

DISERTASI

**PERAN SECRETOME MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA DALAM
MEMPERBAIKI FIBROSIS HATI (STUDI EKSPERIMEN ANALISIS
TERHADAP IL-4, IL-13, IL-10, TGF-BETA, DAN SMA-SEL STELLA PADA
ANIMAL MODEL FIBROSIS HATI YANG DIINDUKSI CCL4)**

**ROLE OF THE SECRETOME MESENCHYMAL STEM CELLSHYPOXIA
IN IMPROVING LIVER FIBROSIS (EXPERIMENTAL STUDY OF
ANALYSIS OF IL-4, IL-13, IL-10, TGF-BETA, AND SMA-STELLA CELLS IN
ANIMAL MODEL OF CCL4 INDUCED LIVER FIBROSIS)**



FARID AMANSYAH

C013191024

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2023

DISERTASI

**PERAN SECRETOM MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA DALAM
MEMPERBAIKI FIBROSIS HATI (Studi Eksprimen Analisis terhadap IL-
4, IL-13, IL-10, TGF-BETA, DAN SMA-SEL STELLA PADA HATI TIKUS
FIBROSIS YANG DIINDUKSI CCL4)**

**ANTIHYPERTENSIVE EFFECT OF BENINCASA HISPIDA (Thunb.)
Cogn. SEED EXTRACT BASED ON ANGIOTENSIN II, ENDOTELIN-1 AND
NITRIC OXIDE GENES mRNA EXPRESSION OF RATS
HYPERTENSION L-NAME INDUCED**

Disusun dan diajukan
Oleh

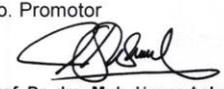
Farid Amansyah
C013191024

*Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal, 9 Januari 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

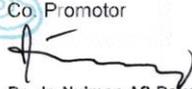
Menyetujui
Promotor,


Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed
Nip. 19661213 199503 1 009

Co. Promotor


Prof. Dr. drg. Muh. Harun Achmad, M.Kes, Sp.GKA(K)
Nip. 197105232002121002

Co. Promotor


Dr. dr. Nu'man AS Daud, Sp.PD-KGEH
Nip. 197112142000031004

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,


Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes
Nip.19671103 199802 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,


Prof. Dr. dr. Haerani Rasvid, M.Kes, Sp.PD-KGH, FINASIM Sp.GK
Nip.19680530 199603 2 001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp. (0411)586010, (0411)586297
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Farid Amansyah
NIM : C013191024
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

PERAN *SECRETOME MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA* DALAM MEMPERBAIKI FIBROSIS HATI (STUDI EKSPERIMEN ANALISIS TERHADAP IL-4, IL-13, IL-10, TGF-BETA, DAN SMA-SEL STELLA PADA *ANIMAL MODEL* FIBROSIS HATI YANG DIINDUKSI CCL4)

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 18 Januari 2023

Yang menyatakan,



Farid Amansyah

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena atas rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul “PERAN SECRETOME MESENCHYMAL STEM CELLS HYPOXIA DALAM MEMPERBAIKI FIBROSIS HATI (STUDI EKSPERIMEN ANALISIS TERHADAP IL-4, IL-13, IL-10, TGF-BETA, DAN SMA-SEL STELLA PADA *ANIMAL MODEL* FIBROSIS HATI YANG DIINDUKSI CCL4) ini.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.MedEd sebagai promotor dan Prof. Dr. drg. Muh. Harun Achmad, M.Kes, SP.GKA(K) dan Dr. dr. Nu'man AS Daud, Sp.PD-KGEH, FINASIM sebagai co-promotor yang telah mencurahkan waktunya untuk membimbing, memberikan saran, perbaikan ataupun kritik serta memberikan dorongan secara terus-menerus kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan disertasi ini. Tidak lupa saya ucapkan banyak terima kasih kepada seluruh Tim Penguji Assoc. Prof. Dr. dr. Agung Putra, M.Si.Med selaku penguji eksternal, Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK(K), dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K), dr. Marhaen Hardjo, Ph.D, M.Biomed, Dr. dr. A.M. Luthfi Parewangi, Sp.PD-KGEH, Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes sebagai penguji internal yang telah memberi saran, kritik dan masukan pada disertasi ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Rektor Universitas Hasanuddin, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dan Ketua Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran FK Unhas yang telah memfasilitasi proses pendidikan sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S3 di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Penulis mengucapkan terima kasih kepada kedua orang tua, istri dan anak tercinta, serta seluruh keluarga atas motivasi,

dorongan, dan pengertiannya sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang memberikan dukungan kepada penulis yang tidak bisa disebutkan satu persatu sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan disertasi ini. Semoga kebaikan-kebaikan dari semua pihak diatas dicatat sebagai amal ibadah oleh Allah SWT.

Penulis menyadari bahwa disertasi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran sangat penulis harapkan untuk dapat menyempurnakan disertasi ini.

Makassar, 18 Januari 2023

Farid Amansyah

ABSTRAK

FARID AMANSYAH. *Peran Secretome Mesenchymal Stem Cells Hypoxia terhadap Ekspresi IL-4, IL-13, IL-10, TGF β , α SMA, Densitas Kolagen, dan Persentase Survival pada Tikus Model Fibrosis Hati yang diinduksi CCL-4 (dibimbing oleh Budu, Muh. Harun Achmad, dan Nu'man As Daud).*

Fibrosis hati adalah proses patologis yang paling umum yang ditandai dengan aktivasi hepatosit yang menyebabkan akumulasi matriks ekstraseluler. *Mesenchymal stem cells hipoksia* (H-MSC) dapat meningkatkan kemampuan imunomodulator dan regenerasinya melalui ekspresi sitokin antiinflamasi dan faktor pertumbuhan, yang dikenal sebagai *secretome* H-MSCs (SH-MSC) sehingga mampu memperbaiki fibrosis hati. Namun, penelitian mengenai efikasi dan mekanisme kerja SH-MSCs dalam memperbaiki fibrosis hati masih belum dilakukan. Penelitian ini bertujuan menganalisis potensi terapeutik dan mekanisme yang mendasar SH-MSC dalam pengobatan fibrosis hati. Model tikus fibrosis hati dibuat dengan induksi CC-14 selama delapan minggu. Tikus diberi SH-MSCs dan *secretome* MSCs *normoxia* (SN-MSCs) yang berhasil difiltrasi menggunakan *tangential flow filtration* (TFF) berdasarkan berbagai kategori *cut-off* berat molekul secara intravena masing-masing pada dosis 0,5 mL. Metode ELISA digunakan untuk menganalisis sitokin dan faktor pertumbuhan yang terkandung dalam SH-MSC dan SN-MSC. Jaringan hati tikus dikoleksi pada hari ke-9 untuk analisis histologis dan ekspresi m-RNA. Hasil analisis ELISA menunjukkan bahwa SH-MSCs memberikan tingkat VEGF, PDGF, b-FGF, IL-10, TGF β , dan IL-6 yang lebih melimpah daripada SN-MSCs. Administrasi SH-MSC *in vivo* mampu mengurangi insiden kematian fibrosis hati. Analisis gambaran histopatologis kasar menunjukkan bahwa SH-MSCs menurunkan area fibrosis hati. SH-MSCs juga secara optimal menurunkan area positif kolagen, ekspresi α SMA dan TGF β serta meningkatkan ekspresi IL-4, IL-13 dan IL-10. Sisi lain, SN-MSCs juga memberikan perbaikan fibrosis hati meskipun SH-MSCs menunjukkan hasil yang lebih optimal. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa SH-MSC dapat memperbaiki fibrosis hati yang diinduksi CC-14

Kata kunci: *secretome*, H-MSCs, fibrosis hati, kolagen



ABSTRACT

FARID AMANSYAH. *The Role of Secretome of Hypoxia-preconditioned Mesenchymal Stem Cells on IL4, IL13, IL10 TGF β , α SMA Expression, Collagen Density, and Percent Survival in CCL4-induced Fibrosis Rat Model* (supervised by Budu Muh. Harun Achmad, Nu'man As D'aud)

The aim of this study is to investigate the therapeutic potential and underlying mechanism of SH-MSCs in the treatment of liver fibrosis. Liver fibrosis (LF) is a pathological process characterized by hepatocytes activation leading to accumulation of extracellular matrix (ECM). Hypoxia-preconditioned MSCs (H-MSCs) could enhance their immunomodulatory and regeneration capability, through the expression of anti-inflammatory cytokines and growth factor, known as H-MSCs secretome (SH-MSCs) that is critical for the improvement of liver fibrosis. However, the study regarding efficacy and mechanism of action of SH-MSCs in ameliorating liver fibrosis is still inconclusive, so a CC14-induced liver fibrosis rat model is established. Rats were administered with SH-MSCs and secretome of normoxia MSCs (SN-MSCs) that was successfully filtrated using tangential flow filtration (TFF) based on various molecular weight cut-off categories, intravenously both at dose of 0.5 mL. ELISA was used to analyse the cytokines and growth factors containing in SH-MSCs and SN-MSCs. The rats were sacrificed at day nine and liver tissues were collected for histological and mRNA expression analysis. Based on the results, ELISA show that SH-MSCs provides more abundant level of VEGF, PDGF, bFGF, IL-10, TGF β , and IL-6 than SN-MSCs. *In vivo* administration of SH-MSCs remarkably reduces the death incidents. The analysis of gross histopathological appearance shows that SH-MSCs reduces liver fibrosis area. SH-MSCs also optimally reduces the collagen positive regions, α -SMA, and TGF- β expression and induces IL4, IL13, dan IL10 expression. On the other hand, SN-MSCs also provides liver fibrosis improvement, even though SH-MSCs shows more optimal results. The findings suggest that SH-MSCs can improve CC14-induced liver fibrosis.

