

RESEARCH ARTICLE

Efek Parakrin Sel Punca Mesenkimal pada Kultur In-Vitro

Christine Verawaty Sibuea¹, Ervina Julien Sitanggang², Ade Pryta Simaremare³

¹Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan

²Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan

³Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan

Korespondensi: Christine Verawaty Sibuea, Email: christine.sibuea@yahoo.com

Abstract

Background: MSC, IL-10, TNF- α , IFN- γ , PGE2. Background: The high proliferation and differentiation capabilities, paracrine effects and immunomodulatory functions of Mesencymal Stem Cells (MSCs) have been utilized in cellular therapy approaches for infectious and degenerative diseases in the last decade. Paracrine effects MSCs contain growth factors and cytokines, including IL-10, TNF- α , IFN- γ and PGE2. There are still debates regarding the role and performance of the levels of paracrine effects of MSCs IL-10, TNF- α , IFN- γ and PGE2, so it is necessary to have a model of the performance of these paracrine effects.

Objective: To determine the levels of IL-10, TNF- α , IFN- γ and PGE2 in basal in-vitro culture conditions, which can be used as a model for MSC immunomodulatory performance.

Methods: This research is an in-vitro culture study of MSCs in basal conditions. MSCs were cultured for 21 days and levels of IL-10, TNF- α , IFN- γ and PGE2 were examined on the 7th, 14th and 21st days in the culture medium, using the ELISA method.

Results: IL-20 was not found in the culture medium until the 21st day, meanwhile TNF- α levels continued to increase until the 21st day. IFN- γ was only found on day 7 of culture. PGE2 levels were found to be the highest secreted among the cytokines analyzed, but were not found on day 21.

Conclusion: Paracrine effects secreted by MSCs in basal culture conditions due as a response to cell damage that occurs during the duration of culture. The paracrine effects of MSCs can influence each other, so that there can be suppression or induction of secretion of paracrine effects.

Keywords: MSC, IL-10, TNF- α , IFN- γ , PGE2.

Abstrak

Latar belakang: Kemampuan proliferasi dan diferensiasi yang tinggi, efek parakrin serta fungsi imunomodulator *Mesencymal Stem Cells* (MSCs) dimanfaatkan dalam pendekatan terapi seluler penyakit infeksi dan degeneratif dalam dekade terakhir. Efek parakrin MSCs mengandung *growth factor* dan sitokin, diantaranya IL-10, TNF- α , IFN- γ dan PGE2. Banyak perbedaan pendapat tentang peran dan gambaran kadar efek parakrin MSCs IL-10, TNF- α , IFN- γ dan PGE2 sehingga diperlukan adanya model gambaran efek parakrin tersebut.

Tujuan: Mengetahui kadar IL-10, TNF- α , PGE2 dan IFN- γ pada kondisi basal kultur in-vitro, yang dapat digunakan sebagai model gambaran imunomodulator MSC.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian kultur in-vitro MSCs pada kondisi basal. MSCs dikultur selama 21 hari dan dilakukan pemeriksaan kadar IL-10, TNF- α , PGE2 dan IFN- γ pada hari ke-7, ke-14 dan ke-21 pada medium kultur, dengan menggunakan metode ELISA.

Hasil: IL-20 tidak ditemukan pada medium kultur hingga hari ke-21, sedangkan kadar TNF- α semakin meningkat hingga hari ke-21. IFN- γ hanya ditemukan pada kultur hari ke-7. Kadar PGE2 ditemukan paling tinggi disekresikan diantara sitokin yang dianalisa, tetapi tidak ditemukan pada hari ke-21.

Kesimpulan: Efek parakrin disekresikan MSC pada kultur kondisi basal sebagai respon kerusakan sel yang terjadi selama durasi kultur. Efek parakrin MSC dapat saling mempengaruhi, sehingga dapat terjadi supresi atau induksi sekresi efek parakrin.

