

PS1

14

Jakarta

LAPORAN PENELITIAN

**Isolasi, Produksi dan Penyimpanan Sel Punca (*Stem Cell*) dari Sumsum Tulang
(*Bone Marrow*) Mencit sebagai Sumber *Mesenchymal Stem Cell***

Pengusul :

Drh. Wien Winarno

**BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
DEPARTEMEN KESEHATAN RI**

2011

I. LATAR BELAKANG

Terapi alternatif dengan menggunakan sel punca (*stem cell*) dalam dunia kedokteran terutama untuk pengobatan penyakit degeneratif merupakan terapi masa depan yang menjanjikan. Beberapa penyakit seperti penyumbatan pembuluh darah pada jantung, luka akibat diabetes militus dan beberapa kelainan atau cedera pada tulang telah dapat diterapi menggunakan sel punca khususnya sel punca dewasa. Penelitian-penelitian di berbagai multi senter terus dilakukan untuk terapi aplikasi maupun penelitian-penelitian dasar yang terus dikembangkan.

Dewasa ini peningkatan teknologi dalam pengarahannya dan manipulasi *stem cell* yang bersumber dari sel punca dewasa khususnya sumsum tulang terus dilakukan. Sumsum tulang terdiri dari sel punca hematopoietik, sel punca *mesenchymal* dan sel-sel endotel. Sel hematopoietik dapat pula ditemukan di darah tepi (*peripheral blood stem cell*), sel-sel ini dapat diarahkan menjadi tiga kelas sel darah yang ditemukan dalam sirkulasi: sel-sel darah putih (leukosit), sel-sel darah merah (eritrosit), dan platelet (trombosit). Sel punca *mesenchymal* memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondrosit, miosit dan sel endotel yang berperan dalam angiogenesis¹.

Keberagaman, kemampuan multipotensi dari sel punca dari sumsum tulang dan kemudahan dalam mendapatkan sumsum tulang merupakan pertimbangan yang banyak dilakukan untuk terus dapat mengoptimalkan pemanfaatan sumsum tulang menjadi sumber sel punca dewasa untuk berbagai terapi. Isolasi, memproduksi (proliferasi), penyimpanan guna ketersediaan sel punca dan pengarahannya (diferensiasi) sel punca dari sumsum tulang khususnya *mesenchymal stem cell* terus dikaji dan menjadi perhatian penting untuk kemudian dapat diaplikasikan sebagai terapi^{2,3}.

MSCs dapat diisolasi dari sumsum tulang, darah perifer, darah plasenta, fetus, jaringan lemak dan cairan maupun membran amnion. Isolasi MSCs dari sumsum tulang dapat dilakukan dengan prinsip *density gradient centrifugation* menggunakan medium Ficoll-Hypaque kemudian dikultur dalam petridish selama semalam^{4,5,6}. MSCs akan melekat pada petridish sedangkan sel-sel yang tidak melekat pada dasar petridish dibuang dan mengganti medium kultur⁷. Identifikasi MSCs menurut Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy mempunyai minimal 3 kriteria yaitu melekat pada dasar petridish

plastik (*plastic-adherent*) dengan medium kultur standar, mengekspresikan marker CD105, CD74, CD90 dan tidak mengekspresikan CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD79alpha or CD19 dan HLA-DR pada permukaan molekul. Pada manusia marker yang paling spesifik MSCs dari sumsum tulang adalah CD271^{8,9}. Kriteria yang ketiga MSCs paling tidak secara *in vitro* dapat berdiferensiasi menjadi osteoklas, adiposit dan kondroblas^{10,11}.

