



Kadar TNF- α Enkapsulasi Sel Punca Mesenkimal

¹Sufida, ²Christine Verawaty Sibuea, ³Rachel Teodora Silaen, ⁴Glenessa Kuara, ⁵Sarah Christina Samosir, ⁶Kharnis Marsha Madora Ginting

^{1,2,3,4,5,6}Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen

Gedung Murni Sadar Universitas HKBP Nommensen, Jl. Sutomo No.4 - A, Perintis, Kec. Medan Tim., Kota Medan, Sumatera Utara 20232

Email: tsufida@yahoo.com, christine.sibuea@yahoo.com, Rachelteo1706@gmail.com, kuaraglenessa@gmail.com, sarahchristina053@gmail.com, kharnisginting@gmail.com

ABSTRAK

Sel punca mesenkimal (MSCs) memiliki kemampuan proliferasi dan kemampuan berdiferensiasi yang tinggi, dan efek parakrin yang mengandung banyak faktor pertumbuhan dan sitokin pro-inflamasi. *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang disekresikan oleh MSCs. TNF- α memiliki peran penting dalam pengaturan sistem imun. Terapi seluler penyakit degeneratif dan infeksi menggunakan MSCs memanfaatkan kemampuan proliferasi, diferensiasi dan efek parakrinnya. Kematian sel sebelum mencapai organ target merupakan keterbatasan dalam terapi seluler. Penelitian menggunakan pendekatan enkapsulasi MSCs dikembangkan untuk mengatasi keterbatasan kurangnya retensi MSCs pada terapi seluler dalam mempertahankan kelangsungan hidup dan efek parakrin MSC. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek parakrin MSCs berupa kadar TNF- α pada enkapsulasi MSCs. MSCs dienkapsulasi dengan menggunakan alginat yang *dicross-linked* dengan CaCl₂. Enkapsulasi MSCs dikultur selama 21 hari dan dilakukan analisis kadar TNF- α . Penelitian ini menunjukkan bahwa TNF- α pada MSCs mengalami penurunan hingga hari ke-21. Hal ini menunjukkan bahwa enkapsulasi MSCs mempengaruhi kadar TNF- α dan mempertahankan MSCs dari lingkungan luar.

Kata kunci: *MSCs, alginate, enkapsulasi, TNF- α*

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) have high proliferation ability and differentiation ability, and paracrine effects containing many growth factors and pro-inflammatory cytokines. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is one of growth factor secreted by MSCs. TNF- α has an important role in regulating the immune system. Cellular therapy in degenerative and infectious diseases using MSCs due to their proliferation, differentiation and paracrine effects. Cell death before homing to the target organ is a limitation in cellular therapy. Studies in MSCs encapsulation was developed to overcome the limitations of the shortage of retention of MSCs in cellular therapy in maintaining survival and paracrine effects of MSCs. This study aimed to determine the paracrine effect of MSCs in the form of TNF- α levels on MSCs encapsulation. MSCs were encapsulated using alginate cross-linked with CaCl₂. Encapsulated MSCs were cultured for 21 days and TNF- α levels were analyzed. This research showed that TNF- α in MSCs decreased until day 21. This showed that encapsulation of MSCs affected TNF- α levels and maintained MSCs from the external environment.

Keywords: *MSCs, alginate, encapsulated, TNF- α*

Pendahuluan

MSCs digunakan sebagai terapi seluler untuk infeksi dan penyakit degeneratif karena kemampuan imunomodulator dan regenerasinya. MSCs dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel dan memiliki efek parakrin, yang merupakan mekanisme kunci untuk perbaikan dan regenerasi jaringan.¹

MSCs memiliki kemampuan untuk memodulasi sistem kekebalan tubuh melalui sekresi banyak faktor pertumbuhan dan sitokin anti-inflamasi karena efek parakrin yang disekresikannya. Efek parakrin mengandung faktor pertumbuhan dan sitokin yang penting dalam regenerasi jaringan, imunoregulasi, dan efek anti inflamasi². MSCs dapat mengatur kadar sitokin imunomodulator, seperti TNF- α , IL-1, IL-6, dan IL-10¹. MSCs menghambat sel T efektor dan mengaktifkan sel T regulator, sehingga menurunkan regulasi produksi sitokin proinflamasi, termasuk TNF- α , dan menekan peradangan³.

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa lingkungan inflamasi menghambat fungsi MSCs, namun modulasi MSCs oleh faktor inflamasi tertentu mungkin berperan penting dalam pengobatan banyak penyakit. TNF- α merupakan faktor inflamasi utama dalam lingkungan mikro penyakit inflamasi⁴.

