

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Osteoarthritis (OA) merupakan penyakit sendi kronis yang paling umum seiring bertambahnya usia. OA secara etiologi disebabkan berbagai faktor termasuk mekanik, biokimia, dan genetika, yang semuanya bisa berkontribusi pada OA (Martel-Pelletier, 2004 ; Goldring, 2000a). OA paling berpengaruh pada sendi lutut, tangan, pinggul, dan tulang belakang yang merupakan muskuloskeletal terpenting. Gejalanya sering dikaitkan dengan gangguan fungsional yang signifikan, begitu juga tanda dan gejala peradangan, termasuk rasa nyeri, kekakuan, dan hilangnya mobilitas. (Felson, 2006).

Osteoarthritis ditemukan lebih banyak pada wanita dibandingkan pria. Risiko yang lebih tinggi berada pada individu yang diklasifikasikan sebagai obesitas (Lawrence *et al.*, 2008). Murphy *et al.* (2008) memperkirakan bahwa risiko OA simtomatik lutut sekitar 47% pada wanita dan 40% pada pria. Saat ini, OA merupakan salah satu penyakit yang paling sering didiagnosis pada praktek umum, dengan prevalensi yang diproyeksikan dua kali lipat pada tahun 2020 sebagian besar karena populasi menua dan prevalensi dari obesitas terus meningkat (Lawrence *et al.*, 2008). Hal ini telah dibuktikan dalam penelitian terbaru dari data Amerika Serikat (AS) yang menunjukkan bahwa prevalensi OA sendi tangan, pinggul atau lutut secara klinis telah meningkat dari 21 juta orang dewasa AS yang berusia 25 tahun atau lebih tua di 1995 menjadi 27 juta orang dewasa setelah satu dekade (Lawrence *et al.*, 2008).

Osteoarthritis pada kondisi patologis dapat mengakibatkan degenerasi progresif tulang rawan artikular pada sendi tersebut (Poole, 2000). OA juga dianggap sebagai hasil kumulatif dari peristiwa mekanis dan biologis yang disebabkan oleh

ketidakseimbangan antara degradasi dan sintesis dalam jaringan sendi articular. OA merupakan proses kompleks yang menyebabkan terjadinya beberapa perubahan dalam komponen sendi seperti sel, matriks dan produksi molekul (Poole, 2000).

Stres mekanik memulai lesi tulang rawan dengan mengubah interaksi kondrosit-matriks dan merangsang kondrosit untuk mensintesis sitokin katabolik (Goldring, 2000b). Penelitian telah menunjukkan bahwa kondrosit menghasilkan sejumlah mediator inflamasi, seperti *interleukin-1-beta* (IL-1 $\beta$ ) dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) di jaringan dan cairan sendi OA. Kondrosit merespon sitokin proinflamasi dengan meningkatkan produksi proteinase, prostaglandin, dan nitrit oksida (NO) (Goldring and Marcu, 2009). Proteinase, prostaglandin, dan NO akan mendegradasi matriks. Selanjutnya, sel-sel sinovial merespon dan menfagositosis produk degradasi yang menyebabkan terjadinya inflamasi sinovial (Martel-Pelletier, 2004). Sehingga sel-sel seperti fibroblas dan makrofag sinovium mengeluarkan sitokin proinflamasi dan proteinase dalam merespon produk degradasi tulang rawan. (Goldring, 2000a).

*Interleukin-1-beta* dan TNF- $\alpha$  secara endogen diproduksi di sendi sebagai zat poten inflamasi (Goldring, 2000a). IL-1 $\beta$  secara prinsip merupakan mediator terhadap kerusakan sendi pada OA (Blaney *et al.*, 2007). Sitokin ini diproduksi oleh sinovial dan dilepaskan selama proses inflamasi dan berkontribusi langsung terhadap kerusakan jaringan dengan menginduksi dan merilis enzim yang merusak jaringan sendi, seperti *matrix metalloproteinase* (MMP) dan *A Disintegrin-like and Metalloproteinases with Thrombospondin Motifs* (ADAMTS), dari sel sinovial dan kondrosit articular (Daheshia and Yao, 2008), serta menghambat sintesis enzim inhibitor (Martel-Pelletier, 2004), seperti *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase* (TIMP).