Keywords: secretome, H-MSCs, liver fibrosis, collagen



DAFTAR ISI

SAMPUL.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR TABEL	xiError! Bookmark not defined.
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH, DAN LAMBANG.....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Pertanyaan Penelitian.....	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Patofisiologi Fibrosis Hati	7
2.2. Mekanisme Fibrogenesis Hati.....	11
2.3. Inflamasi sebagai Kunci Fibrogenesis Hati.....	12
2.4. Konsep Mekanistik Fibrosis Hati.....	15
2.5. Peran Mesenchymal stem cells (MSC) pada Cedera Hati (Liver Injury)	17
2.6. Secretome MSC	188
2.7. Efek Fungsional Secretome MSC	20
2.8. Keunggulan Terapi Sekretom	21
2.9. Riset tentang MSC	22

BAB 3 KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, VARIABEL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	26
3.1 Kerangka Teori	26
3.2 Kerangka Konsep.....	27
3.3 Variabel Penelitian.....	27
3.4 Hipotesis Penelitian	27
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	29
4.1. Desain Penelitian	29
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	30
4.3. Populasi dan Sampel Penelitian	30
4.3.1. Populasi Penelitian.....	30
4.3.2. Sampel Penelitian	30
4.4. Besar Sampel	31
4.5. Kelompok Perlakuan.....	32
4.6. Tahapan Penelitian.....	32
4.6.1. Pengajuan ethical clearance	32
4.6.2. Teknik isolasi primer MSC.....	32
4.6.3. Teknik Subcultur/Passage MSC	33
4.6.4. Validasi MSC.....	34
4.6.5. Inkubasi MSC pada Kondisi Hipoksia.....	34
4.6.6. Pengambilan secretom MSC.....	35
4.6.7. Pembuatan Tikus Model Fibrosis Hati	35
4.6.8. Pengambilan Sampel Serum Tikus	36
4.7 Pengambilan sampel jaringan	36
4.7.1. Pembuatan preparat histologi dan immunostaining	36
4.8 Identifikasi Variabel.....	38
4.8.1 Variabel Independen :	38
4.8.2 Variabel Dependen :	38
4.9. Batasan Operasional.....	38
4.9.1 Variabel Independen.....	38

4.10. Instrumen dan Bahan Penelitian	411
4.11. Analisis Data	43
4.12. Alur Penelitian	43
4.13. Etik Penelitian	44
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	46
5.1. HASIL PENELITIAN	46
5.1.1 Validasi MSCs	46
5.1.2 Morfologi stem cell.....	47
5.1.3 Uji diferensiasi adipogneik	47
5.1.4 Uji diferensiasi osteogenik	48
5.1.5 Uji flowcytometry terhadap marker MSC	48
5.1.6 Profiling Kandungan Biomolekul Secretome MSCs	49
5.1.7 Pembentukan Jaringan Kolagen pada Hepar Fibrosis	50
5.1.8 Ekspresi Protein Alpha SMA pada Jaringan Hepar	522
5.1.9 Ekspresi Gen pada Jaringan Hepar	55
5.1.10 Interaksi Sitokin IL-10, IL-13, IL-4 & TGF Beta.....	64
5.2. PEMBAHASAN	70
5.3 Keterbatasan Penelitian.....	74
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	75
6.1 KESIMPULAN	75
6.2 SARAN	76
DAFTAR PUSTAKA	77
LAMPIRAN.....	88

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Riset MSC pada Cedera Hati	25
Tabel 3.1 Varuabel Independen.....	38
Tabel 3.2 Variabel Perantara	39
Tabel 5.1 Analisis Kandungan Sitokin dan Faktor Pertumbuhan SH-MSCs And SN-MSCs	49
Tabel 5.2 Perbedaan Densitas Kolagen Hati Tikus	54
Tabel 5.3 Perbedaan Ekspresi mRNA gen IL-10 Jaringan Hati Tikus	57
Tabel 5.4 Perbedaan Ekspresi gen mRNA IL-13 Hati Tikus	59
Tabel 5.5 Perbedaan Ekspresi mRNA IL-4 Hati Tikus	61
Tabel 5.6 Perbedaan Ekspresi mRNA TGF Beta Hati Tikus	63
Tabel 5.7 Korelasi Sitokin IL-10, IL-13, IL-4, TGF-Beta, Alfa SMA dan Densitas Kolagen Jaringan Hati Tikus	65
Tabel 5.8 Rangkuman Rangkaian Regresi Linier dari Variabel Sitokin dan Proses Fibrosis Hati Tikus	66

DAFTAR GAMBAR

Gambar 5.11 Box plot Alfa-SMA	57
Gambar 5.12 Ekspresi Gen IL-13 Hepar	58
Gambar 5.13 Box plot Ekspresi mRNA IL-13	59
Gambar 5.14 Ekspresi Gen IL-4 pada Setiap Kelompok	60
Gambar 5.16 Ekspresi Gen TGF-Beta Hepar	63
Gambar 5.17 Box plot Ekspresi mRNA TGF-Beta	64
Gambar 5.18 Kadar SGPT	69
Gambar 5.19 Kadar SGOT	70

DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH, DAN LAMBANG

LF	: <i>Liver fibrosis</i>
ECM	: <i>Ekstraseluler Matriks</i>
HSC	: <i>Hepatic Stellate Cell</i>
PSH	: <i>Penyakit Sirosis Hepatis</i>
Th2	: <i>T Helper 2</i>
MMP	: <i>matrix metalloproteinases</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
M	: <i>macrophage</i>
α -SMA	: <i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>
TGF- β 1	: <i>Transforming Growth Factor-β1</i>
SGOT	: <i>Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase</i>
SGPT	: <i>Serum Glutamic Pyruvic Transaminase</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
CD	: <i>cluster of differentiation</i>
NASH	: <i>nonalcoholic steatohepatitis</i>
HGF	: <i>hepatocyte growth factor</i>
CLD	: <i>chronic liver diseases</i>
SCCR	: <i>Stemp Cell and Cancer</i>
HGF	: <i>hepatocyte growth factor</i>
DAMPs	: <i>damage-associated patterns</i>
HLA-DR	: <i>Human Leukocyte Antigen-DR</i>
CO ₂	: <i>Karbon Dioksida</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Liver fibrosis (LF) merupakan deposisi *Ekstraseluler Matriks* (ECM) berlebih dari *Hepatic Stellate Cell* (HSC) yang teraktivasi. Berlanjutnya akumulasi ECM akan membentuk jaringan parut di sekeliling area cedera pada hati yang dapat menyebabkan Penyakit Sirosis Hepatis (PSH).^{1,96} Akumulasi ECM terjadi akibat dari peningkatan sintesis dan penurunan kemampuan hati untuk mendegradasi ECM (35). Cedera hati yang berkepanjangan menarik sel inflamasi, termasuk sel T helper 2 (Th2) datang ke area luka dan melepaskan beberapa sitokin pro-inflamasi seperti Interleukin 4 (IL-4) dan IL-13 yang mendorong proliferasi sel *macrophage* tipe 1 (M1) menjadi makrofage tipe 2 (M2). Sel M2 mampu mensekresikan *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1) untuk mengaktivasi HSC yang ditandai dengan ekspresi *Alpha Smooth Muscle Actin* (α-SMA). Sisi lain, sel M1 tidak dapat memproduksi enzim pendegradasi ECM, termasuk *matrix metalloproteinases* (MMP) karena telah berpolarisasi menjadi M2. Hal ini menyebabkan akumulasi ECM semakin meningkat.²⁻³

Data *epidemiologis* melaporkan bahwa PSH telah menyebabkan kematian lebih dari 700.000 jiwa di seluruh dunia setiap tahun.^{4,97} Kematian disebabkan oleh penurunan fungsi liver akibat inflamasi berkepanjangan yang ditandai dengan peningkatan kadar *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT) dan *Serum Glutamic Pyruvic Transaminase* (SGPT) pada serum. Inflamasi yang berkepanjangan menyebabkan tidak terproduksinya sitokin anti inflamasi seperti IL-10 sehingga berujung pada proses fibrogenesis yang berkelanjutan. IL-10 sebagai sitokin antiinflamasi juga bersifat antifibrotik karena mampu mengurangi atau menghilangkan produksi ECM. IL-10 mampu menghambat aktivasi HSC oleh TGF beta yang dapat menghentikan sintesis ECM. Selain itu IL-10 mampu menghambat produksi IL4 dari dan IL-13 dari sel Th2 yang berujung pada terhambatnya

polarisasi M1 menjadi M2 sehingga MMP dapat dilepaskan untuk mendegradasi ECM yang telah terbentuk.⁵⁻¹⁰

Saat ini transplantasi hati merupakan terapi yang paling efektif untuk menyembuhkan pasien PSH. Namun demikian, transplantasi hati memiliki beberapa keterbatasan seperti terbatasnya donor dan adanya potensi risiko berupa penolakan dari tubuh resipien.^{11,98} Oleh karena itu penelitian untuk menemukan terapi efektif untuk PSH masih perlu dilakukan, termasuk penggunaan senyawa yang mengandung sitokin antifibrosis salah satunya adalah Sekretom dari *Mesenchymal Stem Cell* (MSC).^{84,85,95}

Mesenchymal Stem Cell (MSC) dalam beberapa tahun terakhir telah diteliti sebagai terapi pada beberapa penyakit regeneratif. *Mesenchymal Stem Cell* merupakan sel progenitor stroma multipoten yang mengekspresikan penanda permukaan *cluster of differentiation* 105 (CD105), CD90, CD73, CD44 tetapi tidak mengekspresikan penanda endotel atau pun hematopoietik (CD31, CD45, CD43, CD14, CD11b), molekul histokompatibilitas kompleks (MHC) kelas II, dan protein kostimulatori (CD80, CD86, CD40).⁹⁹⁻¹⁰²