MSCs sebagai terapi seluler menunjukkan kekurangan karena rendahnya persistensi sel dan kesulitan mempertahankan efek parakrin. Hal ini memberikan tantangan untuk mengembangkan metode yang dapat mempertahankan retensi seluler dan efek parakrin dalam terapi seluler⁵. Banyak penelitian telah dilakukan untuk menjawab

tantangan tersebut. MSCs yang dienkapsulasi dianggap dapat menjaga viabilitas sel dan meningkatkan ketahanan terhadap reaksi imun dari luar kapsul⁶. Enkapsulasi MSCs mempertahankan MSCs di dalam kapsul dan membatasi infiltrasi imun host dengan tetap memungkinkan MSCs merasakan dan merespons lingkungannya⁷. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek parakrin MSCs berupa kadar TNF- α pada enkapsulasi MSCs.

Metode Penelitian

Kultur dan Enkapsulasi MSCs

MSCs diisolasi dari tali pusat dengan menggunakan metode yang dikembangkan pada penelitian sebelumnya⁸. MSCs telah dianalisa dengan penanda CD105, CD90, dan CD73 untuk memenuhi kriteria ISCT dan dikriopreservasi. Sebelum dienkapsulasi, kriopreservasi MSCs dicairkan dan dikultur dengan media α MEM (disuplementasi dengan lisat trombosit dari Bank Darah Indonesia setempat, Glutamax (Gibco), dan heparin)².

Saline buffer fosfat (PBS, Gibco) digunakan untuk melarutkan alginat untuk menghasilkan larutan alginat 1,8%. Suspensi $2,5 \times 10^5$ MSCs dicampur dengan alginat dengan perbandingan 1:4 dan ditetaskan ke dalam larutan CaCl₂ 0,2M dengan menggunakan spuit insulin. Teknik enkapsulasi ini diadaptasi dari penelitian sebelumnya^{9,10}. MSCs yang dienkapsulasi dicuci menggunakan PBS, kemudian dipindahkan ke dalam *six well plate*, dan dikultur dalam media kultur yang sesuai selama 21 hari.

Analisa TNF- α

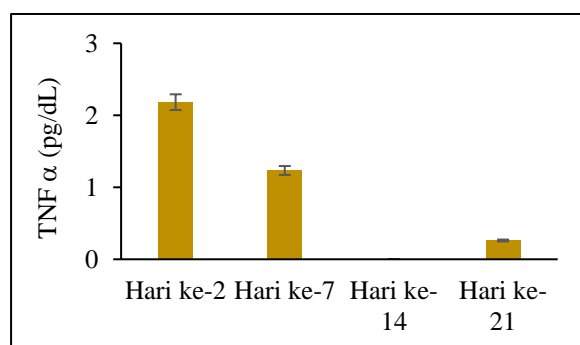
Medium kultur enkapsulasi MSCs dikumpulkan pada hari ke-2, ke-7, ke-14, dan ke-21 dan disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm. Kadar TNF- α dianalisa dari supernatan yang diperoleh dari sentrifugasi dengan menggunakan Human TNF- α ELISA Kit (Quantikine) CAT: DTA00D, mengikuti protokol yang disediakan oleh produsen. Penelitian *in vitro* ini dilakukan di SCTE IMERI FK UI dengan izin etik KET-732/UN2.F1/ETIK/PPM.00.02/2022.

Hasil

Kadar TNF- α mengalami penurunan pada hari ke-2 hingga hari ke-14, dan meningkat sedikit pada hari ke-21 namun tidak berbeda nyata dengan hari ke-14 (Tabel 1 dan Gambar1).

Tabel 1. TNF- α Level pada Encapsulasi MSCs

Durasi	Kadar TNF- α (pg/dL)
Hari 2	2,18
Hari 7	1,23
Hari14	0,00
Hari 21	0,26



Gambar 1. Level TNF- α pada MSC Terenkapsulasi

Pembahasan

Efek parakrin MSCs TNF- α pada penelitian ini diperoleh pada kondisi basal. Kematian sel selama masa kultur 21 hari dapat menurunkan viabilitas MSCs dan mempengaruhi pelepasan TNF- α . Kadar TNF- α pada enkapsulasi MSCs menurun hingga tidak ditemukan pada hari ke 14 dan sedikit meningkat pada hari ke 21. Hasil ini menunjukkan bahwa enkapsulasi melindungi MSCs yang berada di dalam kapsul dari rangsangan luar kapsul, sehingga sekresi TNF- α hanya berasal dari MSCs di dalam kapsul, dan bukan disebabkan oleh rangsangan dari luar kapsul. Enkapsulasi melindungi MSCs dari lingkungan di luar kapsul. Kumar et al menunjukkan bahwa enkapsulasi MSCa mengurangi ekspresi sitokin antiinflamasi.¹¹

Penurunan TNF- α dapat disebabkan oleh penurunan viabilitas MSCs, sehingga sedikit peningkatan kembali kadar TNF- α pada hari ke 21 dapat disebabkan oleh proliferasi MSCs pada kapsul.