Banyak penelitian observasional yang menunjukkan bahwa IL-1 $\beta$  terlibat dalam patogenesis OA (Kapoor, 2011), serta memainkan peran penting dalam pengembangan OA. IL-1 $\beta$  menunjukkan kemampuan bioaktivitas dalam menghambat sintesis ECM dan mendorong kerusakan tulang rawan. Penelitian menunjukkan bahwa IL-1 $\beta$  menekan ekspresi komponen penting ECM, agregkan dan kolagen tipe II di kondrosit (Goldring, 2000b ; Richardson and Dodge, 2000), serta menunjukkan kadar IL-1 $\beta$  yang lebih tinggi secara signifikan pada cairan sinovial OA dibandingkan dengan cairan sinovial normal (Kapoor, 2011).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa IL-1 $\beta$  secara mencolok menginduksi enzim proteolitik, seperti *colagenase* (MMP-1 dan MMP-13) dan *agrecenase* (ADAMTS-4) pada kondrosit dan fibroblas sinovial (Ellman *et al.*, 2012). Fan *et al.*, 2005, melaporkan bahwa IL-1 $\beta$  dapat meningkatkan regulasi MMP-1, MMP-3, MMP-13, dan ADAMTS-4 baik pada kondrosit manusia normal maupun OA. Bondeson *et al.* (2007) menunjukkan bahwa IL-1 $\beta$  meningkatkan regulasi ADAMTS-4 dan ADAMTS-5 di fibroblas sinovial OA manusia. Inoue *et al.* (2005) menjelaskan peningkatan regulasi rilis MMP-3 oleh kondrosit dan sinoviosit pasien OA setelah diberi IL-1 $\beta$ . Sedangkan Kobayashi *et al.* (2005) menunjukkan bahwa peningkatan regulasi (*up-regulation*) ekspresi gen MMP-1, MMP-3, dan MMP-13 di tulang rawan artikular dari pasien OA, bersamaan dengan peningkatan degradasi kolagen dan proteoglikan. Selain itu, menurut Tetlow *et al.* (2001) bahwa rilis protein MMP-1, MMP-3, dan MMP-13 oleh kondrosit artikular manusia distimulasi oleh IL-1 $\beta$ .

*Matrix metalloproteinase* merupakan enzim yang memainkan peran penting dalam degradasi matriks pada OA (Murphy dan Nagase, 2008). Enzim proteinase ini mampu mendegradasi komponen matriks tulang rawan utama, seperti kolagen,

aggrekan, *link protein*, dan protein oligomer tulang rawan (Stracke *et al.*, 2000 ; DeGroot *et al.*, 2001). *Colagenase* (MMP-1 dan MMP-13) mempunyai peran dominan pada RA dan OA (Burrage *et al.*, 2006). Produk dari hasil pemecahan kolagen dan aggrekan yang dimediasi MMP terdeteksi dalam tulang rawan OA (Dahlberg *et al.*, 2000; DeGroot *et al.*, 2001), dan kadarnya meningkat di cairan sinovial pasien OA dan RA, dan penghambatan MMP mengurangi degradasi kartilago secara *in vitro* (DeGroot *et al.*, 2001).

*Matrix metalloproteinase-1* merupakan salah satu anggota MMP, yang sangat bertanggung jawab terhadap kerusakan jaringan sendi artikular karena mendegradasi kolagen *native*, yaitu kolagen tipe I, II, dan III. Peningkatan kadarnya tidak hanya terlihat dalam membran sinovial, cairan sinovial, dan tulang rawan manusia yang didiagnosis OA (Fahmi *et al.*, 2002), tetapi juga terlihat di dalam serum tikus OA secara signifikan (Yan *et al.*, 2015) MMP ini diproduksi oleh fibroblas sinovial di lapisan intima membran sinovial, dan oleh makrofag serta kondrosit (Fahmi *et al.*, 2002)

*A Disintegrin-like and Metalloproteinases with Thrombospondin Motifs* juga memainkan peran penting untuk mendegradasi matriks tulang rawan. Aggrekanase yang paling berperan bersama MMP mendegradasi matriks adalah ADAMTS-4 dan ADAMTS-5. ADAMTS-4 aktif selama degenerasi tulang rawan dan ekspresinya meningkat pada tulang rawan degeneratif. ADAMTS-5 terdapat pada tulang rawan normal dan dalam kondisi OA (Wang *et al.*, 2011). Hilangnya proteoglikan seperti aggrekan juga terkait dengan meningkatnya konsentrasi MMP-3 dan ADAMTS-5 yang teramati pada immobilisasi kaki belakang, dimana pergerakan sendi dapat mencegah meningkatnya protease dan kehilangan proteoglikan (Houard *et al.*, 2013). Ada bukti yang menunjukkan bahwa dalam sinovium dan tulang rawan OA, ADAMTS-4 adalah

