



BIOTEKNOLOGI PADA MATURE HUMAN PLURIPOTENT STEM CELL KARDIOMIOSIT

Puspita Sari¹

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako¹

Email Corresponding:

Sari.puspt@gmail.com

Page : 43-48

Kata Kunci :

Stem cell, kardiomiosit, rekayasa genetika

Keywords:

Stem cell, cardiomyositis, genetic engineering

Article History:

Received: 5-4-2023

Revised: 11-4-2023

Accepted: 27-4-2023

Published by:

Tadulako University,

Managed by Faculty of Medicine.

Email: medikatadulako@gmail.com

Address:

Jalan Soekarno Hatta Km. 9. City of Palu, Central Sulawesi, Indonesia

ABSTRAK

Tidak seperti sel otot, sel darah, atau sel saraf—yang biasanya tidak bereplikasi—sel punca dapat bereplikasi berkali-kali. Sel induk memiliki potensi luar biasa untuk memperbaharui diri. Mereka dapat berkembang menjadi berbagai jenis sel dalam tubuh selama awal kehidupan dan pertumbuhan. Sel induk berpotensi majemuk memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi semua sel tubuh orang dewasa. Sel induk dewasa ditemukan dalam jaringan atau organ dan dapat berdiferensiasi untuk menghasilkan jenis sel khusus dari jaringan atau organ tersebut. Salah satu cara yang sering dilakukan untuk memperbaiki sel jantung adalah dengan penggantian sel melalui yang dibantu melalui rekayasa genetika dan pemberian biomaterial.

ABSTRACT

Unlike muscle cells, blood cells, or nerve cells—which don't usually replicate—stem cells can repeat many times. Stem cells have an extraordinary potential for self-renewal. They can develop into many types of cells in the body during early life and growth. Pluripotent stem cells can differentiate into all cells of the adult body. Adult stem cells are found in tissues or organs and can determine to produce a specific cell type from that tissue or organ. One way that is often done to repair heart cells is by replacing cells with the help of genetic engineering and the administration of biomaterials.

PENDAHULUAN

Berbagai penyakit manusia diakibatkan oleh kematian jenis sel tertentu, sebagai contoh diabetes tipe 1, yang merupakan hasil penghancuran sel beta di pankreas; penyakit parkinson yang terjadi akibat hilangnya neuron penghasil dopamin di otak; dan gagal jantung dapat mengakibatkan kematian sel otot jantung (kardiomiosit) pada jantung.¹ Berbagai pendekatan telah dilakukan untuk meregenerasi sel jantung yang mengalami *injury* atau

penuaan. Dapat melalui jalur intrinsik yaitu regenerasi atau pemrograman ulang sel dan jalur ekstrinsik melalui *microenvironments* yang tepat untuk meningkatkan kelangsungan hidup serta fungsi kardiomiosit. Salah satu cara yang sering dilakukan untuk memperbaiki sel jantung adalah dengan penggantian sel melalui yang dibantu melalui rekayasa genetika dan pemberian biomaterial. Sejauh ini, hampir semua sel yang mungkin dilakukan telah diselidiki pada hewan model yang berpotensi

untuk meregenerasi sel jantung.^{2,3} Dapat dibayangkan jika kita bisa mengisolasi sel-sel dari pasien, mengubahnya menjadi sel yang dibutuhkan oleh pasien tersebut dan kemudian menanamkan pada mereka (pasien) kembali untuk mengembalikan fungsi tubuh yang hilang.¹

