

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Landasan Teori

##### 1. Sel Punca Air Susu Ibu (SP-ASI)

###### a. Definisi SP-ASI

Air susu ibu (ASI) diproduksi kelenjar payudara ibu yang disebut *ductus lactiferus*. ASI memiliki peran utama sebagai penyuplai nutrisi, pendukung pertumbuhan bayi, memperkuat imunitas bayi yang baru lahir (Hassiotou *et al.*, 2014). Sel pada ASI dapat dibagi ke dalam 2 kelompok: sel derivat darah dan sel derivat kelenjar mammae, di mana pada kedua kelompok tersebut didapatkan sekelompok kecil sel punca/progenitor yang merupakan bagian dari sel punca mammary (Hassiotou *et al.*, 2012).

Sel punca merupakan sel dari embrio, fetus, atau sel dewasa yang memiliki kemampuan untuk memperbanyak diri sendiri dalam jangka waktu yang lama, belum memiliki fungsi spesifik, dan mampu berdiferensiasi menjadi tipe sel tertentu membangun sistem jaringan dan organ dalam tubuh (Widowati *et al.*, 2015). Sel punca embrional merupakan sumber jaringan yang paling baik digunakan untuk transplantasi namun isolasinya cukup sulit didapat, salah satunya dari embrio janin, yang sering bermasalah dengan etika (Bahadur *et al.*, 2010). Sel punca mesenkimal tali pusat harus mendapat perlakuan lebih karena hanya tersedia satu kali waktu sehingga penyimpanannya cukup menyita biaya (Arutyunyan *et al.*, 2016). Sel punca dari jaringan dewasa dapat diambil sewaktu-waktu tetapi hanya menyediakan sel progenitor saja, bukan sel pluripoten embrional. Sel punca pluripoten dengan induksi yang disebut *induced pluripotent stem cell* (iPSC) juga memiliki masalah keamanan dalam pemberian jangka panjang karena berisiko menjadi teratoma (Williams *et al.*, 2019).

*commit to user*

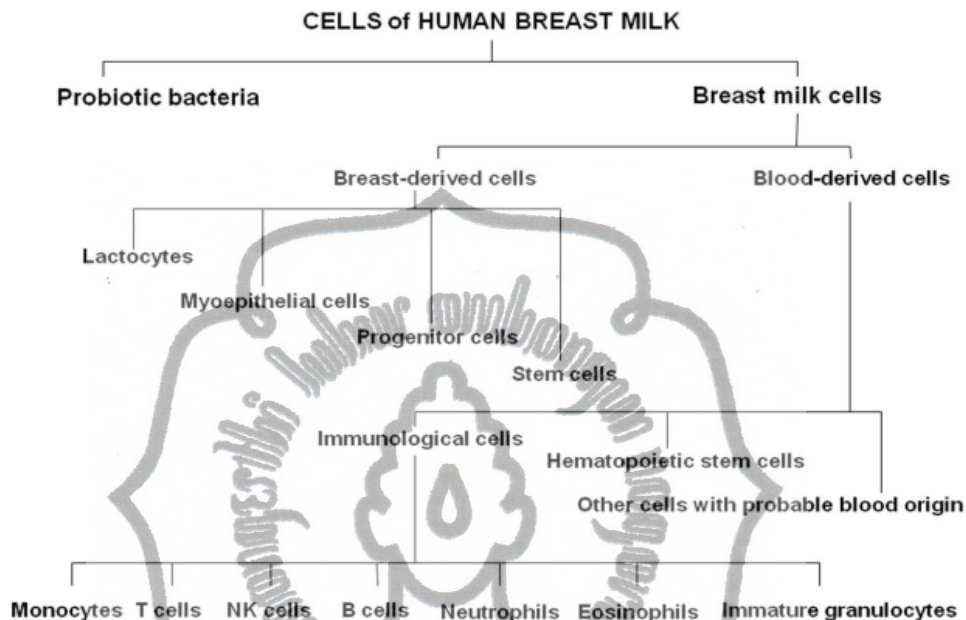
Sel punca mammary merupakan sel pluripoten yang mampu memperbaiki diri dan berdiferensiasi menjadi sel progenitor: sel luminal dengan ekspresi CK18, sel basal mioepitelial dengan ekspresi CK41 dan smooth muscle actin (SMA) (Twigger *et al.*, 2015). Sel punca/sel progenitor ASI pertama kali diidentifikasi dengan marker sel punca mammary CK5 dan sel punca umum nestin (Cregan *et al.*, 2007). Laporan pertama menggambarkan kemampuan pluripoten *sub-side population* sel ASI yang kemudian diberi nama sel punca ASI (SP-ASI) (Hassiotou *et al.*, 2012). Sel punca yang terdapat pada ASI yaitu terdiri atas dua macam, 1) sel punca mesenkimal (marker CD90, CD105, dan CD73) (Fan *et al.*, 2010) dan 2) sel punca embrional (marker NANOG, SOX2, dan OCT4) (Hassiotou *et al.*, 2012). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa sel isolat dari ASI memiliki marker yang sama dengan sel punca mesenkimal yaitu CD44, CD73, CD90, dan CD105 (Tang *et al.*, 2019).