Kata Kunci: MSC, IL-10, TNF- α , IFN- γ , PGE2.

Pendahuluan

MSCs dikenal dengan kemampuan diferensiasi dan plastisitas yang tinggi, selain itu perannya dalam imunomodulasi tubuh juga sangat penting. MSCs dapat mensekresikan efek parakrin ketika senyawa sinyal dilepaskan dari sel.⁽¹⁾ MSCs berinteraksi dengan sel Treg dan monosit, dan memodulasi respon imun. Hal ini menyebabkan MSCs berperan dalam imunitas innate dan adaptif. Fungsi imunomodulasi MSCs terjadi melalui interaksi antar sel maupun efek parakrin MSCs yang melibatkan sel T, sel B, sel NK, makrofag, sel dendritik dan neutrofil.⁽²⁾

Efek parakrin MSCs mensekresikan banyak *growth factor* dan sitokin. Sekretom ini mengandung IL-10, TNF- α , TGF- β , IFN- γ dan PGE2. Sitokin yang dihasilkan MSCs mempengaruhi sel T, sel B, sel NK, makrofag, sel dendritik dan neutrofil. MSCs menghambat diferensiasi sel Th dengan menginduksi sekresi IL-10 dan PGE2, dan mensupresi IL-17 dan IFN- γ .⁽³⁾ MSCs menstimulus fungsi Treg dan Th2, menghambat sekresi IFN- γ melalui Th1 dan mensekresikan PGE2 untuk meregulasi Th. MSCs menghambat aktivasi sel B dan mengakibatkan transformasi sel B menjadi Breg yang menghasilkan IL-10.⁽²⁾ MSCs menginduksi produksi sitokin lainnya melalui sekresi PGE2. TNF- α dan IFN- γ mengaktifkan makrofag dan menstimulus sekresi oksidan seperti nitrit oxide dan superoxide yang akan membunuh bakteri.^(3, 4) PGE2 yang disekresikan MSCs menghambat sel dendritik yang menyebabkan penurunan IL-12. Sekresi kemokine MSCs berupa mediator inflamasi dapat menarik sel imun innate ke tempat cedera jaringan. Sekresi nitric oxide MSCs menstimulus sel Treg yang kemudian akan mensekresikan IL-10, untuk mengatasi inflamasi dan mengurangi sel natural killer T (NKT). IL-6 yang disekresi MSCs dapat mencegah diferensiasi monosit yang memproduksi IL-10. Sitokin dan mediator inflamasi tersebut menyebabkan MSCs sangat penting perannya dalam imunomodulator, sehingga sering digunakan sebagai terapi seluler untuk mengatasi penyakit infeksi maupun penyakit degeneratif.⁽²⁾

Peran imunomodulator dari efek parakrin MSCs masih sering diperdebatkan dan mekanismenya masih belum jelas. Beberapa penelitian menganggap PGE2 memiliki peran penting dalam regulasi respon imun MSCs pada saat proses inflamasi terjadi. Penelitian lainnya menganggap TNF- α , IL-10 dan IFN- γ berperan dalam respon awal inflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar IL-10, TNF- α , PGE2 dan IFN- γ pada kondisi basal kultur in-vitro, yang dapat digunakan sebagai model gambaran imunomodulator MSCs.

Metode

Penelitian ini dilakukan di *Stem Cells Technology Engineering (SCTE)* IMERI FK UI dengan kaji etik KET-732/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2022.

Kultur MSCs

MSCs diperoleh dari kriopreservasi MSCs penelitian sebelumnya, dengan menggunakan metode isolasi yang dikembangkan Pawitan et al^(5, 6). Kriopreservasi dicairkan dan dikultur dalam medium kultur AlphaMEM yang disuplementasi dengan lisat konsentrat trombosit dan heparin. Analisa CD 105, CD90, dan CD73 dilakukan dengan menggunakan flowsitometri untuk menganalisa kemurnian MSCs berdasarkan kriteria *International Society Cell and Gene (ISCT)*. MSCs dikultur dalam inkubator CO2 hingga konfluens dan dilakukan subkultur hingga passage 3.