Mesenchymal stem cell dilaporkan mampu melepaskan sitokin antifibrotik termasuk IL-10 yang dapat menghambat fibrogenesis serta memicu pendegradasian ECM yang berujung pada penurunan fibrosis pada hati.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Walaupun demikian, MSC juga mempunyai beberapa keterbatasan, seperti yang telah ditunjukkan oleh penelitian sebelumnya, bahwa tingkat kelangsungan hidup, kemampuan untuk mendatangi sel target, fasilitas penunjang kultur dan transportasi, serta biaya terapi yang mahal dapat menjadi kekurangan dalam penerapan terapi MSC.(Ahangar et al., 2020)

Penelitian terkini melaporkan bahwa MSC yang dikultur pada kondisi hipoksik dapat meningkatkan pelepasan sitokin, termasuk IL-10. Hal ini akan meningkatkan kemampuan potensi sekretom MSC dalam penyembuhan fibrosis yang dapat dilihat dari penurunan kolagen dan α -SMA. Jalur penurunan fibrosis melalui penghambatan polarisasi M1 menjadi M2 dapat dilihat dengan mengukur jumlah sel Th2 serta konsentrasi IL-4 dan IL-13 yang merupakan factor pemicu polarisasi.¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ Namun demikian, penelitian yang mengkaji peran sekretom MSC yang telah dihipoksik dalam penurunan

jumlah kolagen dan ekspresi α -SMA serta perbaikan fungsi liver pada LF melalui penghambatan proliferasi sel Th2 dan pelepasan IL-4 dan IL-13 belum pernah dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah

Penyakit sirosis hati (PSH) merupakan salah satu penyebab kematian yang cukup tinggi setiap tahunnya. Kematian disebabkan oleh penurunan fungsi hati akibat inflamasi yang berkepanjangan, tidak diproduksi anti-inflamasi seperti IL-10 yang mampu menghambat produksi IL-4 dan IL-13 dari Th2 dan menghambat aktivasi HSC oleh TGF- β membentuk α -smooth Muscle actin (α -SMA) yang berujung dengan terakumulasinya ECM yang akan membentuk jaringan kolagen melalui proses fibrogenesis pada jaringan hati. Telah dilaporkan Mesenchymal Stem Cells (MSCs) mampu melepaskan sitokin antifibrotik, termasuk IL-10. Hasil penelitian terkini melaporkan bahwa MSCs yang dikultur pada kondisi hipoksik dapat meningkatkan pelepasan sitokin, termasuk IL-10. Oleh karena itu, apakah pemberian MSCs pada tikus yang mengalami fibrosis hati karena diinduksi CCL4 dapat menghambat atau memperbaiki jaringan hati yang mengalami proses fibrinogenesis. Manakah yang lebih

baik efeknya, MSCs-hipoksik atukah tanpa hipoksik?

Bagaimana mekanismenya dalam kaitannya dengan sitokin

IL-10, IL-4, IL-13, TGF- β , α -SMA dan densitas kolagen

jaringan hati?

1.3 Pertanyaan Penelitian

1. Apakah ada perbedaan densitas kolagen jaringan hati tikus yang diinduksi CCL4 antara yang tidak diberi sekretom MSCs dan yang diberi sekretom MSCs tanpa hipoksik (SN-MSCs) serta sekretom MSCs-hipoksik (SH-MSCs) ?
2. Apakah ada perbedaan α -SMA jaringan hati tikus yang diinduksi CCL4 antara yang tidak diberi sekretom MSCs dan yang diberi sekretom MSCs tanpa hipoksik (SN-MSCs) serta sekretom MSCs-hipoksik (SH-MSCs)
3. Apakah α -SMA berkorelasi dengan densitas kolagen hati tikus yang diinduksi CCL4, baik pada kelompok tanpa diberi sekretome MSCs maupun kelompok SN-MSCs dan SH-MSCs?
4. Apakah ada perbedaan ekspresi mRNA IL-10 jaringan hati tikus yang diinduksi CCL4 antara yang tidak diberi sekretom MSCs dan yang diberi sekretom MSCs tanpa hipoksik (SN-MSCs) serta sekretom MSCs-hipoksik (SH-MSCs)?
5. Apakah ada perbedaan ekspresi mRNA IL-4 jaringan hati tikus yang diinduksi CCL4 antara yang tidak diberi sekretom MSCs dan yang diberi sekretom MSCs tanpa hipoksik (SN-MSCs) serta sekretom MSCs-hipoksik (SH-MSCs)?
6. Apakah ada perbedaan ekspresi mRNA IL-13 jaringan hati tikus yang diinduksi CCL4 antara yang tidak diberi sekretom MSCs dan yang diberi sekretom MSCs tanpa hipoksik (SN-MSCs) serta sekretom MSCs-hipoksik (SH-MSCs)?

7. Apakah ada perbedaan ekspresi mRNA TGF- β jaringan hati tikus yang diinduksi CCL4 antara yang tidak diberi sekretom MSCs dan yang diberi sekretom MSCs tanpa hipoksik (SN-MSCs) serta sekretom MSCs-hipoksik (SH-MSCs)?
8. Bagaimana keterkaitan sitokin-sitokin (IL-10, IL-4, IL-13 dan TGF- β jaringan hati) yang terlibat dalam proses inflamasi yang mengakibatkan fibrosis hati (α -SMA dan densitas kolagen jaringan hati, dan kemudian dapat menjelaskan mekanisme kerja sekretom MSCs menghambat proses fibrosis hati akibat diinduksi CCL4?

1.4 Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum :

Untuk mengetahui pengaruh pemberian sekretom MSCs-hipoksia dan membandingkan dengan sekretom MSCs-tanpa hipoksia terhadap perbaikan proses fibrosis hati pada tikus yang diinduksi dengan CCL4 dan mengamati perubahan ekspresi IL-10, IL-4, IL-13, TGF- β dan produksi protein α -SMA dalam hubungannya dengan densitas kolagen jaringan hati tikus yang mengalami proses fibrosis hati akibat diinduksi CCL4.

2. Tujuan Khusus :

1. Diketuainya perbedaan densitas kolagen jaringan hati tikus yang diinduksi CCL4 antara yang tidak diberi sekretom MSCs dan yang diberi sekretom MSCs tanpa hipoksik (SN-MSCs) serta sekretom MSCs-hipoksik (SH-MSCs).
2. Diketuainya perbedaan α -SMA jaringan hati tikus yang diinduksi CCL4 antara yang tidak diberi sekretom MSCs dan yang diberi sekretom MSCs tanpa hipoksik (SN-MSCs) serta sekretom MSCs-hipoksik (SH-MSCs).
3. Diketuainya korelasi α -SMA dengan densitas kolagen hati tikus yang diinduksi CCL4, baik pada kelompok tanpa diberi sekretom MSCs maupun kelompok SN-MSCs dan SH-MSCs.

4. Diketuainya perbedaan ekspresi mRNA IL-10 jaringan hati tikus yang diinduksi CCL4 antara yang tidak diberi sekretom MSCs dan yang diberi sekretom MSCs tanpa hipoksik (SN-MSCs) serta sekretom MSCs-hipoksik (SH-MSCs).
5. Diketuainya perbedaan ekspresi mRNA IL-4 jaringan hati tikus yang diinduksi CCL4 antara yang tidak diberi sekretom MSCs dan yang diberi sekretom MSCs tanpa hipoksik (SN-MSCs) serta sekretom MSCs-hipoksik (SH-MSCs).
6. Diketuainya perbedaan ekspresi mRNA IL-13 jaringan hati tikus yang diinduksi CCL4 antara yang tidak diberi sekretom MSCs dan yang diberi sekretom MSCs tanpa hipoksik (SN-MSCs) serta sekretom MSCs-hipoksik (SH-MSCs).
7. Diketuainya perbedaan ekspresi mRNA TGF- β jaringan hati tikus yang diinduksi CCL4 antara yang tidak diberi sekretom MSCs dan yang diberi sekretom MSCs tanpa hipoksik (SN-MSCs) serta sekretom MSCs-hipoksik (SH-MSCs).
8. Diketuainya keterkaitan sitokin-sitokin (IL-10, IL-4, IL-13 dan TGF- β jaringan hati) yang terlibat dalam proses inflamasi yang mengakibatkan fibrosis hati (α -SMA dan densitas kolagen jaringan hati, dan kemudian dapat menjelaskan mekanisme kerja sekretom MSCs menghambat proses fibrosis hati akibat diinduksi CCL4.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Pengembangan Ilmu :

1. Saat ini pengembangan *secretom stem cell* sangat jarang dengan teknik *hipoxia*, padahal dengan teknik ini maka *stem cell* lebih banyak menghasilkan *secretom* yang mengandung sitokin antiinflamasi lebih banyak. Oleh karena itu penelitian ini bermanfaat dalam rangka mendukung pembuatan *secretom stem cell* dengan teknik *hipoxia* dibanding dengan stem cell dengan teknik konvensional. Dengan

demikian pengembangan *secretom stem cell* dengan sitokin yang lebih berkualitas lebih produktif lagi.