MSCs juga mensekresi efek parakrin lainnya, misalnya IL-10, PGE2, dan TGF- β . Parakrin lain ini dapat mengatur sekresi TNF- α . Penelitian yang dilakukan oleh Putra et al menunjukkan bahwa kadar TNF- α dapat dipengaruhi oleh IL-10 dan TGF- β ¹². Faktor inflamasi MSCs yang diinduksi TNF- α menghasilkan banyak jenis sitokin^{13,14,15}. Sitokin ini dapat mempengaruhi TNF- α dan menurunkan sekresinya. Penelitian ini tidak menganalisis bagaimana sitokin lain mempengaruhi TNF- α . Hal inilah yang menjadi keterbatasan penelitian kami.

Penelitian ini menunjukkan penurunan kadar TNF- α enkapsulasi MSCs. Hasil ini menunjukkan bahwa penurunan TNF- α mungkin dipengaruhi oleh regulasi efek parakrin lainnya.

Kesimpulan dan Saran

Penelitian ini menunjukkan bahwa enkapsulasi MSCs mempengaruhi kadar TNF- α dan menjaga MSCs dari lingkungan luar kapsul. Kadar TNF- α menurun selama durasi kultur menunjukkan bahwa sitokin dan mediator inflamasi dari lingkungan luar tidak dapat menginduksi sekresi TNF- α . Enkapsulasi menjaga MSCs dari lingkungan luar kapsul.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didukung oleh hibah Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia, 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* [Internet]. 2019;54(9):763–73. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00535-019-01599-1>
2. Sibuea CV, Pawitan JA, Antarianto R. 3D Co-Culture of Hepatocyte , a Hepatic Stellate Cell Line , and Stem Cells for Developing a Bioartificial Liver Prototype. 2020;11(June):951–62.
3. Yan L, Zheng D, Xu R he. Critical Role of Tumor Necrosis Factor Signaling in Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Autoimmune and inflammatory Diseases. 2018;9(July):1–13.
4. Li W, Liu Q, Shi J, Xu X. The role of TNF- α in the fate regulation and functional reprogramming of mesenchymal stem cells in an in fl ammatory microenvironment. 2023;(February):1–14.
5. Nurhayati RW, Cahyo RD, Pratama G, Anggraini D, Mubarok W, Kobayashi M, et al. applied sciences Alginate-Chitosan Microencapsulated Cells for Improving CD34 + Progenitor Maintenance and Expansion. 2021;117:1–10.
6. Meftahpour V, Malekghasemi S, Baghbanzadeh A. Platelet lysate : A promising candidate in regenerative medicine Platelet lysate : a promising candidate in regenerative medicine. 2021;(February 2022).
7. Landázuri N, Levit RD, Joseph G, Ortega-legaspi JM, Flores CA, Weiss D, et al. Alginate microencapsulation of human mesenchymal stem cells as a strategy to enhance paracrine- mediated vascular recovery after hindlimb ischaemia. 2012;
8. Pawitan JA, Kispa T, Mediana D, Goei N, Fasha I, Liem IK, et al. Research Article Simple production method of umbilical cord derived mesenchymal stem cell using xeno-free materials for translational research. 2015;652–6.
9. Nurhayati RW, Antarianto RD, Pratama G, Rahayu D, Mubarok W, Kobayashi M, et al. Encapsulation of human hematopoietic stem cells with a biocompatible polymer Encapsulation of Human Hematopoietic

- Stem Cells with a Biocompatible Polymer. 2019;020011(April):1–6.
10. Garate A, Casado JG, Blazquez R, Pedraz JL, Orive G, Hernandez RM. Assessment of the Behavior of Mesenchymal Stem Cells Immobilized in Biomimetic Alginate Microcapsules. 2015;(October).
 11. Kumar S, Kabat M, Basak S, Babiarz J, Berthiaume F, Grumet M. Anti-Inflammatory Effects of Encapsulated Human Mesenchymal Stromal / Stem Cells and a Method to Scale-Up Cell Encapsulation. 2022;
 12. Putra A, Ridwan FB, Putridewi AI, Kustiyah AR, Wirastuti K, Anna N, et al. The Role of TNF- α induced MSCs on Suppressive Inflammation by Increasing TGF- β and IL -10. 2018;6(10):1779–83.
 13. Xu C, Feng C, Huang P, Li Y, Liu R, Liu C, et al. TNF α and IFN γ rapidly activate PI3K - AKT signaling to drive glycolysis that confers mesenchymal stem cells enhanced anti - inflammatory property. 2022;1–14.
 14. Microenvironment BM. The 65th ASH Annual Meeting Abstracts ONLINE PUBLICATION ONLY. Blood [Internet]. 2023;142(November):5624. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2023-186067>
 15. Sekenova A, Li Y, Issabekova A, Saparov A. TNF- α Preconditioning Improves the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cells in an Experimental Model of Atherosclerosis. 2023;