Isolasi sel dari pasien dapat dilakukan melalui *adult stem cells*, *embryonic stem cells* dan *induced pluripotent stem cells*. Pada *adult stem cells* contohnya adalah *hematopoietic stem cells*. Sel induk didefinisikan sebagai sel yang tidak terdeferensiasi sehingga (1) mampu melakukan pembaharuan diri yaitu memproduksi lebih banyak sel seperti dirinya sendiri dan (2) multipoten yaitu mampu berdiferensiasi menjadi dua atau lebih sel *mature*. Kebanyakan organ dalam manusia dewasa, namun tidak semua mengandung sel punca yang mampu menggantikan sel tertentu dari jaringan yang ditemukan.¹ *Embryonic stem cells* (ES) berasal pengembangan blastosit (sel embrio manusia) bersifat pluripoten, yakni mampu berdiferensiasi menjadi semua tipe sel di dalam tubuh.^{3,4} Tujuan jangka panjang pada penelitian ES ini adalah bagaimana agar supaya sel ES dapat berdiferensiasi menjadi banyak jenis sel yang dapat digunakan untuk *replacement therapy*.¹ *Induced pluripotent stem cells* (iPS) juga memiliki karakteristik serupa dengan sel induk pluripoten di induksi manusia yang dihasilkan dari sel induk dewasa yang mengalami deferensiasi terminal. Sel dewasa melakukan *reprogramming* secara genetik melalui ekspresi dari faktor transkripsi.⁴

Kardiomyosit pada manusia dewasa bersifat postmitotik, sehingga memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi dari *human embryonic stem cells* (hESCs) dan *human induced pluripotent stem cells* (hiPSCs). Hal tersebut memberikan kesempatan untuk menciptakan model *in vitro human cardiac tissue* yang dapat dilakukan pada pasien dan

dapat bermanfaat pada skrening agen terapeutik baru.^{2,5}

Namun, sel yang terdiferensiasi menunjukkan tingkat pematangan yang rendah dan berbeda dengan sel pada manusia dewasa.^{2,4} Sel yang *immature* ini dapat membatasi penggunaan hPSC dan sangat dibutuhkan strategi pro-maturasi untuk perkembangan sel kardiomyosit dewasa manusia secara *in vitro*. Istilah maturasi merupakan perwakilan sifat multifase pada kardiomyosit dalam evaluasi tingkat ke maturasi disebabkan struktur dan fungsinya yang kompleks.^{4,6} Pada artikel tulisan ini, penulis mencoba memaparkan berbagai pendekatan bioteknologi pada proses maturasi kardiomyosit dengan *human pluripotent stem cell*.

Strategi Maturasi Induksi hPSC

Proses maturasi dalam menginduksi hPSC dilakukan dengan beberapa metode yaitu melalui: 1) manipulasi genetik (contohnya: adenovirus-dimediasi *overexpressing* pada Kir2); 2) modulasi microRNA; 3) tekanan mekanis; 4) stimulasi listrik; dan 5) kombinasi tekanan mekanis dan stimulasi listrik.

Pada review ini metode yang akan dijelaskan yaitu metode 1) tekanan mekanis; 2) stimulasi listrik; dan 3) kombinasi tekanan mekanis dan stimulasi listrik karena memiliki peran penting dalam pertumbuhan kardiomyosit dan telah dilakukan pengujian sebagai syarat pematangan untuk hPSC-CM.⁴

Tekanan Mekanis

Tekanan mekanis memiliki peran penting selama perkembangan struktur dan fungsi jantung.⁷ Stimulasi mekanis pada sel dapat dilakukan dengan menyesuaikan substrat (kaku/topografi) dalam memperbaiki sifat pematangan hPSC-CMs. Oleh karena itu, penting untuk mempertimbangkan adanya

sinyal mekanik yang dibutuhkan dalam pematangan hPSC-CM, baik itu dalam bentuk 2D atau 3D.⁴

Dalam sebuah penelitian Ruan *et al* menyebutkan bahwa respon stress statis pada rekayasa jaringan pada sel jantung menunjukkan peningkatan *alignment* sel, hipertrofi pada kardiomyosit, peningkatan kontraktilitas dan kekakuan pasif, peningkatan ekspresi protein yang berpengaruh terhadap Ca^{2+} dan juga terdapat peningkatan hubungan kekuatan-frekuensi pada *immature* kardiomyosit.⁸