2. Mendorong penggunaan *secretom stemcell hipoxia* untuk beberapa penyakit degeneratif lainnya sehingga makin meningkatkan harapan hidup di negara kita.
3. Memberikan paradigma baru pada dunia kedokteran di negara kita yang berbasis pada kemampuan anak bangsa

2. Manfaat Klinis

1. Pemberian *secretom stem cell* untuk penanganan *Fibrosis* hati khususnya di Indonesia belum berkembang. Bahkan belum pernah dilakukan untuk *secretom stem cell hipoxsia*. Penelitian ini membuka peluang penanganan fibrosis hati yang lebih komprehensif dan menjanjikan sehingga kualitas pengobatan penyakit fibrosis hati lebih komprehensif lagi.
2. Memberikan harapan hidup penderita penyakit fibrosis hati serta mengurangi angka kematian akibat gagal hati dimana primer pentyakitnya adalah fibrosis hati.
3. Mengurangi biaya pengobatan penderita fibrosis hati dengan memanfaatkan teknologi yang dapat dikembangkan lebih sustain dengan memanfaatkan *laboratorium biomolekuler* yang ada di Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Patofisiologi Fibrosis Hati

Beragam riset yang dilakukan selama lebih dari 25 tahun terakhir telah berfokus di sejumlah mekanisme seluler dan molekuler yang bertanggung jawab atas fibrogenesis hati. Dalam terminologi biologi molekuler, fibrogenesis merupakan proses dinamis yang dikarakterisasi oleh akumulasi berkesinambungan dari ECM fibrilar yang terkait dengan degradasi dan remodeling berkelanjutan dalam konteks kerusakan jaringan kronis. Fibrosis muncul sebagai hasil statis saat degradasi tidak mencukupi.¹

Fibrosis hati (*liver fibrosis*) adalah akumulasi matriks ekstraseluler di perenkim hati yang berlebihan sebagai respons terhadap cedera kronis. Cedera dapat berasal dari virus, autoimun, kolestatik, toksik, atau penyakit metabolik, termasuk *nonalcoholic steatohepatitis*. Fibrosis kronis berproses dari fibrosis yang berlanjut menjadi sirosis dengan karakterisasi pembentukan septa dan *rings* jaringan *scar* yang dikelilingi oleh nodul-nodul dari hepatosit yang *survive*. Mekanisme utama yang menyebabkan fibrosis hati adalah aktivasi kronis dari reaksi penyembuhan luka. Proses penyembuhan luka biasanya ditandai dengan rangkaian peristiwa biologis yang melibatkan sel dan faktor soluble yang bertujuan untuk mengatasi cedera jaringan tunggal. Secara umum, kejadian dan efektor ini diatur dalam sekuens logis, sesuai dengan aktivasi langkah berikutnya, didahului oleh resolusi fase sebelumnya.^{2,3}

Proses ini, yang sangat efisien dengan adanya kerusakan jaringan akut tunggal, menyebabkan jaringan parut menjadi progresif saat kerusakan jaringan menjadi kronis. Dengan kata lain, proses pengendapan matriks fibrillar dan regenerasi jaringan yang terorganisir menjadi pilihan terbaik untuk menjaga kontinuitas jaringan. Modifikasi dalam komposisi ECM (terutama kolagen tipe I dan III) tidak hanya memiliki implikasi mekanis dan

fisik yang jelas tetapi juga implikasi biokimia, sehingga berkontribusi pada modulasi beberapa fungsi seluler (pertumbuhan, migrasi, ekspresi gen) melalui interaksi langsung antara komponen ECM dan molekul adhesi sel, dan dengan berfungsi sebagai reservoir untuk mediator proinflamasi dan profibrogenik.⁴

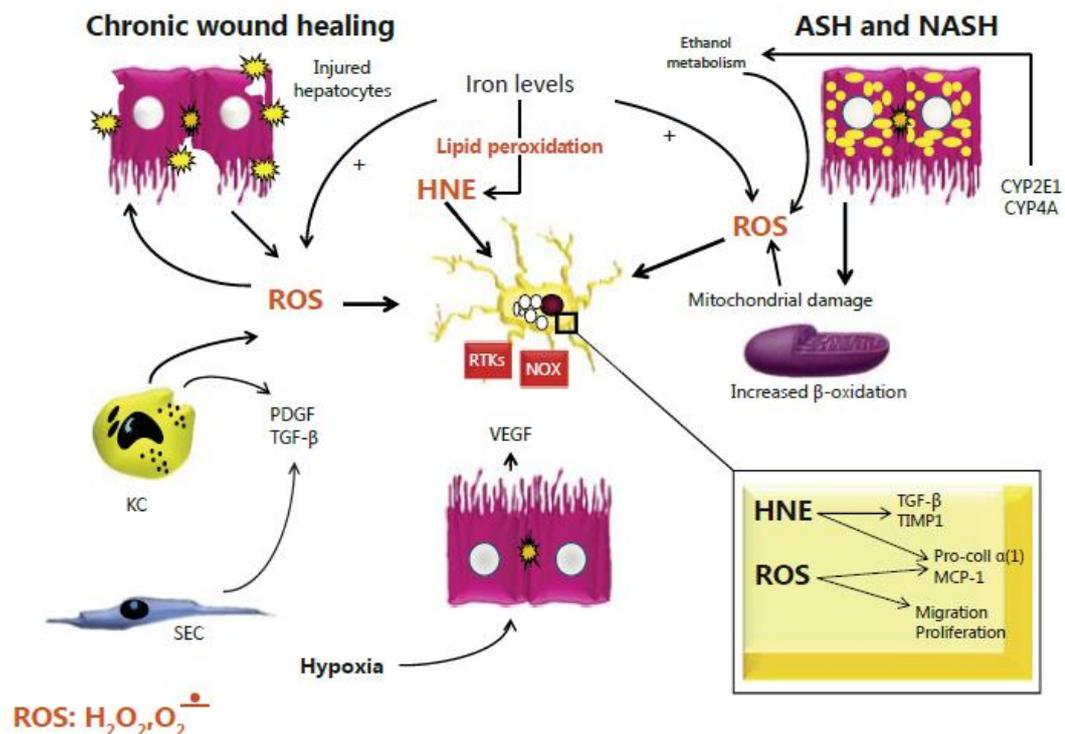
Jenis sel fibrogenik yang terdapat di hati direpresentasikan oleh *hepatic stellate cell* (HSC). HSC dicirikan oleh kemampuan fisiologis untuk menyimpan retinil ester dalam droplet lipid intrasitoplasmik, oleh karakteristik *ultrastructural pericytes* vaskular berkontribusi pada regulasi aliran darah sinusoid.⁵

Proses aktivasi HSC dan transformasi fenotip menjadi miofibroblas, serta peran profibrogeniknya, telah diklarifikasi secara ekstensif dan merupakan dasar penting untuk memahami proses fibrogenik hepatic. Sekarang terbukti bahwa sel-sel penghasil ECM yang berbeda, masing-masing dengan lokalisasi yang berbeda dan karakteristik imunohistokimia dan/atau fenotip mikroskopis elektron, dapat berkontribusi terhadap kejadian fibrosis hati.⁶

Hal ini termasuk fibroblas dan miofibroblas dari saluran portal, sel-sel otot polos yang terlokalisasi di dinding pembuluh darah dan miofibroblas yang bertempat di sekitar vena sentrolobular. Juga terbukti bahwa partisipasi relatif dari jenis sel yang berbeda ini bergantung pada perkembangan pola fibrosis yang berbeda. Selain sel mesenkim yang menetap, miofibroblas dapat berasal dari populasi sel-sel unik mirip fibroblas yang bersirkulasi yang berasal dari stem cells sumsum tulang, umumnya dinamakan 'fibrosit'.⁷

Selain penyembuhan luka kronis, keterlibatan stres oksidatif telah didokumentasikan pada semua gangguan fibrogenik yang ditandai dengan kerusakan jaringan kronis dan overekspresi gen-gen kritis terkait inflamasi dan remodeling ECM. Stres oksidatif akibat adanya radikal bebas serta penurunan efisiensi pertahanan antioksidan tidak hanya mewakili konsekuensi toksik potensial dari cedera jaringan kronis, tetapi secara aktif berkontribusi terhadap remodeling jaringan dan fibrogenesis yang berlebihan.⁸

Karenanya, *reactive oxygen species* (ROS) atau aldehida reaktif (khususnya 4-hidroksi-2,3-nonenal; HNE) yang dilepaskan oleh sel-sel tetangga yang rusak atau teraktivasi dapat secara langsung mempengaruhi perilaku miofibroblas dengan upregulasi gen-gen profibrogenik, termasuk prokolagen tipe I, MCP-1 dan inhibitor jaringan metallopeptidase-1.⁹



Gambar 1. ROS dan berbagai mediator terkait sebagai stimuli profibrogenik. *Oxidative stress* sebagai hasil dari keberadaan radikal bebas serta penurunan efisiensi pertahanan antioksidan yang secara aktif berkontribusi terhadap proses *remodeling* dan fibrogenesis jaringan secara berlebihan. ROS atau aldehida reaktif (khususnya HNE) dilepaskan oleh sel-sel tetangga (*neighboring cells*) yang rusak atau teraktivasi yang dapat secara langsung memengaruhi perilaku miofibroblas melalui upregulasi gen-gen profibrogenik, termasuk *procollagen* tipe I, MCP-1 dan *tissue inhibitor of metallopeptidase-1* (TIMP1). Keterangan: PDGF = Platelet-derived growth factor; KC = Kupffer cell; SEC = sinusoidal endothelial cell; ASH = alcoholic steatohepatitis; coll = collagen. Sumber gambar: (Pinzani M, 2015).