b. Komposisi Seluler ASI

Komposisi sel pada ASI bersifat dinamis dan heterogen. ASI sebelumnya diketahui mengandung sel epitel dan sel imun, tetapi data terakhir menunjukkan bahwa ASI lebih heterogen daripada yang diperkirakan sebelumnya. ASI juga mengandung sel punca (*stem cell*) dan bakteri komensal yang menguntungkan secara kontinyu termasuk diantaranya bakteri asam laktat dan *bifidobacteria* (Witkowska-Zimny *et al.*, 2017).

Air susu ibu mengandung populasi sel yang sangat heterogen. Komposisi sel ASI tersebut yang terbanyak diantaranya sel laktosit (sel sekretori susu), sel mioepitelial (dari saluran dan alveoli kelenjar mammae) dan sel progenitor/sel punca mesenkimal. Komposisi sel ASI tersebut bersifat dinamis yang berarti kadarnya sangat bervariasi pada tiap individu dengan proporsi jenis sel yang berubah dipengaruhi oleh banyak faktor, seperti: waktu tahap menyusui, pemberian makanan ibu, kesehatan, usia gestasi, dan usia ibu. Perbedaan variasi

ini masih belum banyak diketahui dan membutuhkan penelitian lebih lanjut sehingga dapat membedakan faktor penentu proporsi sel ASI yang berguna untuk regenerasi sel tubuh.



**Gambar 2.1** Komposisi seluler ASI (Witkowska-Zimny *et al.*, 2017)

ASI memiliki peran dalam imunitas tubuh manusia baik imunitas aktif maupun imunitas pasif kepada bayi karena ASI mengandung imunoglobulin, laktoferin, lisozim, sitokin, dan banyak faktor imunologi lainnya. Imunisasi aktif salah satunya diperankan oleh leukosit ibu dari ASI dapat melawan patogen secara langsung melalui fagositosis, menghasilkan komponen bioaktif, membantu pengembangan sistem imunitas bayi baru lahir, atau memodifikasi lingkungan mikro dari saluran pencernaan bayi (Herwijnen *et al.*, 2016).

Sel leukosit dalam ASI mengandung beberapa prekursor seperti mieloid (9-20%), neutrofil (12-27%), granulosit imatur (8-17%), dan sel T non-sitotoksik (6-7%). Perkembangan laktasi dikaitkan dengan penurunan konsentrasi leukosit utama CD45<sup>+</sup>, eosinofil, prekursor sel mieloid, prekursor sel-B, dan monosit CD16. Frekuensi relatif neutrofil dan granulosit imatur secara signifikan

meningkat pada ASI matur dibandingkan dengan kolostrum (Witkowska-Zimny *et al.*, 2017).

**Tabel 2.1** Kandungan sel somatik pada ASI segar saat ibu dan bayi sehat

Sel somatik	Marker	% Populasi Sel	
		Kolostrum (1 hari prepartum hingga 5 hari postpartum)	Puncak laktasi (beberapa bulan postpartum)
Leukosit	CD45	13-20	1-2
Sel mioepitelial	CK5, CK14, CK18, CK19, CD49f, SMA	50-90	60-98
Laktosit	CK18, EPCAM		
<i>Breast milk stem cell</i> (hBSCs)	CD44, ITGB1/CD29, ATXN1/SCA1	10-15	Tidak ada data
<i>Mesenchymal stem cells</i> (MSCs)	CD90, CD105, CD73, VIM		