*aggrecanase* yang diinduksi oleh sitokin proinflamasi, sedangkan ADAMTS-5 adalah bersifat konstitutif (Bau *et al.*, 2002 ; Pratta *et al.*, 2003 ; Bondeson *et al.*, 2006 ; Bondeson *et al.*, 2007). Penelitian Bondeson *et al.* (2006) secara *in vitro* menunjukkan bahwa dalam sinovium OA, ekspresi ADAMTS-4 ini didorong oleh TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ , sedangkan ADAMTS-5 tidak. Hal ini memungkinkan bahwa ADAMTS-4 adalah *aggrecanase* yang bertanggung jawab terhadap aggrekanolisis pada OA (Bondeson *et al.*, 2006 ; Pelletier *et al.*, 2001 ; Blom *et al.*, 2004 ; Van Lent *et al.*, 2004 ; Benito *et al.*, 2005), karena penyakit ini digerakan oleh sitokin.

Mediator proinflamasi seperti IL-1, TNF- $\alpha$  dan prostaglandin dapat meningkatkan kadar NO sebagai faktor katabolik yang memberikan kontribusi terhadap patologi penyakit OA, dengan memediasi sejumlah proses, termasuk apoptosis, dan melestarikan ekspresi sitokin proinflamasi (Pelletier *et al.*, 2001). Hal ini ditunjukkan oleh tingginya konsentrasi nitrit dan nitrat dalam cairan sinovial dan plasma pasien dengan arthritis (Allen *et al.*, 2004).

Nitrit oksida disintesis dalam sel mamalia dengan konversi L-arginine menjadi L-citrulline dan *nitric oxide* (NO). Reaksi ini dikatalisis oleh salah satu dari tiga isoform dari *nitric oxide synthase* (NOS), yaitu endotel NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS), dan *inducible* NOS (iNOS). Namun isoform *inducible* NOS (iNOS) diekspresikan selama jangka waktu yang lebih lama pada saat aktivasi oleh berbagai faktor, termasuk sitokin inflamasi TNF- $\alpha$  (Weinberg *et al.*, 2007). Produksi NO oleh iNOS dirangsang oleh sitokin, termasuk IL-1 $\beta$ , interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), dan *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ). Mediator ini menginduksi ekspresi iNOS dalam berbagai sel, termasuk kondrosit, sinoviosit dan makrofag (Mobasheri, 2013). Maneesh *et al.* (2005) melaporkan iNOS meningkat kadarnya pada pasien OA dan memegang peran penting dalam degradasi kartilago sendi.

Degradasi dan sintesis molekul matriks tulang rawan normal dikendalikan oleh kondrosit secara konstan. Selain faktor katabolik, kondrosit OA juga mengekspresikan faktor pertumbuhan anabolik, seperti *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  dan *insulin-like growth factor* (IGF)-1 yang merangsang produksi matriks ekstra seluler (ECM) (Blaney *et al.*, 2007).

Faktor pertumbuhan anabolik dan sitokin anti-katabolik yang terdapat pada kartilago OA memberikan kemampuan kondrosit untuk mengatur mekanisme kompensasi, tetapi tidak efektif untuk melawan kerusakan kartilago. Di antara faktor-faktor yang mampu mengatur kompensasi ini adalah IL-4, yang fungsinya mempertahankan homeostasis tulang rawan. IL-4 memiliki potensi sebagai anti-inflamasi yang dapat menghambat sintesis IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  (Assirelli *et al.*, 2014).

Osteoarthritis tergolong pada gangguan kesehatan kronis yang terjadi dalam jangka waktu panjang. Hingga saat ini belum ada obat yang mampu menyembuhkan OA secara total. Sehingga sebagian obat yang tersedia untuk OA hanya berfokus pada pengelolaan gejala maupun peningkatan mobilitas dan fleksibilitas penderitanya, seperti penggunaan obat analgesik dan anti inflamasi serta injeksi asam hyaluronat dan TGF- $\beta$ .

Pengobatan secara farmakologis yang tersedia saat ini untuk OA hanya efektif sementara dan mengakibatkan efek samping pada sistem pencernaan yaitu terjadinya iritasi dan pengikisan mukosa lambung, hati dan ginjal (Yan *et al.*, 2015) dan tidak menjamin akan terjadinya kesembuhan total dan kemungkinan terjadinya keadaan berulang (*reccurence*). Oleh karena itu, perlu dikembangkan terapi yang lebih efektif dan efisien untuk pengobatan OA yang tepat dan aman.