Pengujian efek tekanan mekanik pada *immature* kardiomyosit lainnya dilakukan dengan cara menumbuhkan sel dalam kolagen/matriks matrigel, mentsransmisikannya ke dalam cetakan melingkar dan dilakukan setelah terjadi pepadatan jaringan. Jaringan jantung yang direkayasa mengalami peregangan siklik uniaksial (2 Hz, mengalami elongasi 10%). Setelah satu minggu, jaringan jantung yang direkayasa menunjukkan tanda penting dari *mature* miokardium yaitu dengan adanya otot yang bersatu dengan sarkomen dan memiliki hubungan positif antara kekuatan-frekuensi.^{4,7}

Penelitian Mihic *et al* menggunakan peregangan mekanis siklik untuk meningkatkan viabilitas dan pematangan fungsional konstruksi jaringan hPSC-CM sebelum diimplantasi ke dalam jaringan miokardium yang mengalami kerusakan. Konstruksi dibuat dengan menanam hESC-SM dalam 30 x 10 x 7 mm gelatin *sponges*. Setelah dua hari pepadatan, konstruksi jantung dikenai tiga hari peregangan siklik uniaksial (1,25 Hz, mengalami elongasi 12%). Dibandingkan dengan kontrol yang tidak diekstraksi, konstruksi jaringan jantung menunjukkan peningkatan jumlah sel, ukuran sel dan pemanjangan, peningkatan ekspresi *connexin-43*, dan ekspresi mRNA yang diregulasi MYH7, CACNA1C, HCN4, KCNH2, SCN5A, dan KCNJ2.⁹

Peregangan adalah metode utama yang digunakan untuk mengantarkan stimulasi mekanik untuk hPSC-CM dan umumnya dilakukan dengan menerapkan tekanan mekanik eksternal pada konstruk hPSC-CM secara statis (dicapai dengan meningkatkan peregangan) atau dinamis (dengan meniru stimulus siklik mekanis pada otot jantung).⁴

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bukti yang signifikan bahwa rangsangan mekanis merupakan salah satu syarat maturasi pada hPSC-CM. Namun, perlu dicatat bahwa kekuatan kontraktile diukur melalui rekayasa genetika pada jantung tersebut terkait dengan komposisi biomaterialnya (misalnya: kolagen dibanding dengan fibrin). Variabilitas pada material tersebut dapat mempengaruhi fenotip hPSC-CM yang menyebabkan variasi pembacaan pada kekuatan kontraktilitas.⁴

Stimulasi Listrik

Kontraksi kardiomyosit yang berirama dan serentak merupakan respon terhadap sinyal listrik. Perubahan dari sinyal listrik menjadi kontraksi (dikenal sebagai eksitasi-kontraksi) memerlukan aktivitas yang terkoordinasi dari beberapa saluran ion.¹⁰ Perubahan perkembangan pada saluran ion tersebut memiliki regulasi kompleks dan dapat merubah sifat kelistrikan pada kardiomyosit pada tahap fetus dan *post* natal dengan spesifik elektrofisiologi pada *mature* kardiomyosit. Pada hPSC-CM menunjukkan bahwa elektrofisiologis masih *immature*. Beberapa penelitian secara *in vitro* menunjukkan aktivitas kardiomyosit listrik yang terpapar secara *in vivo* mendorong maturasi hPSC-CM.¹⁰

