

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tiga dekade terakhir, *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) telah secara intensif diteliti dan digunakan secara klinis sebagai terapi. *Stem cell* atau sel punca diartikan secara fungsional sebagai sel yang mempunyai kemampuan untuk memperbaharui diri (*self renewal*) serta dapat menghasilkan sel lain yang berbeda (Kuchroo *et al.*, 2015). Mekanisme utama MSC berkontribusi dalam proses penyembuhan luka seperti perbaikan struktural luka melalui diferensiasi selular, memacu kondisi imunitas, memproduksi faktor pertumbuhan yang mendorong neovaskularisasi dan re-epitelisasi serta memobilisasi lingkungan *stem cell* yang ada (Balaji *et al.*, 2012). Untuk merangsang mobilisasi *Mesenchymal Stem Cell* digunakan mediator sinyal yaitu *Chemokine*, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF), *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (G-CSF), *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor* (GM-CSF), *Erythropoietin* (EPO), *Angiopoietin-2*, *Fibroblast Growth Factor*, *Placental Growth Factor* (PIGF), *Platelet-Derived Growth Factor-CC* (PDGF), *Stem Cell Factor* (SCF), *Interleukin* (IL)-2, IL-3, IL-6, IL-8, dan IL-1 β juga berperan merangsang mobilisasi MSC (Ding, 2011). Pada dasarnya, MSC yang tidak teraktivasi dapat mengekspresikan sitokin dan faktor pertumbuhan, namun dalam jumlah yang terbatas (Kuchroo *et al.*,

2015). Jumlah mediator yang di ekspresikan MSC dapat ditingkatkan, salah satunya adalah melalui proses aktivasi MSC (Berk *et al.*, 2010). Hal tersebut dapat dilakukan dengan menginduksi MSC dengan berbagai macam mediator, seperti TNF- α (Kang *et al.*, 2012). *Tumor Nekrosis Factor- α* (TNF- α) dalam kegunaannya pada jaringan yang rusak, mampu mengaktifkan kemampuan *stem cell* (Berk *et al.*, 2010). Akan tetapi penelitian mengenai kadar PDGF yang dihasilkan oleh MSC teraktivasi TNF- α *recombinant* dalam berbagai dosis tertentu belum banyak diteliti.

Penelitian terkait stem cell meningkat karena banyaknya penyakit yang sulit untuk disembuhkan (Marr, 2010). Menurut survei yang dilakukan oleh *World Health Organisation* (WHO), Indonesia merupakan negara dengan jumlah penderita diabetes terbesar ke empat di dunia. Dari tahun ke tahun angka kejadian diabetes terus meningkat. Pada tahun 2003 sebanyak 194 juta orang, tahun 2005 meningkat menjadi 200 juta orang, dan di perkirakan pada tahun 2025 jumlah pasien menjadi 334 juta orang (Wild *et al.*, 2004). Banyak sekali di jumpai berbagai komplikasi dari penyakit diabetes, Infeksi Kaki Diabetik (IDK) yang merupakan salah satu komplikasi tersering yang menyerang ekstremitas bawah. Seiring dengan peningkatan penggunaan stem cell sebagai terapi, dibutuhkan teknik agar tidak terjadi kegagalan regenerasi pada terapi dengan MSC yang menimbulkan kerugian pada pasien. Kegagalan regenerasi dimungkinkan terjadi karena MSC yang tidak teraktivasi oleh TNF- α akan menyebabkan mediator-mediator penyembuhan jaringan seperti PDGF tidak dapat

dibentuk oleh MSC (Kang, 2012). Dari uraian tersebut diatas menunjukkan bahwa kegagalan terapi dapat diakibatkan oleh tidak adanya MSC's yang teraktivasi sebelumnya, salah satunya oleh induksi TNF- α *recombinant*.

Stem cell yang telah teraktivasi akan menghasilkan faktor-faktor pertumbuhan untuk membantu proses perbaikan misalnya *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF). PDGF merupakan salah satu faktor pertumbuhan, atau protein yang mengatur pertumbuhan dan pembelahan sel (Luttenberger *et al.*, 2000). Secara khusus, memainkan peranan penting dalam pembentukan pembuluh darah (angiogenesis), pertumbuhan pembuluh darah dari jaringan pembuluh darah yang sudah ada. PDGF adalah mitogen kuat untuk sel asal mesenchymal, termasuk sel-sel otot polos dan sel glial (Luttenberger *et al.*, 2000). Reseptor untuk PDGF, PDGFR diklasifikasikan sebagai *Reseptor Tirosin Kinase* (RTK), jenis reseptor permukaan sel (Kayali *et al.*, 2005). PDGF mengikat ligan PDGFR yang terletak di dalam domain imunoglobulin kedua dan ketiga. Setelah aktivasi oleh PDGF, reseptor-reseptor ini dimerisasi, dan diaktifkan dengan auto-fosforilasi beberapa situs di domain sitosolik mereka, yang berfungsi untuk memediasi pengikatan kofaktor dan kemudian sinyal transduksi, misalnya, melalui jalur PI3K atau melalui *spesies oksigen reaktif* (ROS) aktivasi dimediasi dari jalur STAT3 (Kayali *et al.*, 2005).