Analisa IL-10, TNF- α , IFN- γ dan PGE2 MSCs

Analisa sitokin IL-10, TNF- α , IFN- γ dan PGE2 dilakukan pada pengamatan hari ke-7, ke-14 dan ke-21. Medium kultur MSCs disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm dan dilakukan pengujian sitokin. IL-10 dianalisa dengan menggunakan Human IL-10 ELISA Kit (Quantikine) CAT: D1000D, analisa TNF- α dengan menggunakan Human TNF- α ELISA Kit (Quantikine) Cat: DTA00D, analisa IFN- γ dengan Human IFN- γ ELISA Kit (Quantikine) Cat: DIF50C dan analisa PGE2 dengan menggunakan Human prostaglandin E2 ELISA Kit (Quantikine) Cat: KGE004B. Semua prosedur analisa dilakukan sesuai dengan protokol produsen kit. Pembacaan kadar sitokin dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer.

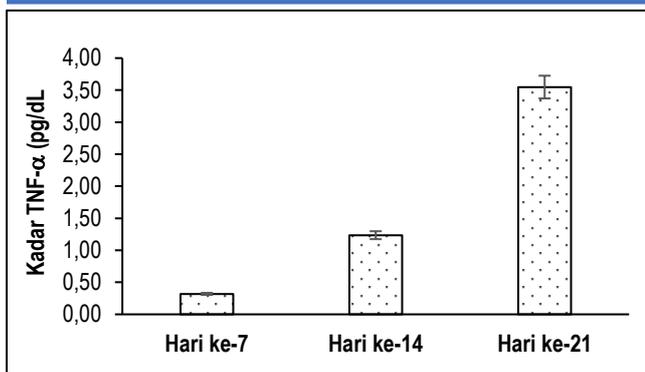
Hasil

Hasil analisa sitokin IL-10, TNF- α , IFN- γ dan PGE2 menunjukkan bahwa kadar PGE2 yang paling tinggi. IL-10 tidak ditemukan pada hari ke-7 hingga hari ke-21 (Tabel 1). Kadar TNF- α semakin meningkat dari hari ke-7 hingga hari ke-21 (Gambar 1).

Tabel 1. Kadar Sitokin (pg/mL)

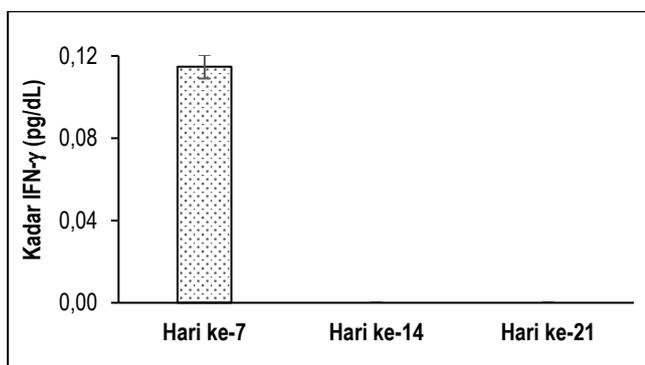
	Hari ke-7	Hari ke-14	Hari ke-21
IL-10	0	0	0
TNF-a	0,32	1,24	3,55
IFN-γ	0,11	0	0
PGE2	242,35	15,12	0

Kadar TNF- α semakin meningkat dari hari ke-7 hingga hari ke-21 (Tabel 1 dan Gambar 1).