Pengobatan non farmakologi seperti teknik penggantian lutut secara total (*total knee replacement*, TKR) dengan bedah adalah pengobatan pilihan yang diterima saat

ini untuk gejala OA lutut. Namun, teknik TKR harus dilakukan operasi besar yang membutuhkan waktu, tenaga yang banyak dan biaya yang mahal. Selain itu, teknik TKR bukan tanpa komplikasi yang signifikan (Singh *et al.*, 2011 ; Wylde *et al.*, 2011). Sebanyak 20% dari pasien akan terus memiliki nyeri lutut dan masalah lainnya pasca TKR (Bourne *et al.*, 2010). Komplikasi yang signifikan seperti kematian, emboli paru dan infeksi yang mengharuskan pasien kembali ke rumah sakit (SooHoo *et al.* 2006).

Para pakar klinis berusaha mempertahankan sendi untuk mencegah tindakan TKR. Usaha untuk mempertahankan sendi dilakukan dengan metoda terapi berbasis sel. Terapi berbasis sel terdapat 2 macam, yaitu berbasis sel kondrosit dan berbasis *mesenchymal stem cell* (MSC). Terapi berbasis sel kondrosit yaitu sel yang berasal dari jaringan tulang rawan yang terdiri dari 2 macam yaitu *Autologus Chondrocyte Implantation* (ACI) dan *Matrix-Induced Autologus Chondrocyte Implantation* (MACI). Namun, metoda terapi berbasis sel kondrosit ada kelemahannya seperti ketersediaan *tulang rawan sendi* sehat yang terbatas, kesulitan dalam isolasi, dan ekspansi kondrosit. Terapi berbasis MSC adalah suatu tindakan untuk mengganti sel yang rusak, hilang atau kemampuannya berkurang dengan *stem cell* yang mempunyai kemampuan berdiferensiasi menjadi sel yang diperlukan dan MSC mudah didapat serta mempunyai efek samping yang minimal.

*Mesenchymal stem cells* memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai sel-sel khusus asal mesoderm seperti sel-sel tulang, tulang rawan, lemak, kardiomyosit, serat otot, dan sel-sel tubulus ginjal dan berdiferensiasi menjadi sel asal ektoderm, misalnya neuron, dan sel asal endoderm (*endodermal origin*), seperti hepatosit dan sel pankreas (Kalaszczynska and Ferdyn, 2015). MSC dapat menekan proliferasi sel T inflamasi, dan menghambat pematangan monosit dan sel dendritik myeloid yang menghasilkan efek imunomodulator dan anti-inflamasi. Mekanisme

imunomodulator ini menimbulkan potensi untuk mereka gunakan dalam kondisi inflamasi yang dimediasi auto-imun termasuk arthropathies inflamasi (Djouad *et al.*, 2009). MSC disamping memiliki potensi imunomodulator dan diferensiasi, juga mengekspresikan sitokin penting seperti TGF- $\beta$ , *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF) dan serangkaian molekul bioaktif yang merangsang perbaikan jaringan lokal (Rehman *et al.*, 2004 ; Caplan and Correa, 2011 ; Nakagami *et al.*, 2006). Selain itu, hasil penelitian Koh *et al.* (2012) menunjukkan bahwa injeksi intra-artikular MSC (berasal dari *fat pad infrapatellar*) adalah efektif untuk mengurangi rasa sakit dan meningkatkan fungsi lutut pada pasien OA lutut.

Karena sifat di atas, MSC dianggap sebagai pilihan pengobatan baru dan agen terapi dalam pengobatan regeneratif. Potensi terapi MSC dapat dieksekusi dengan penggantian langsung sel-sel jaringan yang terluka atau oleh efek parakrin pada lingkungan sekitar, secara tidak langsung mendukung revaskularisasi, melindungi jaringan dari apoptosis yang disebabkan oleh stres, dan reaksi inflamasi yang memodulasi secara tepat (Kalaszczynska and Ferdyn, 2015).