Berdasarkan uraian pada latar belakang diatas, maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian TNF- α dalam berbagai dosis

terhadap PDGF dalam MSC untuk mengetahui dosis mana yang tepat untuk keberhasilan terapi.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut, dapat dirumuskan masalah sebagai berikut, “Adakah pengaruh pemberian TNF- α dosis rendah terhadap kadar PDGF pada MSC?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui pengaruh pemberian TNF- α dosis rendah terhadap kadar PDGF pada MSC .

1.3.2. Tujuan Khusus

- 1.3.2.1. Mengetahui rata-rata kadar PDGF dengan pemberian rekombinan TNF- α dosis 2,5 ng/ml pada MSC.
- 1.3.2.2. Mengetahui rata-rata kadar PDGF dengan pemberian rekombinan TNF- α dosis 5 ng/ml pada MSC.
- 1.3.2.3. Mengetahui rata-rata kadar PDGF dengan pemberian rekombinan TNF- α dosis 10 ng/ml pada MSC.
- 1.3.2.4. Mengetahui beda pemberian rekombinan TNF- α antar tiap kelompok dengan kontrol.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

1.4.1.1. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan sumbangan informasi di bidang kesehatan tentang pengaruh TNF- α terhadap kadar PDGF.

1.4.1.2. Sebagai acuan untuk peneliti selanjutnya tentang pengaruh TNF- α terhadap kadar PDGF.

1.4.2. Manfaat Praktis

Pemberian TNF- α dapat meningkatkan kadar PDGF dalam *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) yang teraktivasi TNF- α .

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)*

2.1.1. Definisi

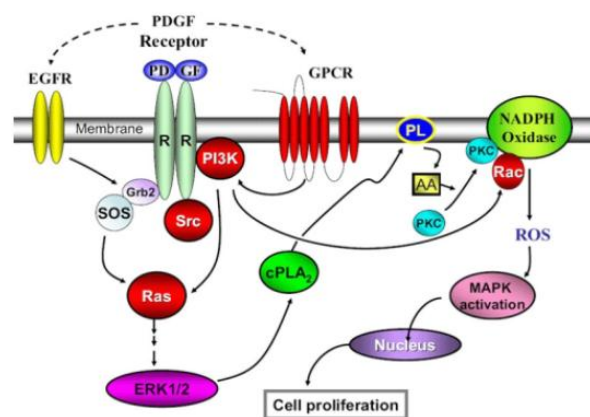
Platelet-derived growth factor (PDGF) merupakan salah satu faktor pertumbuhan (*Growth Factor*), atau protein yang mengatur pertumbuhan dan pembelahan sel (Luttenberger *et al.*, 2000). Pada tikus dan manusia, jaringan signaling PDGF terdiri dari empat ligan, PDGFA-D, dan dua reseptor, PDGFR alpha dan PDGFR beta (Nandy dan Mukhopadhyay, 2011). Di sintesis, disimpan dalam butiran alpha trombosit, dan dirilis oleh trombosit pada saat aktivasi, juga diproduksi oleh sejumlah besar sel termasuk sel otot polos, makrofag, dan sel-sel endotel (Nandy dan Mukhopadhyay, 2011).

2.1.2. Jenis PDGF

Setidaknya terdapat lima isoform yang berbeda dari PDGF yang mampu mengaktifkan respon seluler melalui dua reseptor yang berbeda (Nandy dan Mukhopadhyay, 2011). Dikenal ligan termasuk A (PDGFA), B (PDGFB), C (PDGFC), dan D (PDGFD), dan heterodimer AB dan reseptor alpha (PDGFRA) dan beta (PDGFRB). PDGF memiliki beberapa anggota famili lainnya, misalnya VEGF sub-famili (Nandy dan Mukhopadhyay, 2011).

