

POTENSI SEL PUNCA MESENKIM ASAL JARINGAN ADIPOSA MENJADI SEL OSTEOBLAS

by Ago Harlim

Submission date: 10-Dec-2018 10:09AM (UTC+0700)

Submission ID: 1053975665

File name: POTENSI_SEL_PUNCA_MESENKIM_ASAL_JARINGAN_ADIPOSA_MENJADI.pdf (216.43K)

Word count: 2427

Character count: 14842

POTENSI SEL PUNCA MESENKIM ASAL JARINGAN ADIPOSA MENJADI SEL OSTEOBLAS

Jennifer Bratakencana, Rilianawati Abbas, Ago Harlim

Pusat Teknologi Farmasi dan Medika - Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi
Laptiab Gedung 610-611 Kawasan Puspipstek Serpong

Alamat Email: rilianawati@bppt.go.id

Abstract

Human adipose tissue is a great source of mesenchymal stem cells. Adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) are easily isolated, can differentiate into multiple lineage cells and have various clinical application. Commonly, the osteogenic differentiation of MSC were induced using culture medium that was supplemented with L-ascorbic acid 2-phosphate (Asc), dexamethasone (Dex) and beta-glycerophosphate (β -GP). The supplement composition of osteogenic medium that was frequently used (OM1 and OM2) was originally generated for bone marrow-derived mesenchymal stem cells, thus the supplement concentration may not be optimal for the differentiation of AD-MSCs. Therefore, in this study we investigated the ability of human AD-MSCs to differentiate into osteogenic lineage using four different osteogenic medium (OM1, OM2, OM3 and OM4). Cells were cultured in osteogenic medium and characterized on day 5. The result suggest that differentiation was enhanced on OM3 and OM4, which have high Asc and low Dex concentrations. Hence higher concentration of Asc, lower concentration of Dex and higher serum concentrations should be used for the osteogenic differentiation of human AD-MSCs *in vitro*.

Keywords: mesenchymal stem cell, adipose tissue, osteoblast, osteogenic differentiation

1. PENDAHULUAN

Jaringan tulang memiliki kemampuan untuk memperbaiki dirinya sendiri tanpa meninggalkan bekas luka. Namun, perbaikan pada kerusakan tulang yang disebabkan oleh trauma, reseksi kanker atau patah tulang yang gagal tersambung masih menjadi tantangan bagi dokter bedah ortopedik (Meyer and Wiesmann, 2006). Hingga saat ini, cangkok tulang autolog merupakan standar yang paling ideal untuk perbaikan jaringan tulang. Meskipun demikian, terdapat beberapa kemungkinan komplikasi dalam pendekatan ini, yaitu meliputi ketersediaan donor untuk transplantasi, morbiditas donor, kemungkinan terjadinya infeksi serta perlu dilakukannya prosedur operasi tambahan untuk mendapatkan hasil donor (Neovius and Engstrand, 2010). Salah satu alternatif yang dapat digunakan adalah cangkok tulang alogenik, namun metode ini dapat meningkatkan risiko penolakan dan penyebaran penyakit (Ehrler and Vaccaro, 2000). Oleh sebab itu, diperlukan suatu strategi baru untuk mengurangi keterbatasan dari terapi-terapi yang tersedia.

Saat ini, perkembangan dalam bidang terapi sel telah memberikan pendekatan baru dalam memperbaiki kerusakan tulang. Sel punca mesenkim atau *mesenchymal stem cells* (MSC) merupakan sel punca multipoten yang mampu memperbaharui dirinya sendiri dan memiliki potensi diferensiasi menjadi adiposit, kondrosit dan osteoblas yang memiliki peran penting dalam terapi regeneratif (Zuk *et al.*, 2001). Oleh karena kemampuan memperbaharui diri dan dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, MSC merupakan sumber sel yang ideal dalam rekayasa jaringan tulang (Patel *et al.*, 2013).