Penggabungan antara kultur 3D dan stimulasi listrik yang digunakan untuk maturasi hPSC-CM disebut dengan "*biowire*".^{2,5} *Biowire* dihasilkan dengan cara membudidayakan hPSC-CM dalam hidrogel kolagen disekitar luka jahit beda untuk

membentuk jaringan jantung berdiameter ~600 μm . Setelah itu, *biowire* diberikan stimulasi listrik selama tujuh hari (3V/cm, denyut 1ms, dimulai dari 1 Hz meningkat bertahap menjadi 3 atau 6 Hz). Akhirnya, hPSC-CM menunjukkan sifat yang sesuai dengan maturasi kardiomyosit, seperti peningkatan sel dan keselarasan miofibril, peningkatan ikatan sarkomer, luas daerah kardiomyosit yang lebih besar dan tingkat proliferasi yang lebih rendah dibandingkan dengan bentuk embrio pada usia yang sama.⁴

Penelitian lain menunjukkan bahwa hESC-CM yang diberikan stimulasi listrik selama 2 minggu (2,5 V/cm, 1 Hz, denyut 5 ms) menunjukkan aktivitas spontan yang lebih rendah, potensi istirahat hiperpolarisasi, peningkatan transien Ca^{2+} intraselular, myofilamen yang terstruktur dan *up* regulasi gen Kir2.1, CSQ2, junctin, triadin, SERCA, Cav3, Amp2, MHC, and MLC.¹¹

Sebuah penelitian terbaru menyebutkan bahwa bentuk embrio dibedakan dari hPSC yang diberikan stimulasi listrik selama tujuh hari (5 V/cm, 0.5,1 dan 2 Hz, denyut 2 ms). Stimulasi listrik ini meningkatkan ekspresi *connexin* dan struktur sarkomer. Kardiomyosit beradaptasi sesuai dengan stimulasi frekuensi dimana mereka dirangsang, sehingga kardiomyosit yang dihasilkan lebih kuat dan dapat bertahan selama dua minggu setelah stimulasi listrik.¹²

Kombinasi tekanan mekanis dan stimulasi listrik

Pengujian terhadap kombinasi stimulasi mekanik dan listrik telah dilakukan baik secara berurutan atau bersamaan terhadap konstruksi hPSC-CM.¹³ Penelitian dilakukan oleh Hirt *et al* menggunakan fibrin/matrigel berbasis hPSC-CM dengan stimulasi mekanik dan stimulasi medan listrik (2 V/cm, denyut 4ms, 2 Hz selama 1 minggu dan 1,5 Hz setelahnya) paling sedikit selama 10 hari. Hal ini

menunjukkan kesesuaian sel, organisasi sarkomer, respon kurva Ca^{2+} , respon inotropik pada b-adrenergik akan menurunkan efek.^{4,13}

Dalam penelitian lain, hPSCM dimasukkan ke dalam kolagen, diberi tekanan statis selama satu atau dua minggu dan satu minggu kemudian diberi kombinasi antara tekanan statis dan stimulasi listrik (5 V/cm, 2Hz, denyut 5 ms). Hal ini dibandingkan dengan kontrol (tidak diberi tekanan/tidak diberi stimulasi listrik), diamati selama dua minggu menunjukkan adanya peningkatan kesesuaian sel, kekakuan pasif, hipertrofi jantung dan meningkatnya kontraktilitas pada konstruk hpSC-CM ($0.63 \pm 0.10 \text{ mN/mm}^2$ vs. $0.055 \pm 0.009 \text{ mN/mm}^2$). Kontraktilitas pada konstruk dapat ditingkatkan dengan menggabungkan menggabungkan stimulasi mekanis dengan stimulasi listrik selama satu minggu ($1.34 \pm 0.19 \text{ mN/mm}^2$). Penggabungan ini dapat meningkatkan ekspresi protein SR (RYR2 and SERCA2).⁸

KESIMPULAN

Upaya untuk melakukan mimik terhadap stimulasi biofisik terhadap maturasi hPSC telah menghasilkan sejumlah strategi efektif untuk memperoleh *mature* hPSC-CM dan meningkatkan pemahaman kita tentang syarat yang mempengaruhi struktur dan fungsi kardiomyosit.⁴ Beragam variasi antara penelitian sulit untuk menarik perbandingan langsung antara strategi yang dilakukan. Hal ini karena tidak adanya keseragaman pada pematangan kardiomyosit dalam *in vitro*.