Sejalan dengan ini, stres oksidatif merupakan mekanisme profibrogenik yang dominan dalam kondisi seperti hepatitis alkoholik

kronis dan *nonalcoholic steatohepatitis* (NASH). Dalam pengaturan ini, fibrosis perisinusoidal dapat berkembang secara independen dari inflamasi dan nekrosis jaringan karena aksi profibrogenik langsung dari ROS, HNE, dan asetaldehida dalam kasus penyalahgunaan alkohol kronis.¹⁰

2.2. Mekanisme Fibrogenesis Hati

Akhir-akhir ini, perhatian telah semakin bergeser ke lingkungan mikro dari profibrotik hati dengan meningkatnya minat untuk peran sel-sel imun dan subset spesifik dari makrofag yang mengatur perkembangan atau regresi fibrosis, peran mikrobiota usus, dan pengaruh kekakuan jaringan.¹¹⁻¹³

Bidang perkembangan utama lainnya termasuk peran hipoksia pada jaringan, pembentukan lingkungan proinflamasi anaerobik, dan pengaruh modifikasi epigenetik dalam mengkondisikan perkembangan fibrosis.¹⁴⁻¹⁶

Di antara mekanisme yang muncul ini, perubahan mekanisme imunitas bawaan dalam pembentukan lingkungan proinflamasi dan profibrogenik sistemik yang mempengaruhi perkembangan *chronic liver diseases* (CLD) berperan penting. Hubungan simbiosis yang ada antara mikroflora usus dan inang manusia berperan penting dalam memodulasi homeostasis imunologi dan merupakan bagian integral dari kesehatan. Pada CLD, kombinasi disbiosis (misalnya ketidakseimbangan antara spesies bakteri patogen dan nonpatogenik), peningkatan permeabilitas intestinal, perubahan pertahanan usus, dan penurunan surveilans imunologis menyebabkan peningkatan migrasi bakteri atau beragam produk bakteri dari lumen intestinal ke limfonodi mesenterika, dan organ atau lokasi ekstraintestinal lainnya. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa translokasi bakteri berkontribusi terhadap CLD, terutama di NASH.¹⁷⁻¹⁸

Secara khusus, perhatian difokuskan pada produk sampingan bakteri yang disebut pathogen associated molecular patterns (PAMPs). PAMP adalah lipoprotein, DNA dan RNA untai ganda bakteri, yang dikenali oleh pattern

recognition receptors (PRRs) yang ada di berbagai macam sel, termasuk fibroblas.¹⁹

Interaksi antara PAMP dan PRR berfungsi sebagai garis pertahanan lini pertama selama proses infeksi dan mengaktifkan berbagai sitokin proinflamasi dan respons kemokin. Dalam konteks ini, sangatlah relevan bahwa fibroblas, miofibroblas, dan pericytes vaskular mengekspresikan berbagai PRR, termasuk *Toll-like receptors* (TLRs), dan bahwa ligan milik mereka itu dapat langsung mengaktifkan jenis sel ini dan mendorong diferensiasinya menjadi miofibroblas penghasil kolagen.^{20, 21}

Selain itu, setelah stimulasi dengan TLR4 *ligand lipopolysaccharide* (LPS) atau asam lipoteikoat ligan TLR2, fibroblas mengaktifkan jalur-jalur mitogen-activated protein kinase, mentranslokasikan NF- κ B, dan mensekresikan sejumlah besar sitokin-sitokin dan kemokin proinflamasi.²²

Interaksi antara PAMP dan PRR, terutama TLR, juga penting untuk pembentukan kondisi proinflamasi / profibrogenik di distrik vaskular yang ditentukan, yaitu sirkulasi portal, dengan aktivasi TLR yang mengekspresikan HSC dengan sejumlah PAMP berlebihan yang mencapai hati sebagai konsekuensi permeabilitas intestinal yang abnormal dalam kondisi tertentu, seperti: penyalahgunaan alkohol kronis, diabetes, dan obesitas.^{23, 24}

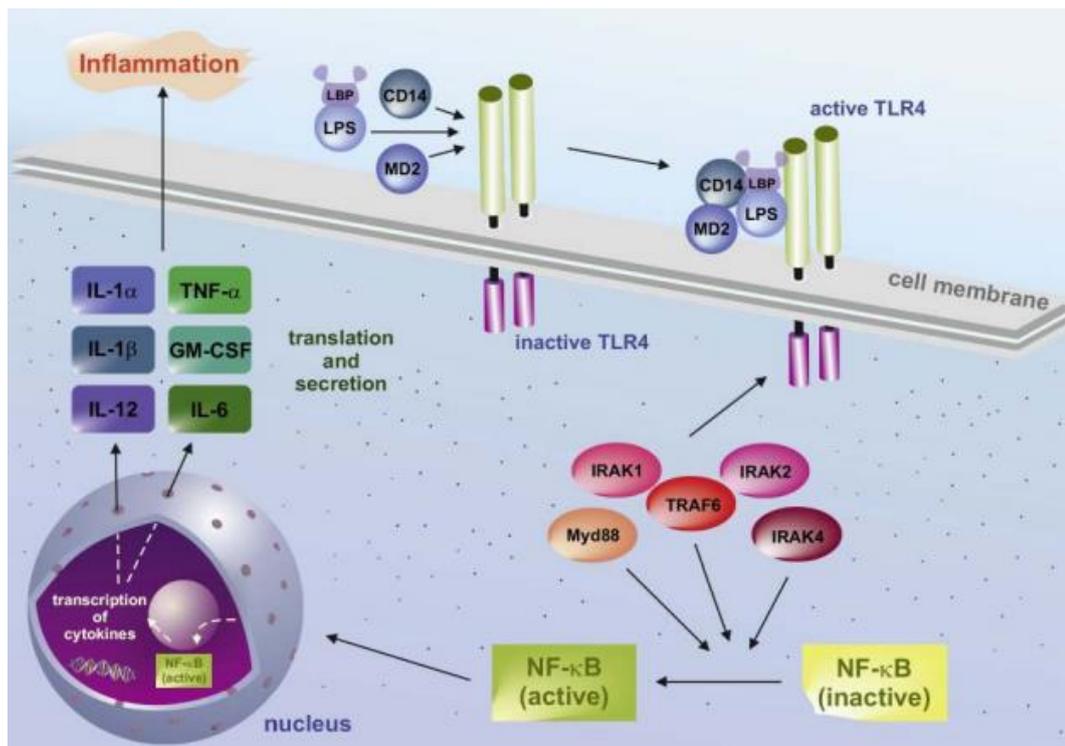
2.3. Inflamasi sebagai Kunci Fibrogenesis Hati

Peradangan kronis yang persisten merupakan ciri khas (*hallmark*) yang terkait dengan fibrosis hepatic progresif dan perkembangan sirosis. Inflamasi adalah proses yang diinisiasi oleh sel-sel imun tissue resident, seperti makrofag, terutama sel-sel Kupffer, sel-sel dendritik (DC), sel-sel mast, dan lain-lain.^{25,26}

Selama bertahun-tahun, pemahaman molekuler tentang inflamasi dan jalur yang mendasarinya telah meningkat secara dramatis. Hati memiliki anatomi unik yang terhubung dengan intestinal oleh vena portal dan saluran empedu yang memungkinkan pengiriman produk dari mikroflora intestinal langsung ke hati.²⁷

Arsitektur ini mensyaratkan bahwa dalam kasus cedera hati atau kerusakan mukosa traktus intestinal, substansi toksik dengan aktivitas imunomodulator seperti lipopolisakarida dapat berpenetrasi ke hati, lalu mengaktivasi sel-sel yang responsif. Sel-sel Kupffer, populasi makrofag yang menetap di hati, dipertimbangkan sebagai responder pertama dan paling efisien terhadap perubahan integritas jaringan atau sinyal inflamasi yang berbahaya.^{28, 29}

Berbagai trigger eksogen ini, baik polanya terkait pathogen maupun *danger-associated molecular patterns* (PAMPs atau DAMPs) menginisiasi sekuens kejadian di sel-sel responsif (sel-sel Kupffer, sel-sel stellate, dan hepatosit) yang dikenali oleh *special pattern-recognition receptors* termasuk *tolllike receptors* (TLRs; gambar.2).^{30, 31}



Gambar 2. Sinyal TLR. LPS sebagai suatu sinyal PAMP prototipikal yang terikat di LBP dan dikenali oleh kompleks reseptor CD14/TLR4/ MD2 terikat membran. Sekali teraktivasi, kompleks reseptor ini menginisiasi suatu kaskade sinyal yang terdiri dari sejumlah besar protein-protein intraseluler (MyD88, IRAKs, TRAFs) menyebabkan terjadinya aktivasi jalur sinyal NF-κB dan induksi sitokin-sitokin inflamasi (misalnya: TNF-α, IL-1 alfa/beta, IL-6, IL-12, IL-18 dan GM-

CSF) yang menggerakkan respons inflamasi. Sinyal inflamasi ini secara prototipe dijumpai di makrofag. Keterangan: CD14 = *Cluster of differentiation 14*; GM-CSF = *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*; IRAK1/2/4 = *IL-1 receptor-associated kinase 1/2/4*; LBP = *LPS binding protein*; NF- κ B = *nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B-cells*; TRAF6 = *TNF receptor associated factor 6*. (Sumber: Weiskirchen R, Tacke F., 2016)

Mengikuti aktivasi, ekspresi atau sekresi sejumlah sitokin inflamasi dapat diinisiasi termasuk *tumor necrosis factor* (TNF)- α , interleukin (IL)-1 α/β , IL-6, IL-12, IL-18, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*, dan lainnya. Demikian juga, selama proses *insult* hepatik, *trigger* endogen dibebaskan dari sel-sel mati yang melekat (*inherent dying cells*), sebagian tergantung dari cara kematian sel (nekrosis, apoptosis, nekroptosis), memfasilitasi inflamasi.³²