Simpan beku dilakukan untuk menjaga ketersediaan MSCs dalam menjaga kontinuitas riset di laboratorium atau menjamin ketersediaan MSCs saat akan dibutuhkan dibutuhkan dalam aplikasi klinis. Simpan beku MSCs yang telah diisolasi dan dikultur pada suhu -196°C (dalam nitrogen cair) merupakan cara yang paling ideal untuk menyimpan sel dalam waktu lama, karena pada suhu tersebut metabolisme sel akan berlangsung dengan sangat minimal bahkan nol sehingga sel dapat mempertahankan kelangsungan hidupnya tanpa melakukan aktifitas (nonaktif)^{2,11}. Untuk menjaga viabilitas sel yang disimpan dalam suhu sangat rendah diperlukan krioprotektan. Krioprotektan merupakan senyawa yang mampu melindungi sel dari kerusakan struktur bahkan kematian sel pada saat penyimpanan⁷.

Rumusan Masalah

Pada penelitian ini menggunakan hewan coba mencit karena mencit mempunyai kemiripan genetik dengan manusia dan mempunyai ukuran yang kecil sehingga mudah dipantau, dan beberapa penelitian serupa menggunakan mencit sebagai hewan coba.

Berdasarkan pedoman penyelenggaraan pelayanan medis sel punca di Indonesia salah satu standar laboratorium riset terapan sel punca yaitu mampu menunjang penyimpanan beku dan penggunaan sel punca yang disimpan beku untuk waktu yang sangat lama. Saat ini simpan beku (kriopreservasi) MSCs dilakukan menggunakan metode *slow cooling* yang membutuhkan alat yang mahal, waktu yang lebih lama dalam proses penyimpanan dan disimpan dalam deep freezer dengan suhu -80°C . Penyimpanan dalam suhu -80°C sel tidak akan bertahan lama karena metabolisme sel masih aktif. Dalam penelitian ini akan dilakukan simpan beku MSCs dengan teknik vitrifikasi dengan krioprotektan DMSO dan EG yang disimpan dalam N_2 cair (-196°C). Hipotesa penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan kualitas MSCs yang baik selama proses isolasi, proliferasi dan penyimpanan dengan metode vitrifikasi.

II. MANFAAT

Penelitian ini diharapkan dapat didapatkan teknologi isolasi, produksi dan simpan beku MSCs yang lebih mudah.