(Sumber : Witkowska-Zimny *et al.*, 2017)

Karena ASI diproduksi dari sel kelenjar mammae dan karena sel kelenjar mammae merupakan sel yang berhubungan langsung dengan duktus laktiferus, maka diasumsikan komposisi sel dalam ASI yang terbanyak yaitu berasal dari sel epitel kelenjar mammae. Jenis sel penyusun utama kelenjar mammae yaitu laktosit, yang termasuk dalam golongan sel epitel laminal kelenjar mammae (Hassiotou *et al.*, 2014). Penelitian terakhir menunjukkan bahwa ASI mengandung sel epitel luminal (CD18+) dalam jumlah besar, dengan komposisi utama adalah laktosit (32-86% dari keseluruhan sel). Selain itu, sel mioepitel (CK14) juga ditemukan dalam jumlah banyak dalam ASI (Hassiotou *et al.*, 2014). Penelitian lain juga menunjukkan bahwa terdapat sel progenitor

(CK18/CK14) dalam ASI (Villadsen *et al.*, 2007). Dari penjelasan di atas dapat disimpulkan bahwa sel yang memiliki komposisi besar dalam ASI yaitu sel luminal dan sel mioepitel, dengan beberapa sel jenis progenitor (Hassiotou *et al.*, 2012).

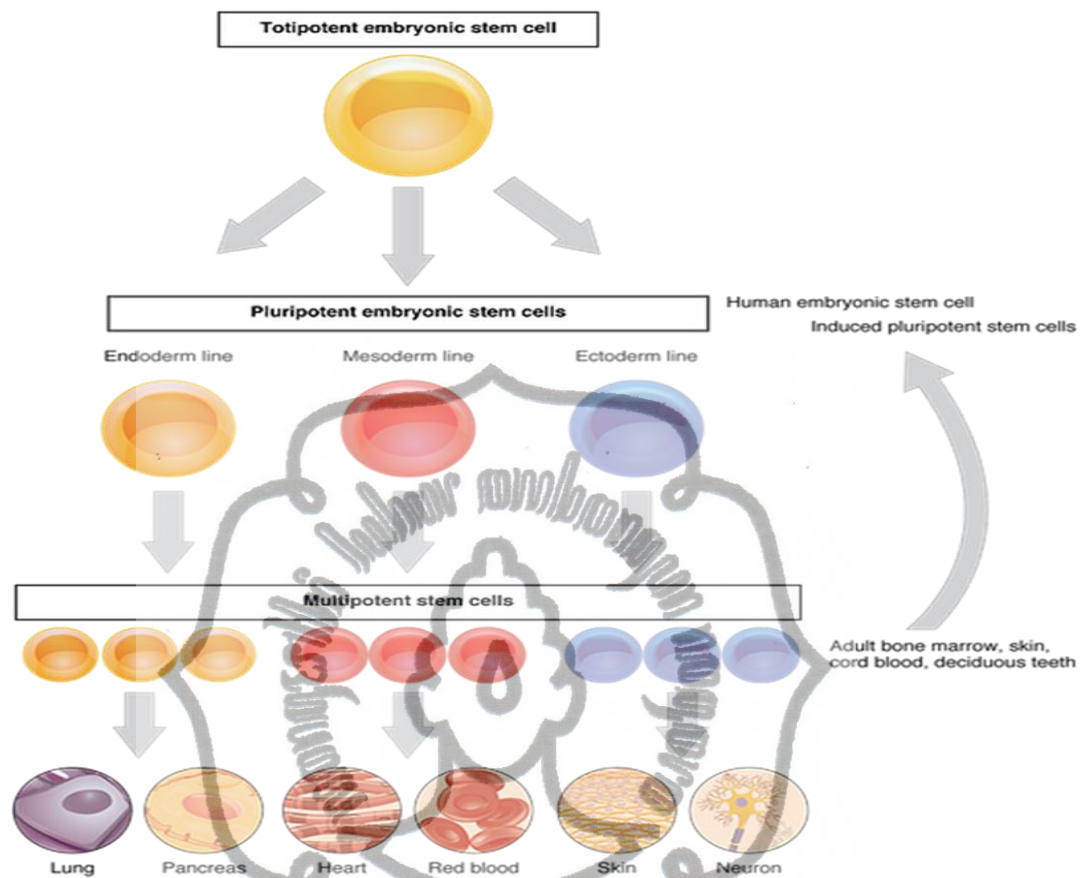
Sel punca mammary merupakan sel pluripoten yang mampu memperbaiki diri dan berdiferensiasi menjadi sel progenitor. Beberapa penelitian telah mengonfirmasi adanya sel punca mesenkimal pada ASI (Ninkina *et al.*, 2019). Sel pada kultur tersebut diperiksa dengan pelabelan *immunofluorescent* dan positif hingga pasase sel kesepuluh terhadap CD44, CD29, SCA-1, dan negatif terhadap CD33, CD34, CD45, CD73 (Hoseini *et al.*, 2014). Sel yang mengekspresikan penanda sel punca mesenkimal (CD44, CD90, CD271, dan CD146) positif pada sel punca derivat air susu (Abdullah *et al.*, 2016). Kultur sel ASI dengan *immunofluorescent assay* menunjukkan hasil positif terhadap CD44, CD29, Sca-1 dan negatif terhadap CD33, CD34, CD45, CD73 (Pichiri *et al.*, 2016). Penelitian terbaru menunjukkan sel ASI yang positif terhadap sel punca mesenkimal dikenali dengan marker CD44, CD73, CD90, dan CD105 (Tang *et al.*, 2019).