Pada saat yang sama, sitokin-sitokin profibrogenik seperti *transforming growth factor* (TGF)-beta 1, *platelet-derived growth factor* (PDGF), *endothelial growth factor* (EGF), dan banyak yang lainnya dilepaskan oleh sel-sel hati parenkim dan non-parenkim. Faktor-faktor terlarut (*soluble*) ini memulai program yang dikontrol ketat, di mana *hepatic stellate cells* (HSC) mengalami perubahan fenotip secara bertahap. Dimulai dari non-proliferasi, tipe sel retinoid-storing, menjadi suatu fenotip tanpa retinoid dan lemak dengan proliferasi.³³ Fenotipe seluler yang dihasilkan dari transdiferensiasi ini adalah *myofibroblast* (MFB) yang semakin mengekspresikan aktin otot polos-alfa dan menghasilkan sejumlah besar komponen ECM seperti kolagen yang merupakan ciri khas (*hallmark*) fibrosis. MFB tidak hanya menghasilkan hampir semua komponen ECM tetapi juga mensintesis berbagai sitokin dan kemokin. Selanjutnya, memperoleh kontraktilitas sebagai respons terhadap ligan seperti endothelin dan oksida nitrat. Selain HSC/MFB, fibroblas portal dan sel-sel epitel saluran empedu dapat berpartisipasi dalam proses fibrogenesis meskipun kontribusinya tidak dinilai secara ketat dan tidak terlalu penting.^{34,35}

Sel-sel T CD4⁺ dengan polarisasi Th2 juga menyebabkan terjadinya fibrogenesis. Sel-sel ini mensekresikan IL-4 dan IL-13, yang dapat menstimulasi diferensiasi sel-sel mieloid fibrogenik dan makrofag.³⁶ Sel-sel Th17, yang diinduksi oleh TGF- β 1 dan IL-6, mensekresikan IL-17A, lalu mengaktivasi

miofibroblas secara langsung dan tidak langsung dengan menstimulasi pembebasan TGF- β 1 melalui sel-sel inflamasi.³⁷ Sel-sel T regulatori dapat baik mendorong atau menghambat fibrogenesis dengan mensekresi TGF- β 1 (profibrotik) atau IL-10 (antifibrotik). Sel-sel Th1 CD4⁺ memiliki efek antifibrotik.³⁸ Sel-sel NK dapat mereduksi fibrosis dengan melenyapkan HSCs yang teraktivasi dan melalui produksi interferon gamma.³⁹ Monosit berperan penting di dalam proses inflamasi dan fibrosis. Mereka merupakan prekursor fibrosit, makrofag, dan sel-sel dendritik.⁴⁰ Makrofag bersifat fibrogenik selama proses (*progression*) fibrosis dan fibrolitik selama proses *reversal*.³⁸

2.4. Konsep Mekanistik Fibrosis Hati

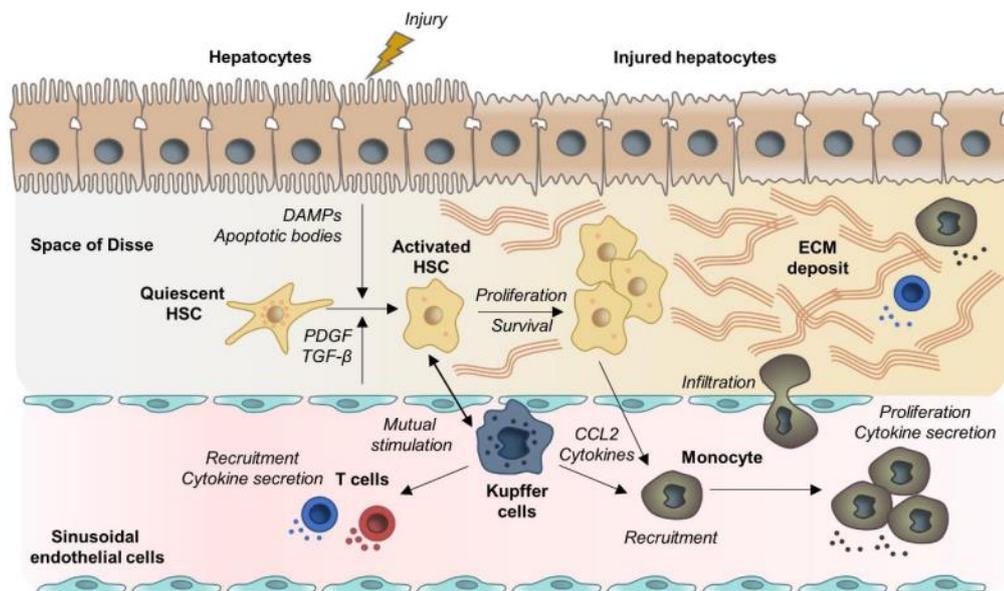
Liver fibrosis ditandai dengan akumulasi progresif *extracellular matrix* (ECM), yang merusak arsitektur fisiologis hati.⁴¹ Berbagai penyakit akibat virus, metabolik, toksik, patogen menyebabkan kerusakan hepatosit dan infiltrasi sel-sel imun yang mengaktivasi trans-diferensiasi *hepatic stellate cells* (HSCs) menjadi miofibroblas penghasil kolagen.⁴²

Secara fisiologis terlibat dalam perbaikan jaringan, pada cedera jangka pendek proses ini diimbangi dengan melawan mekanisme antifibrotik yang mengakibatkan inaktivasi atau apoptosis miofibroblas dan resolusi *scar*. Sebaliknya, pada penyakit hati kronis ketidakseimbangan mekanisme profibrogenik dan anti-fibrogenik menyebabkan aktivasi persisten dari proses proliferasi, kontraktile, dan migrasi miofibroblas yang menyebabkan berlimpahnya produksi ECM.⁴³ Nasib hati untuk lolos ke tahapan anti-fibrotik *scar-dissolving* atau untuk melanjutkan ke tahap pemicu fibrosis tanpa hambatan ini diatur oleh *non-parenchymal cells* (NPC), termasuk sel-sel Kupffer dan sel-sel imun lainnya.
44-46

Dengan demikian, apoptosis hepatosit dan pelepasan *damage-associated patterns* (DAMPs) oleh hepatosit tidak hanya mengaktivasi HSC secara langsung tetapi juga menginduksi perekrutan dan aktivasi limfosit serta makrofag yang berkontribusi terhadap proses promosi transdiferensiasi HSC dan aktivasi miofibroblas dengan menghasilkan pro-inflamasi dan pro sitokin-sitokin

fibrogenik.^{47,48} Subpopulasi makrofag yang berbeda di sisi lain berpartisipasi dalam resolusi fibrosis karena ekspresi *matrix-metalloproteinases* (MMPs).^{49, 50}

Pada basis molekuler, jaringan kompleks jalur sinyal yang diinduksi sitokin mengatur interaksi sel pro-fibrogenik. Faktanya, *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), dan jalur inflammasome (NLRP3)-Caspase1, serta sinyal WNT/beta-katenin telah disarankan untuk menjadi jalur utama terkait aktivasi HSC dan perkembangan fibrosis.⁵¹⁻⁵³ Interaksi sel independen dan etiologi perkembangan fibrosis digambarkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Konsep mekanistik fibrosis hati. Cedera hepatosit kronis menyebabkan pelepasan *damage-associated patterns* (DAMPs) dan badan apoptosis yang mengaktivasi *Hepatic stellate cells* (HSC) dan merekrut sel-sel imun. Interaksi multidireksional kompleks antara HSC yang teraktivasi dan sel-sel Kupffer, serta sel-sel imun bawaan (*innate*) mendorong transdiferensiasi menjadi proliferasi dan *extracellular matrix* (ECM) yang menghasilkan miofibroblas. Keterangan: PDGF: *Platelet Derived Growth Factor*; TGF- β : *Transforming Growth Factor Beta*; CCL2: *chemokine* (C-C motif) *ligand 2*. (Sumber: Roehlen N, dkk, 2020)

Konsep mekanistik fibrosis hati menjelaskan tentang kematian sel hepatosit, apoptosis, aktivasi HSC, sel-sel progenitor miofibroblas, makrofag hati, limfosit, *gut dysbiosis*, dan jalur sinyal molekuler yang terlibat di fibrogenesis hati (sinyal PDGF, sinyal TGF-beta), stres oksidatif, jalur *inflammasome* (NLRP3)-Caspase1, dan sinyal Wnt/beta-Catenin.⁵⁴

2.5. Peran Mesenchymal stem cells (MSC) pada Cedera Hati

(Liver Injury)

Terapi regeneratif yang melibatkan penggunaan MSC merupakan pendekatan terapeutik yang futuristik dan menjanjikan untuk tatalaksana cedera hati, memodulasi respons imun terhadap cedera, dan meningkatkan perbaikan dan regenerasi epitel hati. MSC adalah sel dengan kemampuan diferensiasi yang pertama kali diisolasi dari sumsum tulang tetapi dapat diturunkan dari sel perivaskular dari sejumlah jaringan, termasuk hati.⁵⁵ MSCs beraksi di tiga tahapan mayor dari respons imun: rekognisi dan presentasi antigen; aktivasi sel T, proliferasi, diferensiasi; stadium efektor sel-T.⁵⁶

MSC hati memanjang dan berbentuk gelendong (*spindle*), dan mengekspresikan penanda sel induk (*stem cell markers*), seperti vimentin dan *marker* MSC seperti CD90, namun bukan *marker stem cells* hematopoietik, seperti CD45, atau *marker* sel-sel progenitor hati lainnya seperti CK19. MSC dari organ selain hati seperti sumsum tulang juga dapat bersirkulasi ke hati bila terdapat cedera (*injury*).⁵⁷