III. TUJUAN

1. Tujuan Umum

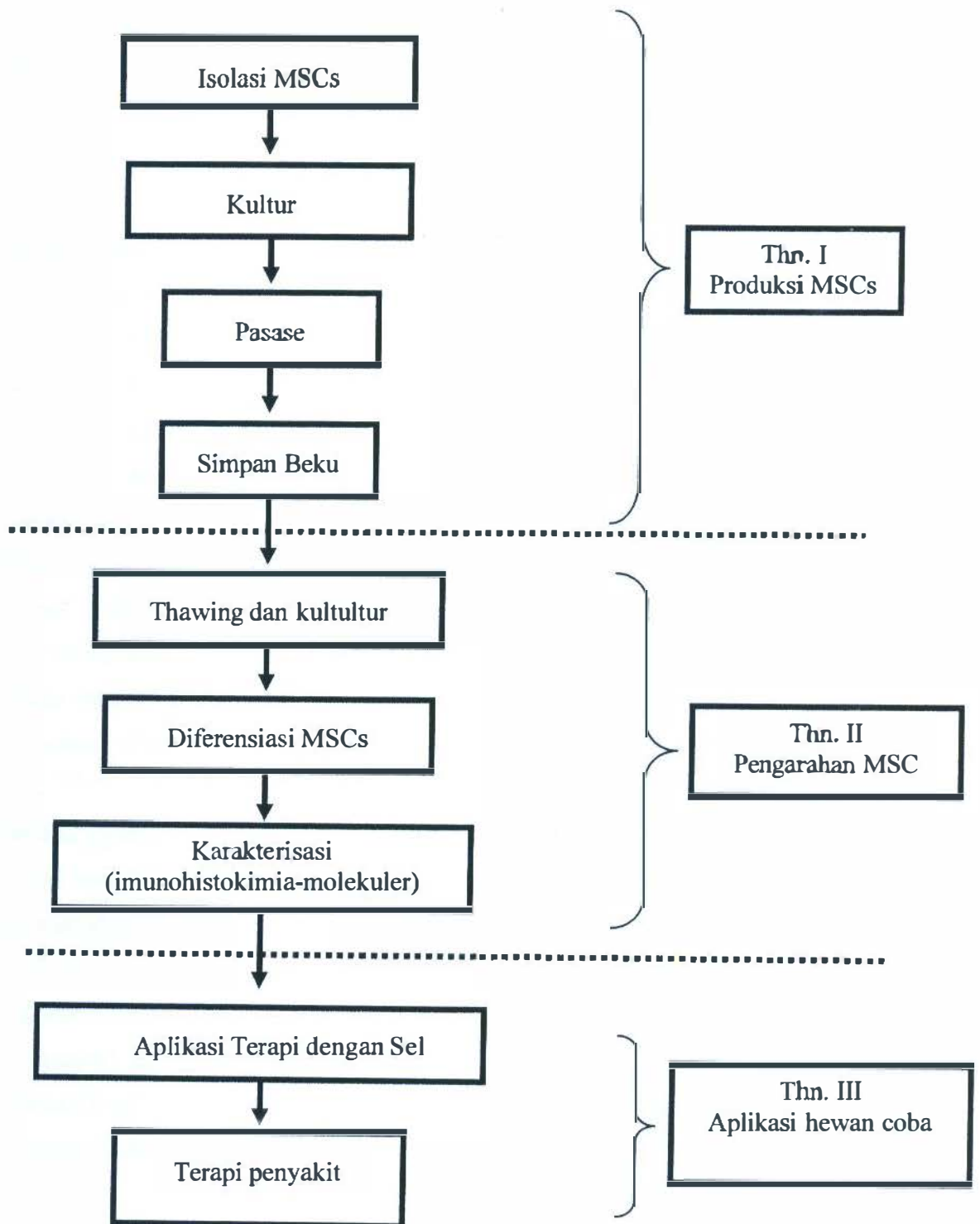
Mengisolasi, mengkultur dan menyimpan *mesenchymal stem cell* (MSCs) yang bersumber dari sumsum tulang menciit.

2. Tujuan Khusus

1. Vitrifikasi MSCs menggunakan krioprotektan EG dan Ficoll.
2. Mengevaluasi viabilitas MSCs yang telah divitrifikasi.

IV. METODE

Kerangka Pikir



Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Stem Cell* Puslit BMF Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan – Departemen Kesehatan Republik Indonesia pada tahun 2011 bulan Januari-Desember.

Populasi dan Sampel

Populasi : Jumlah hewan coba yang digunakan

Sampel : Sel punca dari sumsum tulang (MSCs)

Bahan dan Cara Kerja

Isolasi Sumsum Tulang dan MSCs

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini merupakan strain *swiss webster* betina dengan umur 6-7 minggu. Mencit betina dipelihara dalam kandang kawat dengan pemberian pakan dan minum secara adlibitum. Mencit yang akan diambil tulang femur dan tibianya diterminasi dengan cara *dislocatio cervicalis* atau pemberian eter. Menurut Carvalho AB *et al.* (2008) isolasi pada tikus dapat dilakukan dengan memotong tiap ujung tulang femur kemudian disentrifuse pada 1600 rpm selama 20 menit dengan medium phosphate buffer saline (PBS) (Gibco.21600) dan ficoll dengan perbandingan 1:1. Supernata dibuang pelet di resuspensi dengan α -MEM (Sigma.M0894) 20% FBS (Gibco.26140) dan penstrep 10.000 unit/ml (Sigma.P0781). Kultur dilakukan di dalam inkubator dengan 5% CO₂ dan 37°C^{7,12,13}.