MSC dapat diperoleh dari berbagai sumber pada manusia dewasa, yang umumnya menggunakan sumsum tulang belakang. Namun, pengambilan MSC melalui sumsum tulang belakang memiliki beberapa kekurangan, yaitu seperti jumlah MSC yang didapatkan relatif rendah dan prosedur pengambilannya yang relatif menyakitkan dan berisiko tinggi bagi pasien (Zuk *et al.*, 2001). Sumber lainnya yang menarik perhatian adalah jaringan adiposa, yang menawarkan kelebihan seperti jumlah MSC yang banyak dan

prosedur pengambilan yang lebih mudah (Locke *et al.*, 2009). Oleh karena itu, MSC asal jaringan adiposa dikatakan sebagai sumber MSC yang baik.

Umumnya, diferensiasi osteogenik MSC dalam kultur *in vitro* dilakukan dengan mensuplementasikan media tumbuh dengan 50 μ M asam askorbat 2-fosfat, 100 nM deksametason dan 10 mM beta-gliserofosfat (Zuk *et al.*, 2011). Media osteogenik ini pada awalnya dibuat untuk menginduksi diferensiasi osteogenik MSC asal sumsum tulang, sehingga konsentrasi komponen yang digunakan belum tentu optimal untuk diferensiasi osteogenik MSC asal jaringan adiposa (Jaiswal *et al.*, 1997; de Girolamo *et al.*, 2007). Oleh sebab itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi potensi diferensiasi MSC asal jaringan adiposa menjadi osteoblas dengan menggunakan dua komposisi media osteogenik yang berbeda. Untuk mengatasi masalah ini, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi diferensiasi MSC asal jaringan adiposa menjadi sel osteoblas dengan menggunakan empat media osteogenik berbeda.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Bahan

Jaringan adiposa didapatkan dari donor manusia yang sehat dengan persetujuan tindakan medis di Johnson Medical and Beauty Clinic dengan metodologi yang digunakan telah disetujui oleh kode etik yang berlaku.

2.2. Metode

2.2.1. Isolasi MSC Asal Jaringan Adiposa

Jaringan lemak adiposa diisolasi secara enzimatik dengan collagenase. Diinkubasi pada 5% CO₂, suhu 37°C. Sel diamati jika mencapai 80% *confluency*, sel di subkultur.

2.2.2. Kultur MSC Asal Jaringan Adiposa

Setelah proses isolasi, MSC asal jaringan adiposa ditumbuhkan dalam media tumbuh yang tersusun atas Alpha-Minimum Essential Medium (α -MEM) dengan penambahan suplementasi penicillin-streptomycin dan platelet rich plasma (PRP) yang diinkubasi dalam inkubator 37°C dan 5% CO₂. Media tumbuh diganti setiap 3 hari dan ditripsinasi (0.05% trypsin-EDTA; Sigma) ketika sel telah mencapai konfluensi. Sel disubkultur setiap 3-5 hari dan diperbanyak hingga mencapai pasase 3.

2.2.3. Diferensiasi Osteogenik

MSC asal jaringan adiposa pada pasase 3 ditanam dalam 60 mm petri dish dengan densitas 5 x 10³ sel per petri. Sel diinkubasi selama dua jam dalam media tumbuh, yang selanjutnya diinduksi untuk berdiferensiasi menggunakan α -MEM yang disuplementasikan dengan deksametason, asam askorbat 2-fosfat dan β -gliserofosfat. Empat komposisi media diferensiasi osteogenik (MDO) yang berbeda yaitu MDO1, MDO2, MDO3 dan MDO4 digunakan untuk menginduksi osteogenik (Tabel 1). MDO1 dan MDO2, serta MDO3 dan MDO4 memiliki komposisi suplemen yang sama namun konsentrasi serum (PRP) yang berbeda. Kultur induksi diinkubasi selama 5 hari dan pada hari ke-5, hasil induksi osteogenik dideteksi menggunakan pewarna alizarin red.

2.2.4. Pewarnaan alizarin red

Sel yang dikultur dalam media osteogenik selama beberapa hari sampai menunjukkan perubahan morfologi pada sel kemudian dicuci secara perlahan menggunakan PBS dan difiksasi menggunakan 10% formaldehid. Sel kemudian diwarnai menggunakan Alizarin red untuk visualisasi kalsium. Sel dicuci dengan air steril untuk menghilangkan pewarnaan tidak spesifik, daerah yang terwarnai kemudian divisualisasi menggunakan mikroskop *inverted*.