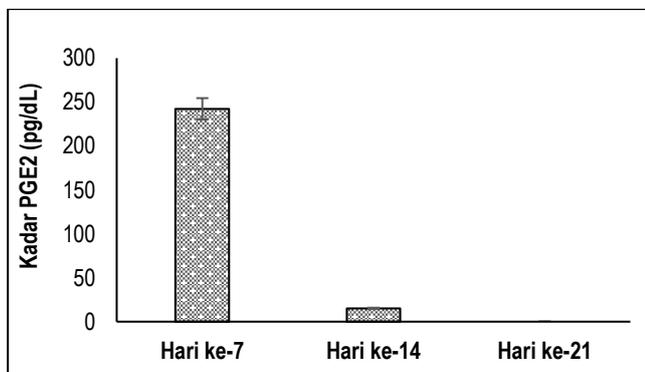
Gambar 1. Kadar TNF-α MSCs

Kadar IFN-γ rendah dan hanya ditemukan pada hari ke-7. IFN-γ tidak ditemukan dari hari ke-14 hingga hari ke-21 (Tabel 1 dan Gambar 2).



Gambar 2. Kadar IFN-γ MSCs

Kadar PGE2 tinggi dan semakin menurun hingga hari ke-14. PGE2 tidak ditemukan pada hari ke-21 (Tabel 1 dan Gambar 3).



Gambar 3. Kadar PGE2 MSCs

Pembahasan

IL-10 tidak ditemukan pada medium kultur MSCs. Hal ini dapat menunjukkan bahwa IL-10 tidak disekresikan selama durasi kultur. Kultur MSCs dilakukan pada kondisi basal, dimana tidak dilakukan stimulasi inflamasi. Kondisi inflamasi hanya berasal dari adanya kerusakan sel dan apoptosis yang terjadi selama durasi kultur. IL-10 merupakan mediator anti-inflamasi, dimana peningkatan sekresi terjadi akibat adanya jaringan atau sel yang rusak (7, 8). Kultur MSCs dalam kondisi basal, dapat menyebabkan sekresi minimal IL-10. Pada keadaan cedera jaringan in vivo, MSCs mentransformasi sel B menjadi Breg dan menghasilkan IL-10. Nitric oxide MSCs juga menstimulus sel Treg dan kemudian menskresikan IL-10.(2) Kultur basal MSCs in-vitro dengan adanya kerusakan sel dan apoptosis, tidak dapat menstimulus makrofag

dan sel Treg, sehingga produksi IL-10 tidak maksimal. Adanya sekresi sitokin lain seperti TNF-α juga dapat mensupresi sekresi minimal IL-10, sehingga IL-10 tidak ditemukan.

Penelitian ini menunjukkan bahwa TNF-α semakin meningkat selama durasi kultur hingga hari ke-21. MSCs juga mensekresikan parakrin lainnya, salah satunya adalah TNF-α. Parakrin ini dapat meregulasi sekresi IL-10. Kematian sel yang terjadi pada durasi kultur dapat menyebabkan sekresi minimal IL-10, dan hal ini menstimulasi sekresi TNF-α. Adanya peningkatan sekresi TNF-α oleh MSCs, dapat mensupresi sekresi IL-10, sehingga IL-10 tidak ditemukan hingga hari ke-21. Penelitian sebelumnya menunjukkan adanya penurunan kadar IL-10 pada peningkatan sekresi TNF-α (9).

Kadar IFN-γ rendah dan hanya ditemukan pada hari ke-7 pada penelitian ini. MSCs akan mensupresi IFN-γ dan mensekresikan PGE2 melalui stimulasi Treg dan Th2 sebagai respon sinyal inflamasi pada in-vivo.(3) Rendahnya kadar IFN-γ dapat disebabkan oleh karena kultur dilakukan pada kondisi basal, dimana cedera jaringan yang terjadi minimal. Tidak terjadinya stimulasi Treg, mengakibatkan IFN-γ masih disekresikan pada hari ke-7, tetapi tidak ditemukan sejak hari ke-14. MSCs menginduksi produksi sitokin lainnya melalui sekresi PGE2.(2) PGE2 yang disekresikan oleh MSCs dapat mempengaruhi kadar IFN-γ.