Kultur dan Pasase *mesenchymal stem cell* dari Sumsum Tulang

Sel setelah confluent dilakukan pasase dengan membuang media dan dicuci dengan menggunakan larutan PBS pH 7,4 sebanyak 2 kali. Untuk memisahkan ikatan antar sel tambahkan 5 ml tripsin EDTA (Merk.114) 2,5 % dan inkubasi selama 5 menit dalam inkubator 37 °C¹². Tambahkan 5 ml α -MEM 20% dan lakukan tirturasi (sedot semprot). Sebanyak 0,5 ml suspensi sel dimasukkan ke dalam petri dish yang telah berisi 10 ml α -MEM 20%. Maukkan ke dalam inkubator dengan 5% CO₂ dan 37°C. Pasase dilakukan tiap 3 hari (sel telah confluent)⁴.

Vitrifikasi dan thawing mesenchymal stem cell dari Sumsu Tulang

MSCs yang telah dikultur dan mengalami pasase I ditirturasi dan diresuspensi 1×10^6 ($10 \mu\text{l}$) dengan medium equilibrasi selama 5 menit. Medium equilibrasi yang mengandung PBS 20% FBS dan *etilen glikol* (EG) 20%. Kemudian sel dimasukkan dalam medium vitrifikasi yang mengandung 40% EG, 18% Ficoll dan 0,3 M sukrosa sebanyak 500 μl selama 40 detik. Selanjutnya MSCs dimasukkan dalam *cryovial tube* dan langsung dicemplungkan ke dalam nitrogen cair⁷.

Thawing dilakukan setelah MSCs mengalami penyimpanan selama satu, dua dan tiga bulan. Menurut Moo JH *et al.* (2008) thawing dilakukan dengan memasukkan *cryovial tube* ke dalam *waterbath* 37°C sampai mencair, kemudian sel dicuci secara berturut-turut ke dalam 0,5M, 0,25M dan 0,1M sukrosa di dalam PBS 20%FBS sebelum dimasukkan ke dalam medium kultur. Setelah thawing sel di uji viabilitasnya dengan menggunakan trypan blue 0,4%.^{2,7}