Tabel 1 Komposisi media diferensiasi osteogenik (MDO) yang berbeda untuk menginduksi osteogenik

Media	Komposisi
Media Kontrol (MK) 1	α -MEM + PRP 2.5%
MK 2	α -MEM + PRP 5%
MDO1	α -MEM + PRP 2.5% 100 nM Dex 50 μ g/mL Asc 10 mM β -GP
MDO2	α -MEM + PRP 5% 100 nM Dex 50 μ g/mL Asc 10 mM β -GP
MDO3	α -MEM + PRP 2.5% 5 nM Dex 250 μ M Asc 10 mM β -GP
MDO4	α -MEM + PRP 5% 5 nM Dex 250 μ M Asc 10 mM β -GP

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil Diferensiasi osteogenik

MSC asal jaringan adiposa pada *pasase* 3 diberikan perlakuan dengan deksametason, asam askorbat 2-fosfat, dan β -gliserofosfat untuk menginduksi diferensiasi osteogenik. Potensi osteogenik dievaluasi dengan menggunakan alizarin red, yaitu pewarna yang memberikan warna merah terhadap deposisi kalsium. Berdasarkan hasil daerah yang terwarnai dengan alizarin red yang menunjukkan deposisi matriks termineralisasi, didapatkan bahwa hasil pewarnaan pada MDO3 dan MDO4 lebih baik dibandingkan pada MDO1 dan MDO2 (Gambar 1).

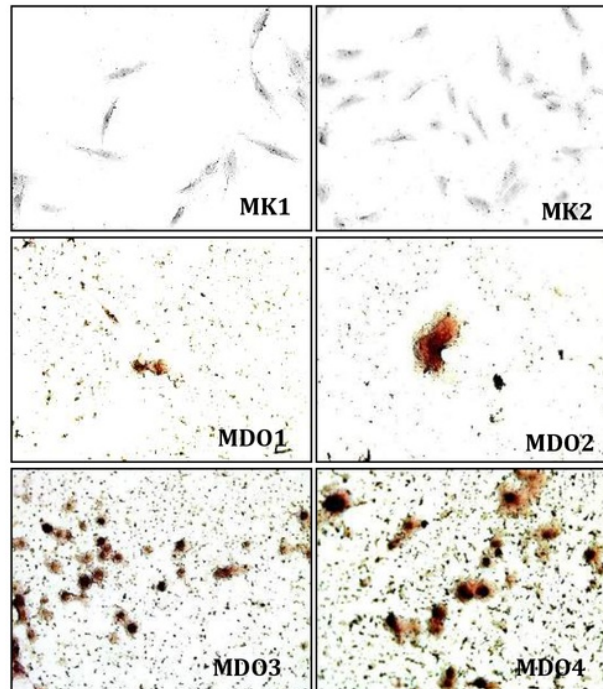
3.2. Pembahasan

Sebagai sumber MSC, jaringan adiposa dapat diperoleh dengan mudah tanpa risiko yang tinggi apabila dibandingkan dengan sumber lainnya. Jumlah sel punca yang melimpah dalam jaringan adiposa dengan kemampuan berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel menjadikannya sebagai potensi yang menjanjikan dalam terapi berbasis sel. Namun, potensi penting ini hanya dapat dijamin apabila sel-sel tersebut dapat berdiferensiasi menjadi sel osteoblas dalam kultur *in vitro*.

Fokus dalam penelitian ini adalah untuk mengevaluasi potensi osteogenik MSC asal jaringan adiposa pada media berbeda yang dikarakterisasi menggunakan alizarin red. Warna merah yang dihasilkan oleh pewarna alizarin red menunjukkan keberadaan deposisi kalsium dalam matriks ekstraseluler. Pada Gambar 1, terlihat bahwa hasil diferensiasi MSC menggunakan MDO1 dan MDO2 menunjukkan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan MDO3 dan MDO4. Selain itu, penggunaan serum PRP dengan konsentrasi yang lebih rendah, seperti pada MDO1 dan MDO3, menghasilkan jumlah sel yang relatif lebih sedikit dibandingkan sel yang dikultur dalam konsentrasi PRP 5%.