MSC memiliki beberapa karakteristik yang berkontribusi pada sifat reparatif dan regeneratifnya.⁵⁸ Pertama, MSC memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi multilineage menjadi berbagai jenis atau tipe sel yang berbeda. Selanjutnya, MSC memiliki kemampuan migrasi dan homing yang memungkinkan sequestrasi ke area cedera (*injury*).⁵⁹ Kapasitas mereka untuk diapadesis melintasi endotelium dimungkinkan oleh ekspresi permukaan sel dari reseptor kemokin, antigen adhesi yang memastikan pengikatan sel ke dinding endotelium, serta ekspresi dan pelepasan subsekuen dari matriks metaloprotease (MMP) dan enzim proteolitik lainnya.⁶⁰ Selanjutnya, melalui pelepasan sitokin dan faktor anti-inflamasi, MSC memiliki efek imunomodulator baik di sistem imun bawaan (*innate*) maupun adaptif.⁶¹ Apalagi MSC mampu melepaskan protein dan vesikel ekstraseluler (EV) yang telah terbukti secara langsung memodulasi cedera hati di berbagai model yang berbeda.⁶²

MSC yang diambil dari berbagai lokasi anatomi, termasuk sumsum tulang, jaringan adiposa, *Wharton's jelly* dari tali pusat, menampilkan profil imunofenotipik yang serupa.⁶³ Namun, ada banyak bukti yang menunjukkan bahwa, meskipun memiliki kesamaan dalam imunofenotipe mereka, MSCs mengeluarkan satu set kompleks dari beberapa molekul aktif biologis terlarut, sekretom, komposisi yang bervariasi secara signifikan, tergantung pada usia inang dan relung di mana sel berada. Sekretom dari MSC yang berada di liver atau MSC yang direkrut ke liver dapat berefek fungsional.⁶⁴ Terlepas dari khasiatnya yang bermanfaat, ada beberapa batasan dalam penggunaan MSC sebagai terapi seluler.⁶⁵ Ini termasuk potensi diferensiasi menyimpang, pembentukan tumor dan *engraftment* rendah.⁶⁶ Perhatian yang mendasari potensi pembentukan tumor atau diferensiasi menjadi jenis sel yang tidak diinginkan telah menghambat adopsi dan penggunaan pendekatan terapeutik berbasis MSC, meskipun risiko ini tetap tidak berdasar.⁶⁷ Waktu paruh MSC yang ditransplantasikan mungkin tidak memadai untuk regenerasi jaringan dengan diferensiasi MSC.⁶⁸

MSC alogenik yang dikirim secara sistemik cenderung terakumulasi di paru-paru dalam 24 jam pertama transplantasi; mereka yang lolos dari jeratan oleh paru-paru berada di dalam hati dan limpa.⁶⁹ Eliminasi oleh sel imun adaptif dan hilangnya status imunitas istimewa keduanya dapat berkontribusi pada pendeknya waktu paruh dari MSC yang ditransplantasikan.⁷⁰ MSC alogenik yang terukir dalam organ target dapat kehilangan status imunitas istimewa karena ekspresi permukaan kompleks histokompatibilitas mayor kelas II serta CD86, dan dihilangkan dari tubuh karena pembentukan antibodi MSC anti-donor. Selanjutnya, MSC alogenik dapat dihilangkan oleh limfosit T sitotoksik CD8+, sedangkan MSC autologous atau alogenik yang ditransplantasikan dapat dihilangkan oleh sel *natural killer* (NK).⁷¹

2.6. Secretome MSC

Keterbatasan waktu paruh dari sel yang ditransplantasikan dan potensi tumorigenik serta risiko MSC lainnya telah mendorong perkembangan terapi aseluler.⁷² Sementara MSC memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi dan

dengan demikian dapat berkontribusi pada penggantian epitel hepatik, banyak efek MSC yang diamati lainnya terkait dengan efek parakrin yang terjadi sebagai hasil dari faktor-faktor yang disekresikan atau dilepaskan dari sel. Memang, potensi terapeutik dari MSC pada cedera hati dapat digunakan terutama melalui mekanisme parakrin yang melibatkan pelepasan protein terlarut atau EV (*Extracellular Vesicles*), yang merupakan sekretom MSC.⁷³

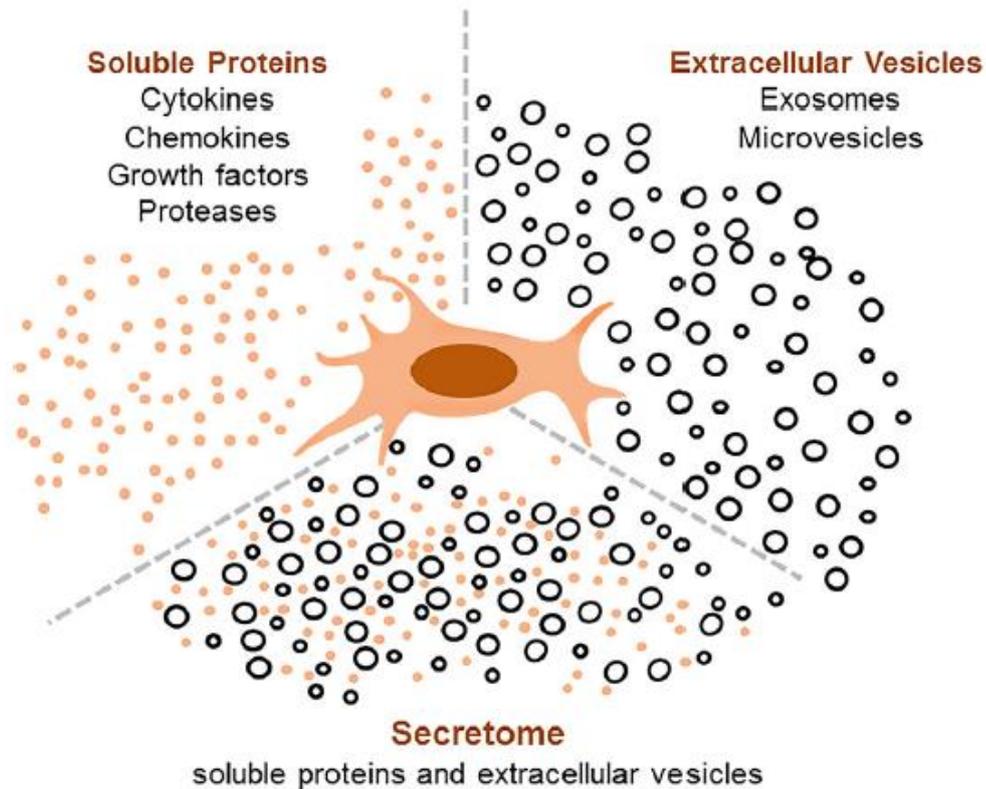
Penggunaan sekretom MSC sebagai agen terapeutik merupakan pilihan menarik yang dapat menghindari beberapa keterbatasan pendekatan berbasis sel. Sekretom MSC dapat digunakan sebagai terapi regeneratif dan reparatif aseluler untuk cedera dan penyakit hati. Ada pengakuan yang berkembang tentang kemampuan sekretom MSC untuk memodulasi lingkungan mikro imun lokal, mengurangi cedera dan untuk meningkatkan perbaikan epitel. MSC yang tidak berdiferensiasi kekurangan ekspresi molekul ko-stimulasi yang diperlukan untuk mengaktifkan sel T. Oleh karena itu, efek parakrin yang dimediasi sekretom berkontribusi penting pada efek MSC yang diamati pada modulasi sel-sel imun.⁷⁴

Konstituen utama sekretom MSC mencakup beragam protein larut dan EV (Gambar 4). Media terkondisi (CM) yang diperoleh dari MSC dalam kultur terdiri dari kombinasi EV dan protein. Efek eksperimental yang diamati dengan penggunaan CM dapat dihasilkan dari salah satu atau kedua konstituen ini. Namun, beberapa penelitian juga melaporkan efek EV yang telah diisolasi dan dipisahkan dari *secretome*.⁷⁵

Efek menguntungkan secara terapeutik menggunakan CM atau preparat EV terpisah yang berasal dari rentang MSC dari promosi perbaikan hingga perbaikan cedera. Dalam banyak penelitian, EV telah diisolasi dari supernatan kultur sel atau CM menggunakan pendekatan berbasis sentrifugasi klasik.⁷⁶

Meskipun sebagian besar penelitian belum secara langsung mengevaluasi keberadaan protein yang disekresikan dalam sediaan EV, pendekatan isolasi diharapkan dapat menghilangkan atau secara signifikan mengencerkan kandungan protein yang disekresikan. Penggunaan pemisahan EV berbasis resin dapat menghasilkan kandungan protein yang disekresikan

lebih tinggi yang perlu dipertimbangkan saat menafsirkan hasil penelitian menggunakan EV yang diisolasi menggunakan pendekatan ini.^{52, 69}



Gambar 4. Sekilas tentang *secretome* MSC. Sekretom terdiri dari protein larut (*soluble proteins*) dan vesikel ekstraseluler yang disekresikan. Protein tersebut termasuk faktor-faktor biologis aktif berupa sitokin (misalnya, interleukin 10, dan *tumor necrosis factor*-alfa), kemokin (misalnya, eotaxin-3), dan berbagai faktor pertumbuhan (misalnya, *hepatocyte growth factor* dan *transforming growth factor-beta isoform 3*). Faktor-faktor vesikuler termasuk eksosom dan mikrovesikel. (Sumber: Driscoll J, Patel T, 2019)