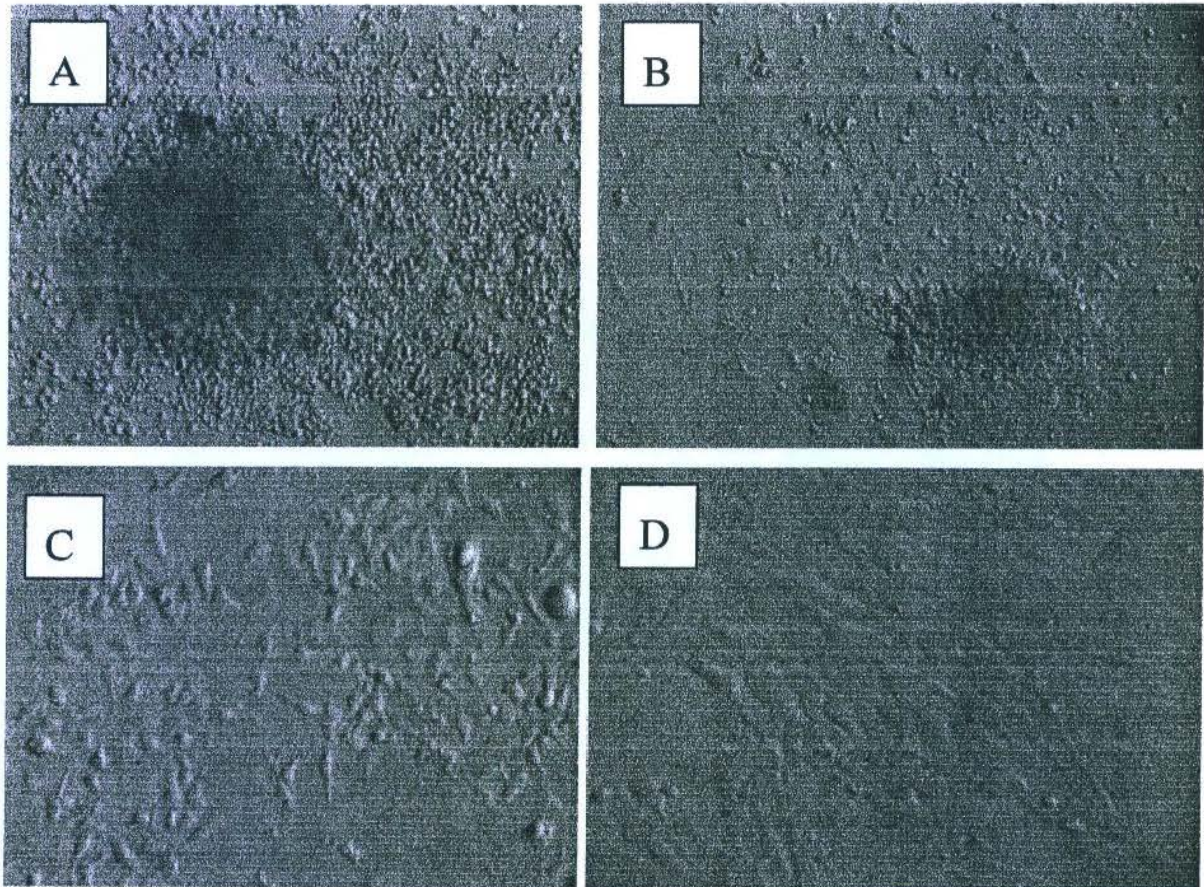
Uji Viabilitas dengan Trypan Blue

MSCs yang telah ditirturasi pada pasase I dilakukan uji viabilitas dengan trypan blue dengan perbandingan 1:3. MSCs diuji viabilitasnya sebelum maupun setelah *thawing*. Persentase hasil uji viabilitas dikatakan baik jika sel hidup yang diamati diamati mencapai 85% dan ditolak jika viabilitasnya 75%.^{2,7} Menurut Xiang *et all* (2008) setelah thawing dengan konsentrasi 3×10^4 mempunyai viabilitas 84,6%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

MSC dapat bersumber dari tali plasenta, darah perifer dan sumsum tulang. Isolasi MSC dapat dilakukan dengan menggunakan teknik sentrifugasi dengan medium ficoll. MSC yang bersumber dari plasenta dapat dilakukan isolasi dengan teknik mekanik dan ezimatik. Pada mencit isolasi MSC dari tulang femur dan tibia mencit dapat dilakukan dengan flushing menggunakan medium kultur.

MSC merupakan adherent cells (menempel pada dasar dish) dengan bentuk fibroblast-like kultur MSC. Selain itu MSC akan menunjukkan positif terhadap CD 105 dan CD 90, dan negatif pada CD 34, CD 45, CD 79. Pada femur ada MSC dan hematopoetik stem cell, pada kultur primer tampak heterogen (Gambar 1). Setelah kultur MSC mengalami pasase dan vitrifikasi secara morfologi sel tetap berbentuk fibroblast-like (Gambar 1 dan 2).

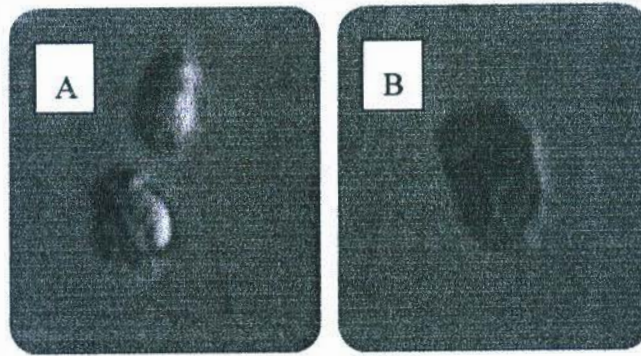


Gambar 1. A: Sel primer hasil flusing dari femur mencit; B: Kultur hari ke 2 (heterogen cell); C: Kultur hari ke 4 (homogen MSC, sel fibroblast-like); D: Kultur hari ke 7 (confluent).