c. Karakteristik Sel Punca ASI

1) Belum berdiferensiasi (*undifferentiated*)

Salah satu karakter dasar yang dimiliki oleh sel punca adalah tidak mempunyai struktur jaringan yang spesifik untuk melakukan fungsi tertentu. Sel punca ASI tidak dapat bekerja dengan jaringan didekatnya untuk melakukan fungsi memompa darah ke seluruh tubuh (seperti sel otot jantung) dan tidak dapat mengangkut molekul oksigen melalui aliran darah (seperti sel darah merah) (Mathuret *et al.*, 2004). Sel punca ASI yang belum terdiferensiasi memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi tipe sel spesifik (Widowati *et al.*, 2015).

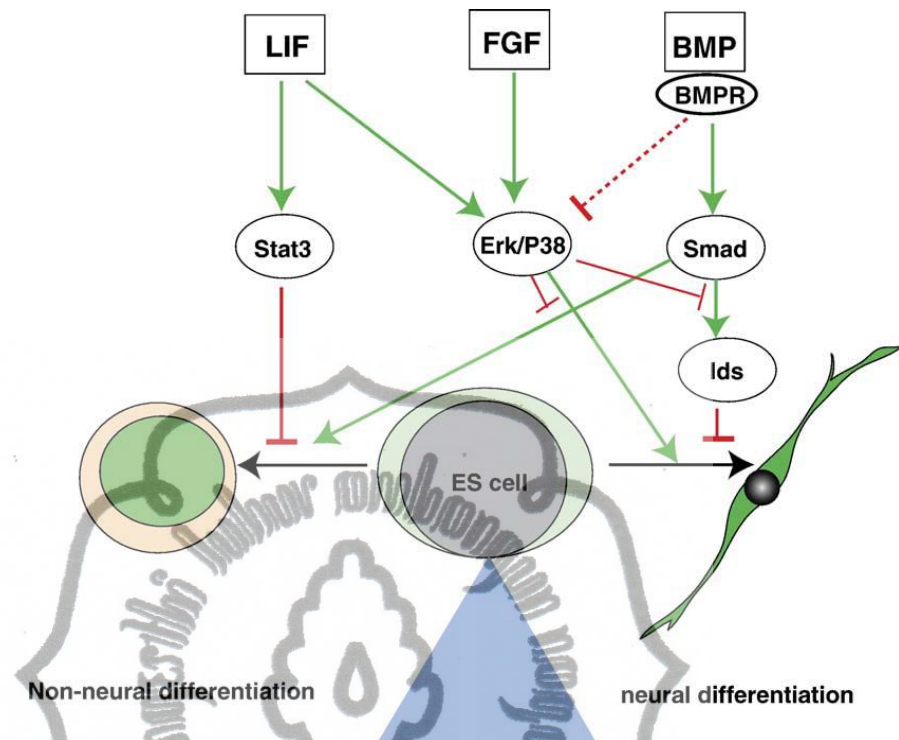




Gambar 2.2 Hirarki Sel Punca (Widowati *et al.*, 2015)