2.7. Efek Fungsional Secretome MSC

Sifat reparatif atau regeneratif dari sekretom MSC dapat berkontribusi terhadap modulasi imun, perbaikan cedera, atau pengurangan fibrosis. Protein larut seperti sitokin dan kemokin yang dilepaskan oleh MSC dapat berkontribusi terhadap beberapa respons patofisiologis yang berbeda.⁷⁷ Hal ini mencakup efek-efek imunomodulator karena efek langsung atau tidak langsung dari beberapa sel imun atau responsnya terhadap cedera sel atau jaringan. Faktor-faktor pertumbuhan (*growth factors*) dan sitokin dalam

sekretom seperti transforming growth factor beta isoform 3 (TGF-beta 3), *hepatocyte growth factor* (HGF), IL-10, dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF-alfa) dapat memodulasi proses dan sinyal sel yang terlibat dalam fibrogenesis dan dapat melemahkan fibrosis hati.⁷⁸ Selain itu, efek-efek parakrin MSC yang diamati juga dapat dihasilkan dari EV yang dilepaskan dari sel-sel ini. EV ini terdiri dari kelompok vesikel yang sangat heterogen serta bervariasi dalam ukuran, biogenesis, dan isinya. EV yang berasal dari MSC dapat mengekspresikan marker permukaan MSC yang mampu memodulasi respon imun, sebagaimana tetraspannin spesifik, seperti CD63 dan CD81.⁷⁹ EV ini terdiri dari *lipid bilayers* yang membungkus kargo yang terdiri dari: lipid, protein, molekul DNA dan RNA.⁸⁰ Memang, EV yang berasal dari MSC dapat diperkaya secara selektif dengan protein-protein antifibrotik dan antiapoptosis atau dengan non-coding RNA yang spesifik.⁸¹ Kemampuan untuk merekayasa produksi dan konten EV menawarkan peluang lebih lanjut untuk pengiriman konten spesifik yang ditargetkan untuk aplikasi terapeutik.^{82, 83}

2.8. Keunggulan Terapi Sekretom

Riset biologi molekuler terbaru membuktikan keberadaan regulasi biologis yang melibatkan komunikasi antarsel melalui zat yang disekresikannya, yakni sekretom. Sekretom adalah sekumpulan atau himpunan faktor-faktor atau molekul yang disekresikan ke ruang ekstraseluler. Faktor-faktor tersebut antara lain: protein terlarut (soluble proteins), asam nukleat bebas, vesikel-vesikel ekstraseluler dan lipid. Vesikel-vesikel ekstraseluler dapat dibagi lagi menjadi apoptotic bodies, mikropartikel, dan exosomes.⁸⁴

Sekretom sel-sel dan jaringan individu bersifat spesifik. Perubahan terjadi sebagai respons terhadap fluktuasi keadaan fisiologis atau kondisi patologis. Penggunaan terapi bebas sel seperti sekretom yang bersumber MSC dalam pengobatan regeneratif menyediakan keunggulan utama dibandingkan aplikasi berbasis *stem cells*: (a) penerapan *secretome* dapat mengatasi beberapa masalah pertimbangan keamanan terkait transplantasi sel proliferasi dan sel hidup, populasi termasuk kompatibilitas imun, tumorigenitas, pembentukan emboli dan transmisi infeksi; (b) Sekretom yang bersumber dari

MSC dapat dievaluasi keamanan, dosis dan potensi dengan cara analog dengan bahan farmasi konvensional; (c) penyimpanan dapat dilakukan tanpa aplikasi agen kriopreservatif yang berpotensi toksik dalam waktu lama tanpa kehilangan potensi produk; (d) menggunakan sekretom yang bersumber dari MSC, seperti media terkondisi (conditioned medium, CM), lebih ekonomis dan lebih praktis untuk aplikasi klinis karena menghindari prosedur pengumpulan sel invasif; (e) produksi massal dimungkinkan melalui jalur sel yang dibuat khusus di bawah kondisi laboratorium yang terkontrol, menyediakan beragam sumber faktor bioaktif yang relevan; (f) waktu dan biaya perluasan dan pemeliharaan kultur sel punca dapat dikurangi secara drastis dan terapi sekretom "siap pakai" dapat segera dilakukan dan tersedia untuk pengobatan kondisi akut seperti iskemia serebral, infark miokard, atau trauma di kalangan militer; (g) Produk biologis yang diperoleh untuk aplikasi terapeutik dapat dimodifikasi ke efek spesifik sel yang diinginkan.⁸⁵⁻⁸⁸

2.9. Riset tentang MSC

Berikut ini diuraikan singkat berbagai terapi cedera hati menggunakan MSC dalam tabel 1.

Sumber	Jalur Pemberian	Model Cedera	Efek	Mekanisme	Referensi
Hati manusia	Injeksi IP MSC-CM saat terjadi cedera	Hepatektomi parsial	Peningkatan proliferasi hepatosit	Upregulasi TNF-alfa, HGF, TGF-beta, IL-1RA, IL-10	63
<i>Umbilical cord</i>	Injeksi IP <i>secretome</i> MSC mirip hepatosit atau tidak terdiferensia	Fibrosis hati yang diinduksi CCl4 dan TAA	Berkurangnya sejumlah HSC alfa-SMA+ yang teraktivasi; berkurangnya	Penurunan sinyal TGF-beta	81

	si		deposisi kolagen		
Sumsum tulang manusia	Injeksi CM- MSC IV	Kegagalan hati <i>D-Gal-induced</i>	Penurunan apoptosis hepatosit dan berkurangnya kadar serum AST dan ALT	Peningkatan serum IL-10 yang bersirkulasi; infiltrasi TNF-alfa, IL-6, IL-1ra, dan leukosit CD45+ yang attenuated.	89
Sumsum tulang <i>murine</i>	Injeksi CM- MSC	Gagal hati akut yang diinduksi alfa-GalCer	Berkurangnya kadar serum AST dan ALT, perluasan infiltrasi sel T CD4+ CD25+ dan berkurangnya hepatotoksitas dimediasi sel NKT	Proliferasi sel Teff tersupresi	90

<i>Human umbilical cord</i>	CM-MSC	Cedera hepatosit yang diinduksi H ₂ O ₂ secara <i>in vitro</i>	Peningkatan viabilitas hepatosit	Modulasi ekspresi Bax dan Bcl-2	91
<i>Murine compact bone</i>	Injeksi CM- MSC IV	Fibrosis hati kronis yang diinduksi CCl ₄ dan gagal hati akut yang diinduksi TAA.	Berkurangnya deposisi kolagen dan sel-sel alfa-SMA+, menginduksi apoptosis dari HSC teraktivasi di hati mencit yang cedera akibat CCl ₄ , menurunkan apoptosis hepatosit, meningkatkan proliferasi sel.	Berkurangnya infiltrasi leukosit hepatic, turunya makrofag CD11b+F4/80+ dan Th-17, menginduksi ekspansi Tregs CD4+ CD25+ yang berasal dari limpa di mencit cedera akibat CCl ₄	92
Jaringan adiposa manusia	CM-MSC (normoksia atau prekondisi hipoksia)	Tidak ada	Peningkatan viabilitas hepatosit (H-CM) yang dipertinggi oleh glikogen dan uptake ICG oleh		93

			Hepatosit		
<i>Human umbilical cord</i>	MSC Ko-kultur	Hepatosit murin yang cedera akibat CCl4	Peningkatan viabilitas hepatosit, peningkatan produksi albumin, peningkatan jumlah proliferasi hepatosit.		94
Jaringan adiposa manusia	Injeksi IV ASC-CM (<i>Untreated dan LPS-primed</i>)	Hepatektomi parsial	Peningkatan jumlah sel-sel yang berproliferasi, akselerasi regenerasi hati, berkurangnya kadar serum transaminase.	Penurunan kadar serum TNF-alfa dan IL-6; peningkatan ekspresi p-STAT3 dan PCNA hepatic.	95

Tabel 1. Riset MSC pada Cedera Hati (*Liver Injury*)

Keterangan: a-GalCer galactosylceramine, a-SMA alpha-smooth muscle actin, ALT alanine aminotransferase, AR adrenergic receptor, AST aspartate aminotransferase, BAX Bcl2-associated X protein, Bcl-2 B cell lymphoma 2, BMF Bcl2 modifying protein, CCl4 carbon tetrachloride, CM conditioned media, D-galD-galactosamine, EV extracellular vesicles, Ex exosomes, H hypoxia, H2O2 hydrogen peroxide, HB-EGF heparin binding EGF-like growth factor, hBM-MSC human bone marrow-derived MSC, HGF hepatocyte growth factor, hpucMSC hepatocyte-like umbilical cord-derived MSC, HSC hepatic stellate cells, hucMSC human umbilical cord-derived MSC, ICG indocyanine green, IDO indolamine 2,3 dioxygenase, IL interleukin, IP intraperitoneal, IV intravenous, LPS lipopolysaccharide, N normoxia, NKT natural killer T cells, OSM oncostatin M, PCNA proliferating cell nuclear antigen, p-STAT3 phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3, ROS reactive oxygen species, SCF stem cell factor, SITR1 siturin 1, SMAD mothers against decapentaplegic homolog, SOCS3 suppressor of cytokine signaling, TAA thioacetamide, Teff effector T cells, TGF- β transforming growth factor beta, TGFRB1 transforming growth factor beta receptor 1, Th T-helper cell, TIMP tissue inhibitor of metalloproteinases, TNF- α tumor necrosis factor-alpha, Tregs regulatory T cells, ucMSC umbilical cord-derived MSC.

Jelaslah dari tabel 1 di atas, belum ada riset tentang sekretom MSC sebagai terapi fibrosis hati. Oleh karena itu, tingkat kebaruan (*novelty*), disertasi ini amat tinggi.