2.1.3. Peranan PDGF

Secara khusus, PDGF memainkan peran penting dalam pembentukan pembuluh darah (angiogenesis), pertumbuhan pembuluh darah dari jaringan pembuluh darah yang sudah ada. PDGF adalah mitogen kuat untuk sel mesenchymal, termasuk sel-sel otot polos dan sel glial (Luttenberger *et al.*, 2000). PDGF dan *epidermal growth factor* (EGF) berasal dari platelet dan makrofag merupakan sinyal utama ke fibroblasts (Broughton *et al.*, 2006; Gurtner, 2007). Fibroblast bermigrasi menuju tempat luka dari jaringan sekitarnya, kemudian mulai mensintesis kolagen dan berkembang biak. Respon PDGF, fibroblast sementara mensintesis matriks yang terdiri dari kolagen tipe III, *glycosaminoglycans*, dan *fibronectin* 1 yang menyediakan tempat untuk migrasi keratinosit (Gurtner, 2007). Secara singkat, peningkatan PDGF di jaringan mempercepat waktu untuk terjadinya proses penyembuhan (Volarevic *et al.*, 20



Gambar 2.1. TNF- α PDGF Pathway (Kayali *et al.*, 2005)

2.2. *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α)

2.2.1. Definisi

Tumor Nekrosis Faktor (TNF) dihasilkan terutama oleh sel makrofag dan berbagai jenis sel dengan berbagai aktivitas biologi pada sel-sel sasaran. Sel makrofag akan menghasilkan TNF apabila mendapat rangsangan yang cocok seperti dari sel NK dan limfosit. (Sukhanov *et al.*, 2007). Terdapat banyak proses yang melibatkan TNF seperti IL-1 yang akan menginduksi produksi TNF dan sebaliknya, produksi IFN- β 1 dan IFN- β 2 oleh fibroblast serta produksi *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) oleh berbagai sel (Durum dan Muege, 2003).

Tumor Nekrosis Faktor memiliki 2 bentuk, yaitu *Tumor Nekrosis Faktor- α* (TNF- α) dan *Tumor Nekrosis Faktor- β* (TNF- β). *Tumor Nekrosis Faktor - α* diproduksi oleh makrofag, sel B, T, NK, Kuppfer dan Astrosit. Saat ini beberapa studi melaporkan bahwa terjadi peningkatan produksi TNF- α pada beberapa penyakit, namun belum ditemukan nilai *cut off point* (Durum dan Muege, 2003).

2.2.2. Fungsi

Beberapa fungsi TNF dijabarkan sebagai berikut (Abbas *et al.*, 2012):

1. TNF sebagai sitotoksik yaitu kematian sel akan dipercepat apabila terdapat hambatan sintesis protein dalam sel. Sel

makrofag yang teraktifasi dan menghasilkan TNF dapat membunuh sel-sel junior.

2. TNF pada radang yaitu saat ini TNF dianggap sebagai mediator utama yang berperan dalam proses peradangan. Pada penelitian akhir-akhir ini menunjukkan bahwa TNF diperoleh secara biokimiawi bertanggung jawab kepada aktifitas "*cahectin*" yang bekerja pada penderita infeksi parasit. Sel netrofil yang bereaksi dengan TNF meningkatkan pengikatan dengan sel endotel, letupan respiratori dan degranulasi.
3. TNF pada hematopoetik yaitu aktifitas dalam penghambatan biakan granulosit-monosit, eritrosit dan sel multi-potensial pada sumsum tulang manusia.
4. TNF pada imunologik yaitu TNF mempunyai aktivitas perangsangan terhadap limfosit T teraktifkan, contohnya pada respon proliferaatif limfosit T pada antigen, peningkatan reseptor IL-2 serta induksi produksi IFN- γ . TNF dapat meningkatkan ekspresi antigen *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas I pada sel endotel dan fibroblast.

2.3. Mesenchymal Stem Cell (MSC)

2.3.1. Definisi

Mesenchymal Stem Cell (MSC) merupakan salah satu dari stem cell dewasa yang belum berdiferensiasi, bahkan terkadang

ditemukan dalam keadaan inaktif pada suatu jaringan yang telah memiliki fungsi spesifik dalam tubuh. *Stem cell* ini mampu berdiferensiasi menjadi osteosit, kondrosit, adiposit, dan berbagai jenis sel penyusun jaringan ikat lainnya. Namun, MSC dapat melakukan transdiferensiasi yaitu mampu berdiferensiasi menjadi sel dewasa, di luar alur diferensiasi yang biasanya terjadi pada *stem cell* tersebut, seperti menjadi sel-sel saraf (Halim *et al.*, 2010).