## 2) Mampu memperbanyak diri sendiri (*self renewal*)

Sel punca ASI dapat melakukan replikasi (proliferasi) dan menghasilkan sel-sel berkarakteristik sama dengan sel induknya. Kemampuan memperbanyak diri dan menghasilkan sel-sel yang sama seperti induknya ini tidak dimiliki oleh sel-sel tubuh lainnya seperti sel jantung, sel otak maupun sel pankreas (Widowati *et al.*, 2015). Kemampuan sel punca ASI untuk bereplikasi dapat berlangsung berulang kali. Jika sel yang dihasilkan tetap dalam kondisi yang belum terspesialisasi, maka dikatakan sel mempunyai kemampuan *long-term selfrenewal*, yaitu kemampuan sel punca mereplikasi diri dengan melakukan pembelahan menjadi tipe sel yang belum terspesialisasi dalam jangka waktu yang lama tergantung dari tipe spesifik sel punca (Morikawa *et al.*, 2016, Zhang and Li, 2005).



**Gambar 2.3** Faktor pemelihara pluripotensi sel dan jalur pensinyalan diferensiasi sel punca. (Zhang and Li, 2005)

3) Dapat berdiferensiasi menjadi 3 jenis sel induk (*pluripotent*)

Sel punca ASI juga mempunyai kemampuan untuk membentuk sel yang terspesialisasi. Kemampuannya untuk berproliferasi bersamaan dengan kemampuannya berdiferensiasi menjadi jenis sel tertentu inilah yang membuatnya unik. Keberadaan sel punca sebagai sel yang belum berdiferensiasi dimaksudkan untuk menjaga kontinuitas regenerasi populasi sel yang menyusun jaringan dan organ tubuh. Hal ini dapat dilakukan dengan kemampuan sel punca ASI untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel tubuh yang dibutuhkan (Morikawa *et al.*, 2016).

Sel punca umumnya mampu berdiferensiasi menjadi lebih dari satu jenis sel tubuh atau bersifat totipoten, pluripoten, multipoten, atau oligopoten (Bahadur *et al.*, 2010) tergantung dari jenis sel punca itu sendiri:

- a) Sel punca bersifat totipoten bila mampu berdiferensiasi menjadi tipe sel embrionik (Bahadur *et al.*, 2010). Sel semacam ini mampu untuk membangun sistem organisme yang lengkap, misalnya embrio (Mathur *et al.*, 2004).
- b) Sel punca pluripoten merupakan turunan dari sel totipoten yang mampu berdiferensiasi menjadi sel tubuh yang berasal dari ketiga lapisan embrional (ektoderm, mesoderm, dan endoderm) namun tidak bersifat teratogenik misalnya sel tali pusat, ASI (Bahadur *et al.*, 2010).
- c) Sel punca bersifat multipoten bila mampu berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel yang masih berada dalam satu golongan serupa, misalnya sel hematopoietik, sel saraf (Mathur *et al.*, 2004).
- d) Sel punca bersifat oligopoten bila mampu berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel tertentu saja, seperti sel punca limfoid dan mieloid (Zhang and Li, 2005).

d. Mekanisme Parakrin Sel Punca ASI

Paradigma baru saat ini menunjukkan bahwa efek menguntungkan sel punca pada jaringan tidak hanya dikarenakan proses diferensiasi langsung ataupun fusi dengan sel target, tetapi juga karena mekanisme parakrin (Liang *et al.*, 2014). Sel punca memiliki kemampuan dapat mensekresikan hampir seluruh sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan sel yang berperan dalam banyak proses biologis seluler (Gnecchi *et al.*, 2008). Beberapa protein pensinyalan yang berperan penting mencegah penyakit kardiovaskuler yaitu VEGF, IL-10, bFGF, PDGF (Baraniak and McDevitt, 2010). Komponen pelengkap seluler tersebut berfungsi menunjang fungsi sel seperti anti-apoptosis, angiogenesis, dan induksi fibrosis.