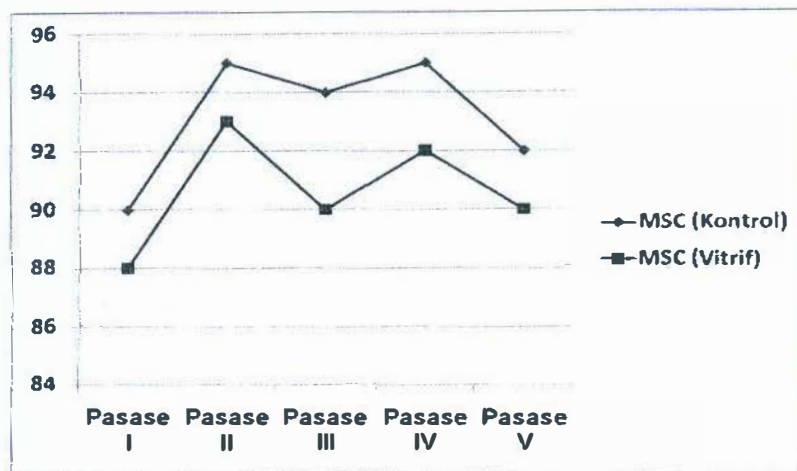
Pada metode vitrifikasi penggunaan kosentrasi krioprotektan yang tinggi dan penurunan suhu yang sangat cepat pada proses pembekuan menyebabkan tidak terbentuknya kristal es di dalam sel, karena air di dalam sitoplasma digantikan oleh krioprotektan dan menjadi glassy (kaca). Tidak terbentuknya kristal es dapat meningkatkan viabilitas sel, karena kristal es dapat merusak membran sel dan organel didalam sel yang menyebabkan sel rusak dan mati. MSC yang menunjukkan viabilitas baik tidak akan terwarnai dengan trypan blue, tetapi sebaliknya sel mati akan terwarnai (Gambar 3). Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam penggunaan krioprotektan adalah kosentrasi krioprotektan, waktu pemaparan sel terhadap krioprotektan dan suhu. Hal tersebut dapat mempengaruhi keberhasilan proses vitrifikasi yang ditunjukkan dengan kemampuan viabilitas MSC yang disimpan. Menurut Meryman H.T. (2007) kombinasi penggunaan krioprotektan seperti ethylen glycol (EG), Ficoll dan Sukrosa dapat mengurangi toksisitas terhadap sel. Menurut Xiang *et all* (2008) uji viabilitas dengan trypan blue dengan perbandingan 1:3 dapat diterima jika persentase viabilitas sel mencapai 75- 85% dengan kosentrasi 3×10^4 . Pada Gambar 4 menunjukkan viabilitas MSC kontrol maupun vitrifikasi mencapai diatas 80%.



Gambar 2. MSC kultur 7 hari setelah thawing secara morfologi MSC berbentuk seperti sel fibroblast (fibroblast-like).



Gambar 3. Uji viabilitas dengan trypan blue, A: Sel hidup, B: Sel mati.



Gambar 4. Persentase (%) Viabilitas MSC

Jenis maupun konsentrasi krioprotektan yang digunakan dalam proses vitrifikasi dan lamanya kultur *in vitro* dapat memicu abnormalitas kromosom dan instabilitas DNA, hal ini dapat menyebabkan terjadi perubahan epigenetik dan fenotip sel punca. Identifikasi dan karakterisasi merupakan hal yang harus dilakukan pada saat akan memanfaatkan sel punca hasil simpan beku.