Stimulasi listrik nampaknya memiliki dampak yang cukup kuat pada sifat kelistrikan jantung sementara stimulasi mekanis dapat meningkatkan komponen struktural. Argumentasi ini didasarkan untuk homogenitas parameter yang digunakan sebagai standar (elektrofisiologi, dinamika kalsium, kekuatan kontraksi dan ultrastruktur).⁴

Meskipun beberapa progresivitas telah dicapai, *adult-like phenotype* pada *in vitro* belum dilaporkan. Hal ini dapat terjadi karena keterbatasan aplikasi yang digunakan. Pertama, status maturasi hPSC-CM harus disesuaikan dengan tingkatannya dan didokumentasikan sesuai dengan aplikasi yang digunakan. Kedua, hPSC-CM yang digunakan pada protokol dalam diferensiasi sel jantung merupakan populasi campuran sel ventrikel, atrium dan nodus. Heterogenitas semacam ini merupakan keterbatasan penggunaan aplikasi tertentu. Ketiga, lingkungan *in vivo* untuk pematangan kardiomyosit perlu diperhatikan. *Immature* hPSC-CM berdiferensiasi secara *in vitro* menjadi *mature* untuk ukuran dan morfologi setelah ditransplantasi ke jantung yang mengalami infark pada *non-human* primata.³

REFERENSI

1. Karp G. 2019. Cell and Molecular Biology Concepts and experiments 9th Edition. John Wiley & amp: Sons. ISBN: 978-1-119-59816-9.
2. Nunes SS, Miklas JW, Liu J, *et al.* Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2013;10(8):781-787. doi:10.1038/nmeth.2524.
3. Chong JJH, Yang X, Don CW, *et al.* Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014;510(7504):273-277. doi:10.1038/nature13233.
4. Sun X, Nunes SS. Bioengineering Approaches to Mature Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Front cell Dev Biol*. 2017;5(March):19. doi:10.3389/fcell.2017.00019.
5. Sun X, Nunes SS. Biowire platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Methods*. 2016;101:21-26. doi:10.1016/j.ymeth.2015.11.005.
6. Ahuja P, Sdek P, Maclellan WR. Cardiac Myocyte Cell Cycle Control in Development, Disease, and Regeneration. *Physiol Rev*. 2007;87:521-544. doi:10.1152/physrev.00032.2006.
7. Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, *et al.* Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res*. 2002;90(2):223-230. doi:10.1161/hh0202.103644.
8. Ruan J-L, Tulloch NL, Razumova MV, *et al.* Mechanical Stress Conditioning and Electrical Stimulation Promote Contractility and Force Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiac Tissue Running title: Ruan *et al.*: Force Maturation in Human Cardiac Tissue. *Circulation*. 2016;134(16):206-221. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014998
9. Mihic A, Li J, Miyagi Y, *et al.* Biomaterials The effect of cyclic stretch on maturation and 3D tissue formation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Biomaterials*. 2014;35(9):2798-2808. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.052.
10. Liu J, Laksman Z, Backx PH. The electrophysiological development of cardiomyocytes. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015. doi:10.1016/j.addr.2015.12.023.
11. Lieu DK, Fu J, Chiamvimonvat N, *et al.* Mechanism-Based Facilitated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ Arrhythmia Electrophysiol*. 2013;6(1):CIRCEP.112.973420--201. doi:10.1161/CIRCEP.111.973420.
12. Eng G, Lee BW, Protas L, *et al.* Autonomous beating rate adaptation in human stem cell-derived cardiomyocytes.

Nat Commun. 2016;7(May 2015):1-10.
doi:10.1038/ncomms10312.

13. Hirt MN, Boeddinghaus J, Mitchell A, *et al.* Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;74:151-161.
doi:10.1016/j.yjmcc.2014.05.009.