Perbedaan ini menunjukkan bahwa komposisi media osteogenik yang umumnya digunakan (MDO1 dan MDO2) ternyata masih belum optimal dalam menginduksi diferensiasi MSC asal jaringan adiposa menjadi sel osteoblas. Meskipun MSC asal sumsum tulang dan jaringan adiposa memiliki berbagai karakteristik yang serupa, namun responnya terhadap faktor induksi belum tentu identik (Shafiee *et al.*, 2011). Oleh sebab itulah, MDO1 dan MDO2 yang digunakan dalam penelitian ini masih belum mampu menginduksi diferensiasi osteogenik dengan baik karena konsentrasi komponennya yang belum dioptimalkan untuk diferensiasi MSC asal jaringan adiposa. Untuk mengetahui media osteogenik yang

optimal, MDO3 dan MDO4 yang digunakan dalam penelitian ini dibuat dengan komposisi deksametason yang lebih rendah dan asam askorbat yang lebih tinggi dibandingkan dengan MDO1 dan MDO2. Berdasarkan penelitian ini, MDO3 dan MDO4 dapat menginduksi diferensiasi osteogenik secara lebih baik dibandingkan dengan MDO1 dan MDO2.



Gambar 1. Hasil pewarnaan MSC asal jaringan adiposa untuk optimasi media osteogenik. MSC dikultur dalam empat media osteogenik berbeda selama lima hari dan diwarnai dengan menggunakan pewarna Alizarin red.

Pengaruh media osteogenik terhadap jumlah sel bergantung dengan kondisi serum. Pada kondisi serum yang lebih rendah (MDO1 dan MDO3), jumlah sel cenderung lebih sedikit dibandingkan menggunakan PRP 5% (MDO2 dan MDO4). Konsentrasi serum yang tepat diperlukan untuk meningkatkan pertumbuhan sel, sehingga penggunaan serum PRP 2.5% masih belum mampu mendukung pertumbuhan MSC asal jaringan adiposa secara optimal.

Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa MDO4 dengan menggunakan media tumbuh α -MEM + PRP 5% dapat menghasilkan diferensiasi osteoblas yang paling optimal apabila dibandingkan MDO lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh de Girolamo *et al.* (2007) yang menemukan bahwa penggunaan konsentrasi asam askorbat yang lebih tinggi dan deksametason yang lebih rendah dapat menginduksi osteogenesis pada MSC asal jaringan adiposa dengan baik. Konsentrasi asam askorbat yang tinggi dilaporkan dapat menstimulasi proliferasi MSC asal sumsum tulang dan sel seperti osteoblas tanpa kehilangan potensi diferensiasi (Takamizawa *et al.*, 2004; Maehata *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2008). Beberapa studi telah menekankan pentingnya asam askorbat dalam diferensiasi osteogenik MSC asal sumsum tulang dan sel seperti osteoblas (Hitomi *et al.*, 1992; Torii *et al.*, 1994). Di sisi lain, deksametason dalam konsentrasi tinggi telah menunjukkan penghambatan diferensiasi osteogenik, meskipun deksametason diperlukan dalam konsentrasi rendah untuk induksi osteogenik MSC yang efektif (Wang *et al.*, 2012; Coelho and Fernandes, 2000; Jaiswal *et al.*, 1997).

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang terkumpul, dapat disimpulkan bahwa MDO dengan konsentrasi Asc yang lebih tinggi dan Dex yang lebih rendah seharusnya digunakan untuk menginduksi diferensiasi osteogenik MSC asal jaringan adiposa dengan konsentrasi serum PRP 5%.