Selain faktor kardioprotektif, sel punca juga mensekresikan BMP untuk *self renewal* kardiomiosit (Morikawa *et al.*, 2016, Tres *et al.*, 2004). Sel punca memiliki efek parakrin yang berguna untuk angiogenesis pada regenerasi kardiomiosit yang normalnya mengalami pemecahan 0.45-1% setelah proses *injury* (Angelini *et al.*, 2011). Efek parakrin sel punca terdiri atas efek tropik (anti-apoptosis, stimulasi mitosis, proliferasi, dan diferensiasi sel punca endogen), imunomodulator, anti-fibrosis, angiogenesis dan kemoatraktan (Dell'Aversana *et al.*, 2019). Hipotesis mekanisme parakrin ini akan mengubah penggunaan sel punca mesenkimal untuk pengobatan regeneratif bukan berasal dari transplantasi sel punca lagi melainkan lebih memanfaatkan sekretom ataupun eksosom (Sze *et al.*, 2007). Transplantasi sel punca mesenkimal mampu meningkatkan produksi faktor pertumbuhan meliputi VEGF yang berfungsi angiogenesis, revaskularisasi, anti-apoptosis; bFGF yang berfungsi angiogenesis, antifibrosis, antiapoptosis; HGF yang berfungsi angiogenesis, mitogenesis, antifibrosis; adrenomedullin; dan IGF-1 (Hosseini *et al.*, 2014).

e. Sekretom Sel Punca ASI

Sekretom merupakan kultur sel punca ASI pada medium cair sferoid khusus, hal ini dikondisikan bebas kandungan serum untuk dapat meningkatkan kemampuan mekanisme parakrin sel punca (Wernly *et al.*, 2017). Sekretom sel punca lebih efektif mensekresikan sitokin, kemokin dan faktor pertumbuhan dibandingkan kultur sel punca ataupun sel punca lisis yang bermanfaat untuk regenerasi seluler (Granton *et al.*, 2015). Sel punca mensekresikan metabolit bioaktif lebih banyak dan bervariasi pada media kultur terkondisi. Media terkondisi sel punca merangsang kemoatraktan bagi makrofag dan sel endotel pada sel *injury* (Eleuteri *et al.*, 2019). Pada regenerasi seluler, media terkondisi sel punca memicu angiogenesis, epitelialisasi dan fibroproliferatif melalui sinyal parakrin (Kaingade *et al.*, 2016).

f. Hipoksia pada Lingkungan Mikro Sel Punca

Jaringan pada tubuh manusia berada dalam berbagai kondisi tekanan oksigen yang lebih rendah dari tekanan atmosfer oksigen 21%. Sel punca beradaptasi baik pada lingkungan bertekanan oksigen rendah untuk menjamin kelangsungan hidup *in vitro* (Mohseni *et al.*, 2013). Kondisi hipoksia terbukti sangat penting dalam meningkatkan kemampuan pluripotensi sel punca mesenkimal. Hipoksia meningkatkan pluripotensi sel punca melalui peningkatan ekspresi gen terkait pluripotensi *Octamer binding-4* (Oct-4) yang diinduksi oleh aktivasi *Hypoxia Inducible Factor 2 Alpha* (HIF-2 $\alpha$ ) dibandingkan sel punca mesenkimal yang dibiakkan dalam kondisi normoksia (Lo Sicco *et al.*, 2018).

Konsentrasi oksigen mempengaruhi berbagai aspek dalam fisiologi sel punca berkaitan dengan proliferasi dan diferensiasi sel punca (Guadall *et al.*, 2011). Kultur sel punca mesenkimal pada kondisi hipoksia mampu meningkatkan kadar faktor angiogenesis seperti VEGF, *placental growth factor* (PGF), dan angiopoietin melalui mekanisme yang diatur oleh faktor transkripsi *Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha* (HIF-1 $\alpha$ ) (Dell Aversana *et al.*, 2019). Penelitian lain menunjukkan kondisi hipoksia pada biakan sel punca mampu meningkatkan kapasitas sel dalam memperbaiki jaringan infark miokard, menurunkan jumlah kematian sel, mencegah apoptosis sel punca yang ditransplantasikan, meningkatkan angiogenesis dan neovaskularisasi, serta meningkatkan efek parakrin sel punca pada media terkondisi (Kusuma *et al.*, 2014).

