya adalah mencari pengganti komponen hewan dalam komposisi media kultur untuk mengekspansi EPC. Komponen hewan dalam media kultur, dimana belum teridentifikasi dengan jelas komposisinya, berpotensi sebagai pembawa agen/mikroorganisme patogen, menimbulkan reaksi penolakan imun pada resipien, serta juga dapat menyebabkan hasil kultur bervariasi pada setiap *batchnya*. Oleh karena itu, upaya ekspansi EPC dengan tidak menggunakan komponen dari spesies berbeda (*xeno free*) sangat diperlukan. Tantangan lainnya dalam ekspansi adalah dapat menghasilkan EPC dalam jumlah besar sehingga dapat mencukupi kebutuhan dalam terapi. Sehubungan dengan hal ini, berbagai studi sudah dilakukan dan masih terus dikembangkan untuk meningkatkan upaya ekspansi EPC yang sudah ada. Di antaranya adalah dengan rekayasa genetik, yaitu transfer gen *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT)^{35,36} atau gen penyandi faktor proangiogenesis seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ke dalam EPC. Tantangan lain yang tidak kalah pentingnya adalah perlu ditentukannya karakteristik, baik morfologi, fenotipe, atau batasan fungsional yang paling tepat dalam mendefinisikan EPC.

KEPUSTAKAAN

1. Hill J, Zalos G, Halcox JPJ, dkk. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-600
2. Choi JH, Kim KL, Huh W, dkk. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1246-52.
3. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, dkk. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-7.
4. Franz WM, Zaruba M, Theiss H, dkk. Stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*. 2003;362:675-6.
5. Murohara T, Ikeda H, Duan J, dkk. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2000; 105:1527-36.
6. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, dkk. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells utilizing human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;04:1396.
7. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, dkk. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res*. 2006; 93:1023-5.
8. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, dkk. Origin of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 2000;105:71-7.
9. Yoder MC, Mead LE, Prater D, dkk. Re-defining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cells principals. *Blood*. 2007;109:1801-9.
10. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor cells. Characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 2004;95:343-53.
11. Doyle B, Metharom P, Caplice NM. Endothelial Progenitor Cells. *Endothelium*. 2006;13:403-10.
12. Lutun A, Verfaillie CM. Will the real EPC please stand up? *Blood*. 2007;109:1795-6.
13. Khakoo AY, Finkel T. Endothelial Progenitor Cells. *Annu Rev Med*. 2005;56:79-101.
14. Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells An historical review. *Leukem Res*. 2006;31:439-44.
15. Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, dkk. Endothelial progenitor cells: Characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol*. 2007;23: 223-39.
16. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, dkk. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD341 cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95:952-8.
17. Sills AD, Blunden MJ, Mawdsley J, dkk. New flow cytometric technique for the evaluation of circulating endothelial progenitor cell levels in various disease groups. *J Immuno Methods*. 2006;316:107-15.
18. Bompais H, Chagraoui J, Canron X, dkk. Human endothelial cells derived from circulating progenitor display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*. 2004;103:2577-2584.
19. George DF, Sabatier F, Blann A. Detection of Circulating Endothelial Cells : CD146-based Magnetic Separation Enrichment or Flowcytometric Assay? *J of Clin Onco*. 2007;25:e1-e2.
20. Woywodt A, Kirsch T, Haubitz M. Immunomagnetic isolation and FACS-competing techniques for the enumeration of circulating endothelial cells. *Thromb Haemost*. 2006;96:1-2.
21. Rustemeyer P, Wittkowski W, Greve B, dkk. Flow-cytometric Identification, Enumeration, Purification, and Expansion of CD133+ and VEGF-R2+ Endothelial Progenitor Cells from Peripheral Blood. *J Immunology & Immunochimistry*. 2007;28:13-23.
22. Fuchs S, Hermanns MI, Kirkpatrick CJ. Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. *Cell Tissue Res*. 2006;326:79-92.
23. Kawamoto A, Gwon HC, Tkebuchava T, dkk. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation*. 2003;107:461-8.
24. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, dkk. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106:3009-17.
25. Hur J, Yoon CH, Kim HS, dkk. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:288-93.
26. Aoki M, Yasutake M, Murohara T. Derivation of Functional Endothelial Progenitor Cells from Human Umbilical Cord Blood Mononuclear Cells Isolated by a Novel Cell Filtration Device. *Stem Cell*. 2004;22:994-1002.
27. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, dkk. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *PNAS*. 2000;97:3422-7.
28. Holgado NL, Alberca M, Guijo FS, dkk. Short-term endothelial progenitor cell colonies are composed of monocytes and do not acquire endothelial markers. *Cytherapy*. 2007;9:14-22.
29. Yoon CH, Hur J, Park KW, dkk. Synergistic Neovascularization by Mixed Transplantation of early Endothelial Progenitor Cells and Late Outgrowth Endothelial Cells: The Role of Angiogenic Cytokines and Matrix Metalloproteinases. *Circulation*. 2005;112:1618-27.
30. Timmermans F, Hauwermeiren FV, Smedt MD, dkk. Endothelial Outgrowth Cells Are Not Derived From CD133+ Cells or CD45+ Hematopoietic Precursors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2007; 10.1161/ATVBAHA.107.144972.
31. Gehling UM, Ergu'n SL, Schumacher U, dkk. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 2000;95:3106-12.
32. Delorme B, Basire A, Gentile C, dkk. Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells. *Thromb Haemost*. 2005;94:1270-9.
33. Lenk K, Adams V, Lurz P, dkk. Therapeutical potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischemia. *European heart*. 2005;26:1903-9.
34. Sharpe EE, Teleron AA, Li B, dkk. The origin and in vivo significance of Murine and Human culture expanded endothelial progenitor cells. *Am J Path*. 2006;168:1710-21.
35. Smadja DM, Che IB, Emmerich J, dkk. PAR-1 activation has different effects on the angiogenic activity of endothelial progenitor cells derived from human adult and cord blood. *J Thromb Haemost*. 2006;4:2051-8.
36. Murasawa S, Llevadot J, Silver M, dkk. Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2002;106:1133-9.