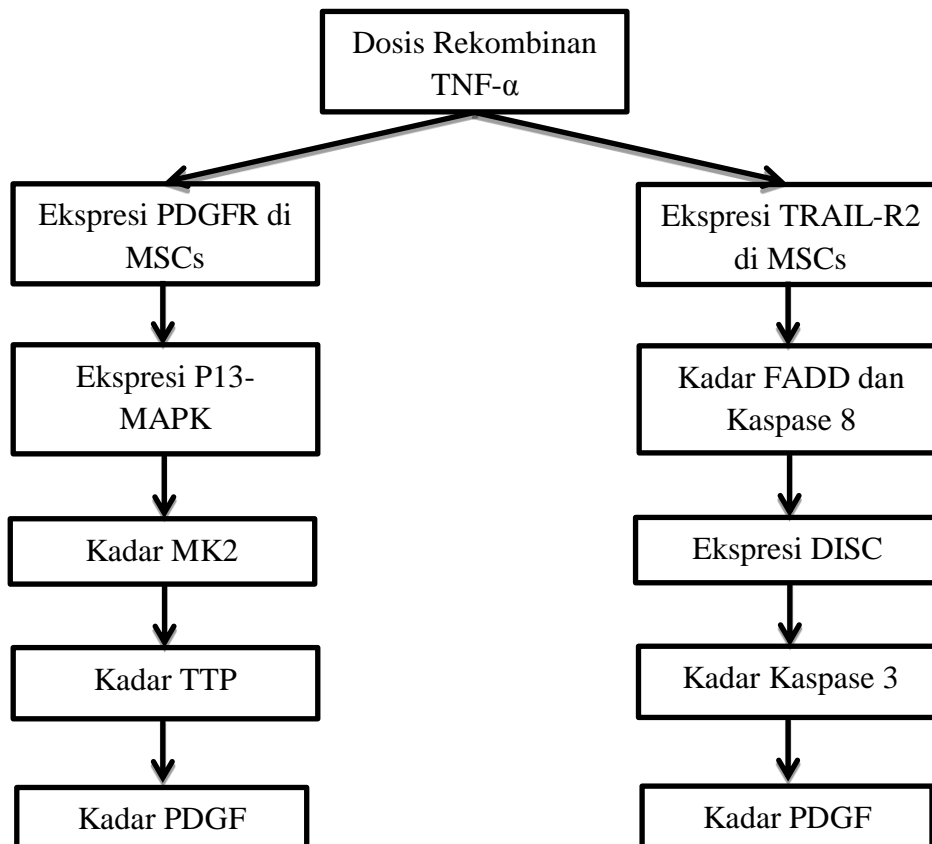
2.3.2. Karakteristik

Sesuai dengan konsensus *The International Society of Cellular Therapy*, sebuah sel yang tergolong *mesenchymal stem cell* harus memiliki karakteristik; pertama, MSC menempel pada permukaan plastik saat dikultur di cawan palstik. Kedua, MSC's memiliki molekul protein permukaan (*Cluster of Differentiation/CD*): CD73, CD90, dan CD 105. Berbeda dengan stem cell hematopoeitik, MSC's tidak mengekspresikan CD 34, CD14, CD45, dan *Human Leukocyte Antigen-DR* (HLA-DR). Ketiga, mampu berdiferensiasi sesuai 3 jalur utama diferensiasi mesenkimal, yaitu osteogenik (menjadi sel tulang/osteosit), kondrogenik (menjadi sel tulang rawan/kondrosit), dan adipogenik (menjadi sel lemak/adiposit) *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006).

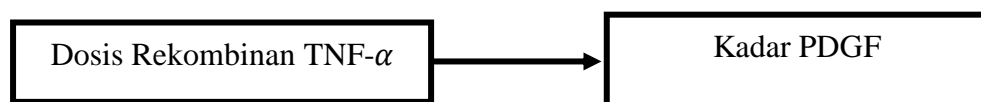
2.4. Hubungan Pengaruh Pemberian TNF- α Dosis Rendah pada *Mesenchymal Stem Cell* Terhadap Kadar PDGF

Pengekspresian PDGF dapat diatur dengan cara dipicu oleh beberapa stimuli, seperti pada keadaan hipoksia, nitrit oksida, hormone estrogen, serta mediator-mediator seperti *Insulin like Growth Factor* (IGF-1) dan *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- α) (Kang *et al.*, 2012). PDGF dapat ditingkatkan salah satunya oleh rangsangan inflamatorik. Peningkatan PDGF yang terjadi akibat rangsangan TNF- α melalui jalur PI3K atau melalui *spesies oksigen reaktif* (ROS) aktivasi dimediasi dari jalur STAT3 (Kayali *et al.*, 2005). Aktifasi *PI3K pathway* selanjutnya akan mengaktifkan MSC melalui ikatan yang dibentuk antara TNF- α dengan reseptor pada MSC. Melalui jalur PI3K inilah MSC dapat aktif dan kemudian diikuti dengan pengekspresian mediator seperti PDGF. Sehingga bila terdapat peningkatan kadar PDGF, maka proses regenerasi jaringan yang rusak akan semakin cepat terjadi (Kwon *et al.*, 2013).

2.6. Kerangka Teori



2.7 Kerangka Konsep



2.8 Hipotesis

Terdapat pengaruh pemberian TNF- α dosis rendah pada *Mesenchymal Stem Cell* terhadap kadar PDGF.