Sel punca mesenkimal yang digunakan dalam penelitian ini adalah berasal dari *Wharton's Jelly* (plasenta manusia). *Wharton's Jelly* manusia merupakan sumber yang kaya sel punca mesenkimal (MSC) (Baksh *et al.*, 2007). *Mesenchymal Stem Cells* yang berasal dari *Wharton's Jelly* manusia (hWJ-MSC) memiliki banyak keunggulan dibandingkan tipe stem sel yang lain antara lain tingkat proliferasi lebih tinggi, karakteristik *stemness* yang dapat bertahan beberapa lama secara *in vitro*, multipotensi luas, bersifat hipoimunogenik dan antikanker (Bongso and Fong, 2013). Sel punca mesenkimal yang berasal dari plasenta manusia (*human umbilical cord*) merupakan sumber jaringan sel punca yang dipandang sebagai limbah biologis dan biasanya



dibuang setelah lahir. Oleh karena itu penggunaannya tidak menimbulkan masalah etika (Batsali *et al.*, 2013).

Penelitian ini menggunakan hewan coba yaitu tikus putih jantan. Berbagai hewan coba telah digunakan untuk penelitian osteoarthritis seperti anjing, kelinci, marmot dan tikus. Hewan coba yang kecil seperti tikus cukup menjanjikan untuk digunakan dalam penelitian osteoarthritis. Tikus diinjeksi dengan *monosodium iodoacetate* (MIA) secara intraartikular ke dalam sendi lutut tikus. Perkembangan patologi persendian dengan cara ini dapat dikontrol dengan dosis iodoasetat yang diinjeksikan, sehingga memberikan sistem model yang berguna untuk mengevaluasi modulator potensial OA (Janusz *et al.*, 2001).

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, dimana penggunaan sel punca dapat dijadikan alternatif untuk terapi OA, maka penulis tertarik untuk melakukan penelitian secara *in vivo* Pengaruh Pemberian *Masenchymal Stem Cell Wharton's Jelly* Terhadap Kadar MMP-1, ADAMTS-4, iNOS dan IL-4 Pada Tikus Model Osteoarthritis.

## 1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dirumuskan masalah penelitian ini sebagai berikut:

1. Apakah terdapat perbedaan kadar MMP-1 serum tikus osteoarthritis lutut yang diterapi dengan *Masenchymal Stem Cell Wharton Jelly* dan yang tidak diterapi ?
2. Apakah terdapat perbedaan kadar ADAMTS-4 serum tikus osteoarthritis lutut yang diterapi dengan *Masenchymal Stem Cell Wharton Jelly* dan yang tidak diterapi ?

3. Apakah terdapat perbedaan kadar iNOS serum tikus osteoarthritis lutut yang diterapi dengan *Masenchymal Stem Cell Wharton Jelly* dan yang tidak diterapi ?
4. Apakah terdapat perbedaan kadar IL-4 serum tikus osteoarthritis lutut yang diterapi dengan *Masenchymal Stem Cell Wharton Jelly* dan yang tidak diterapi ?

### 1.3 Tujuan

#### 1.3.1 Tujuan umum

Menganalisis Efek *Masenchymal Stem Cell* dari *Wharton's Jelly* terhadap kadar MMP-1, ADAMTS-4, iNOS dan IL-4 pada serum tikus osteoarthritis lutut.

#### 1.3.2 Tujuan khusus

1. Menganalisis perbedaan kadar MMP-1 serum tikus osteoarthritis lutut yang diterapi dengan *Masenchymal Stem Cell Wharton Jelly* dan yang tidak diterapi.
2. Menganalisis perbedaan kadar ADAMTS-4 serum tikus osteoarthritis lutut yang diterapi dengan *Masenchymal Stem Cell Wharton Jelly* dan yang tidak diterapi.
3. Menganalisis perbedaan kadar iNOS serum tikus osteoarthritis lutut yang diterapi dengan *Masenchymal Stem Cell Wharton Jelly* dan yang tidak diterapi.
4. Menganalisis perbedaan kadar IL-4 serum tikus osteoarthritis lutut yang diterapi dengan *Masenchymal Stem Cell Wharton Jelly* dan yang tidak diterapi

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Ilmu pengetahuan

Diharapkan penelitian ini dapat memberikan pemahaman tentang penggunaan *Masenchymal Stem Cell* dari *Wharton's Jelly* pada osteoarthritis lutut secara *in vivo*.

### 1.4.2 Praktisi

Dengan diketahuinya efek *Masenchymal Stem Cell* dari *Wharton's Jelly* terhadap kadar MMP-1, ADAMTS-4, iNOS dan IL-4 pada serum tikus osteoarthritis lutut berguna untuk pengembangan terapi osteoarthritis lutut pada manusia.