KESIMPULAN

Metode vitrifikasi efektif dilakukan untuk simpan beku MSCs dari femur dan tibia mencit di Laboratorium Stem Cell Badan Litbangkes.

ANGGARAN DAN TOTAL REALISASI

MAK	Kegiatan	RAB	Realisasi	Sisa
	Belanja Honor	136,570,000	136,560,000	10,000
	Belanja Bahan	148,412,500	144,722,100	3,690,400
	Blj. non Opr.:	53,299,500	-	
	Perjalanan			-
	Penggandaan			
Persiapan	Perjalanan	51,000,000	50,122,000	878,000
Total		389,282,000	384,703,600	4.578,400

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Becsak Meral. Bone marrow and stem cell transplantation. 2007. Chapter 1. Molecular Profiling of Hematopoietic stem cell. 1-17. Humana Press. Totowa, New Jersey 07512.
2. Day J.G and Stacy G.N. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. 2007. *Chapter 17 Cryopreservation of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells for Therapeutic.* 237-250. Humana Press Inc. 999 Riverview Drive, Suite 208. Totowa, New Jersey 07512.
3. Jameson JL. Principles of Molecular medicine. 1998. Molecular Neurobiology. 871-890. Press Inc. 999 Riverview Drive, Suite 208. Totowa, New Jersey 07512.
4. Phinney D.G and Bunnell B.A. Mesenchymal Stem Cell. 2008. Chapter 3 A Method to Isolate and Purify Human Bone Marrow Stromal Stem Cell. 45-56. Humana Press. Totowa, New Jersey 07512.
5. Gu S, Xing CZ, Han J, Tso MOM and Hong J. D. 2009. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Molecular Vision.* 15:99-107.
6. Aini N, Setiawan B dan Sandra F. Karakteristik Biologis dan Diferensiasi stem cell fokus pada mesenchymal stem cell. *CDK.* 15:30-34.
7. Moo JH, Lee JR, Jeel BJ, Sun S, Kim SH, Jung H and Kim HK. 2008. Successful vitrification of human amnion derived mesenchymal stem cell. *Human Reproduction* 23 (8):1760-1770.
8. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H and Sekiya I. 2007. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 327(3):449-62
9. Lei Z, Yongda L, Jun M, Yingyu S, Shaoju Z, Xinwen Z and Mingxue Z. 2007. Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int.* 31(9):916-23.
10. Kim S, Honmou ●, Kato K, Nonaka T, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. 2006. Neural differentiation potential of peripheral blood- and bone-marrow-derived precursor cells. *Brain Res.* 6;1123(1):27-33
11. Lee KD. 2008. Application of mesenchymal stem cell: An updated review. *Chang Gung Med J.* 31: 228-36.

12. Tseng PY, Chen CJ, Sheu CC, Yu CW, and Huang YS. 2007. Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cell in long term culture. *J. Vet. Med. Sci.* 69(2):95-102.
13. Peng H, Wang TH, Chao AS and Cheng SD. 2007. Human mesenchymal stem cell obtained from second trimester amniotic fluid experiments at Chang Gung Memorial Hospital. *Chang Gung Med.J.* 30: 402-7.
14. Woods EJ, Perry BC, Hockema J, Larson L, Zhou D and Goebel WS. 2009. Optimized cryopreservation method for human dental pulp derived stem cell and their tissue of origin for banking and clinical use. *Cryobiol.* 59(2):150-157
15. Xiang Y, Zheng Q, Jia B, Huang G, Xu Y, Wang J and Pan Z. 2007. Ex vivo expansion and pluripotential differentiation of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cell. *J Zhejiang Univ Sci B.* 8(2): 136-146.
16. Cavalho AB, Quintanilha LF, Dias JV, Parades BD and Mannheimer EG. 2008. Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Do Not Reduce Fibrosis or Improve Function in Rat Model of Severe Chronic Liver Injuring. *Stem Cell.* 26: 1307-1314.