Kadar PGE2 cukup tinggi dibandingkan efek parakrin lainnya, tetapi semakin menurun dan tidak ditemukan pada hari ke-21. PGE2 disekresikan MSCs sebagai respon inflamasi dan cedera jaringan yang terjadi pada durasi kultur. MSCs menginduksi produksi sitokin lainnya melalui sekresi PGE2.(2) PGE2 yang disekresikan oleh MSCs dapat mempengaruhi kadar IFN-γ. PGE2 yang banyak disekresikan pada awal kultur dapat menginduksi IFN-γ, sehingga IFN-γ masih dapat ditemukan pada hari ke-7, walaupun rendah konsentrasinya. PGE2 dan IFN-γ menurun dan tidak ditemukan pada hari ke-21. Hal ini dapat menunjukkan bahwa PGE2 mempengaruhi sekresi IFN-γ. Penurunan kadar PGE2 dapat disebabkan karena stimulus terhadap Treg tidak terjadi, sehingga induksi terhadap sekresi PGE2 menurun.

Kesimpulan

Kadar PGE2 tinggi pada kultur in-vitro kondisi basal. Kedua PGE2 dan IFN-γ tidak ditemukan pada hari ke-21, dan IL-10 tidak ditemukan pada kultur in-vitro basal. Hal yang berbeda terjadi pada sekresi TNF-α, dimana TNF-α semakin meningkat hingga hari ke-21. Efek parakrin disekresikan MSCs sebagai respon kerusakan sel yang terjadi selama durasi kultur, walaupun dalam kondisi basal. Efek parakrin MSCs dapat saling mempengaruhi, sehingga dapat terjadi supresi atau induksi sekresi efek parakrin.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Kementerian Riset dan Pendidikan Tinggi, Simlitabmas 2022, kontrak no.048/LL1/LT/K/2022, 50/KP/LPPM/VI/2022.

Daftar Pustaka

1. Driscoll J, Patel T. The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease. *J Gastroenterol.* 2019;54(9):763-73.

2. Song N, Scholtemeijer M, Shah K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2020;41(9):653-64.
3. Zhang X, Xie Q, Ye Z, Li Y, Che Z, Huang M, et al. Mesenchymal Stem Cells and Tuberculosis: Clinical Challenges and Opportunities. *Front Immunol*. 2021;12:695278.
4. Zhang L, Dong ZF, Zhang JY. Immunomodulatory role of mesenchymal stem cells in Alzheimer's disease. *Life Sci*. 2020;246:117405.
5. Pawitan JA, Kispa T, Mediana D, Goei N, Fasha I, Liem IK, et al. Simple production method of umbilical cord derived mesenchymal stem cell using xeno-free materials for translational research. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2015;7(8):652-6.
6. Sibuea CV, Pawitan J, Antarianto R, Jasirwan COM, Sianipar IR, Luviah E, et al. 3D Co-Culture of Hepatocyte, a Hepatic Stellate Cell Line, and Stem Cells for Developing a Bioartificial Liver Prototype. *International Journal of Technology*. 2020;11(5).
7. Gao T, Huang F, Wang W, Xie Y, Wang B. Interleukin-10 genetically modified clinical-grade mesenchymal stromal cells markedly reinforced functional recovery after spinal cord injury via directing alternative activation of macrophages. *Cell Mol Biol Lett*. 2022;27(1):27.
8. Reyes-Martínez V, Londoño J, Ávila-Portillo LM, Rueda JC, Padilla-Ortiz DM, Salgado D, et al. Mesenchymal stromal cells represent a therapeutic option for systemic sclerosis patients. *Revista Colombiana de Reumatología (English Edition)*. 2020;27:126-34.
9. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, Kustiyah AR, Wirastuti K, Sadyah NAC, et al. The Role of TNF-alpha induced MSCs on Suppressive Inflammation by Increasing TGF-beta and IL-10. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018;6(10):1779-83.