DAFTAR PUSTAKA

- Choi KM, YK Seo, HH Yoon, KY Song, SY Kwon, HS Lee, JK Park. 2008. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng*, 105, 586-594.
- Coelho MJ, MH Fernandes. 2000. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*, 21(11), 1095-1102.
- de Girolamo L., Sartori, M. F., Albisetti, W., & Brini, A. T. 2007. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 1, 154-157.
- Ehrler DM, AR Vaccaro. 2000. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop Relat Res*, 1, 38-45.
- Hitomi K, Y Torii, N Tsukagoshi. 1992. Increase in the activity of alkaline phosphatase by L-ascorbic acid-2-phosphate in a human osteoblast cell line, HuO-3N1. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 38, 535-544.
- Izadpanah R, C Trygg, B Patel, C Kriedt, J Dufour, JM Gimble, BA Bunnell. 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem*, 99, 1285-1297.
- Jaiswal N, SE Haynesworth, AI Caplan, SP Bruder. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biochem*, 64, 295-312.
- Locke M, J Windsor, PR Dunbar. 2009. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg*, 235-244.
- Maehata Y, S Takamizawa, S Ozawa, K Izukuri, Y Kato, S Sato, . . . R Hata. 2007. Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid-2-phosphate, a long acting vitamin C derivative. *Matrix Biol*, 26, 371-381.
- Marquez-Curtis, LA, A Janowska-Wieczorek, LE McGann, JW Elliott. 2015. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*, 71, 181-197.
- Meyer, U., & Wiesmann, H. P. (2006). *Bone and Cartilage Engineering*. Berlin Heidelberg: Springer.
- Moll G, JJ Alm, LC Davies, L von Bahr, N Heldring, L Stenbeck-Funke, . . . KL Blanc. 2014. Do cryopreserved mesenchymal stromal cells display impaired immunomodulatory and therapeutic properties? *Stem Cells*, 32(9), 2430-2442.
- Neovius E, T Engstrand. 2010. Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials: review over the last 11 years. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 63(10), 1615-1623.
- Patel DM, J Shah, AS Srivastava. 2013. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int*, 2013, 15.
- Shafiee A, E Seyedjafari, M Soleimani, N Ahmadbeigi, P Dinarvand, N Ghaemi. 2011. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnology Letters*, 33(6), 1257-1264.
- Takamizawa S, Y Maehata, K Imai, H Senoo, S Sato, R Hata. 2004. Effects of ascorbic acid and ascorbic acid-2-phosphate, a long acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell Biol Int*, 28, 255-265.
- Torii Y, K Hitomi, N Tsukagoshi. 1994. L-ascorbic acid-2-phosphate promotes osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 mediated by accumulation of type I collagen. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 40, 229-238.
- Wagner W, P Horn, A Castoldi, S Diehlmann, S Bork, R Saffrich, . . . AD Ho. 2008. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One*, 3(5), e2213.
- Wall, M. E., Bernacki, S. H., & Lobo, E. G. (2007). Effects of serial Passaging on the Adipogenic and Osteogenic Differentiation Potential of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering*, 13(6), 1291-1298.
- Wang, H., Pang, B., Li, Y., Zhu, D., Pang, T., & Liu, Y. (2012). Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 14, 423-430.
- Zuk PA, M Zhu, H Mizuno, J Huang, JW Fuhl, AJ Katz . . . MH Hedrick. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2), 211-228.
- Zuk P, YF Chou, F Mussano, P Benhaim, BM Wu. 2011. Adipose-derived stem cells and BMP2: part 2. BMP2 may not influence the osteogenic fate of human adipose-derived stem cells. *Connect Tissue Res*, 52, 119-132.

POTENSI SEL PUNCA MESENKIM ASAL JARINGAN ADIPOSA MENJADI SEL OSTEOLAS

ORIGINALITY REPORT

31 %

SIMILARITY INDEX

28 %

INTERNET SOURCES

28 %

PUBLICATIONS

24 %

STUDENT PAPERS

MATCH ALL SOURCES (ONLY SELECTED SOURCE PRINTED)

20%

★ tampub.uta.fi

Internet Source

Exclude quotes On

Exclude bibliography On

Exclude matches < 1%