2. Homeostasis Sel Endotel Pulmonal (*Pulmonary Artery Endothelial Cell / PAEC*)

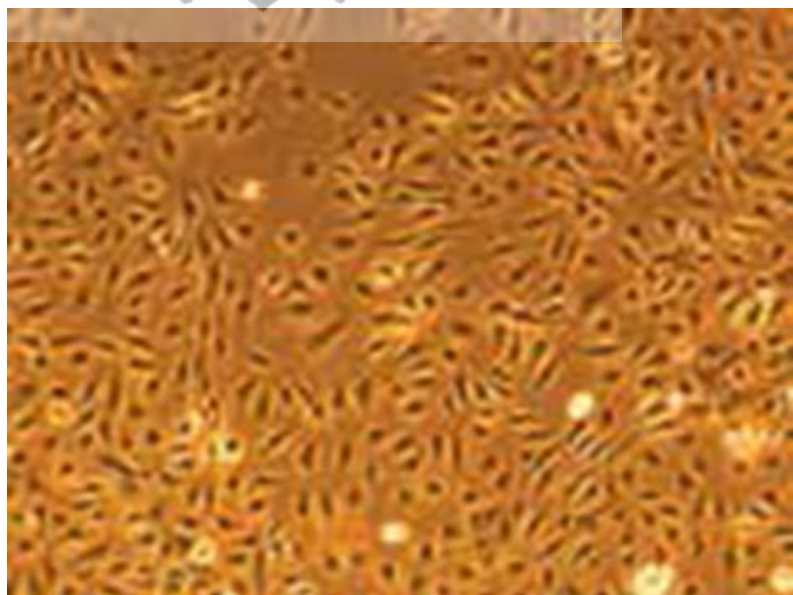
a. Morfologi

Secara fisiologis, sel endotel membentuk lapisan sel tunggal (*monolayer*) yang disebut *endotelium*. Lapisan sel tunggal ini

membentuk dinding pembuluh darah dan membentuk pertahanan semipermeabel antara darah dengan jaringan sekitar (McCarron *et al.*, 2017). Endotelium merupakan jaringan yang memiliki fungsi spesial dalam beberapa proses fisiologis tubuh. Secara keseluruhan, endotelium tersusun dari  $1-6 \times 10^{13}$  sel endotel yang melapisi area permukaan sebanyak 1000 meter persegi (Mai *et al.*, 2013).

Sel endotel dari tempat yang berbeda memiliki bentuk yang berbeda pula. Sel endotel vaskuler memiliki bentuk skuamous pipih, tetapi dapat juga berbentuk kuboid yang memiliki variasi ketebalan dari 0,1  $\mu\text{m}$  hingga 1  $\mu\text{m}$  (Mai *et al.*, 2013). Selain pada bentuk, perbedaan sel endotel juga terdapat pada protein dan penanda sel yang terletak di permukaan sel (McCarron *et al.*, 2017).

Pada pengamatan mikroskopis, sel endotel akan tampak seperti susunan batu bata dengan inti sel yang gelap. Saat proliferasi, sel akan tampak lebih kecil dengan indeks mitosis yang tinggi (ATCC, 2016). Sel endotel akan mengekspresikan marker di permukaan membran sel berupa VEGF, CD31, CD34, dan VE-Cadherin (Nguyen *et al.*, 2016).



**Gambar 2.4** Sel endotel arteri pulmonalis (PAEC) pada pengamatan mikroskopis (ATCC, 2016)

b. Fisiologi Sel Endotel Pulmonal (PAEC)

Sel endotel membentuk lapisan sel tunggal yang menyusun dinding pembuluh darah dan membentuk pertahanan semipermeabel antara darah dengan jaringan sekitar (Mai *et al.*, 2013). Pertahanan semipermeabel ini berperan penting dalam menjaga kelangsungan hidup jaringan karena memiliki peran dalam penyaluran zat, nutrisi, hormon, dan protein hingga sel imun tubuh (Rabelink *et al.*, 2010).

Fungsi lain dari sel endotel dibagi menjadi tiga besar, yaitu 1) *tropic*, 2) *tonic*, 3) *trafficking*. Secara fisiologis, sel endotel berperan serta dalam pengaturan homeostasis metabolik (fungsi *tropic*), hemodinamik vaskuler (fungsi *tonic*), serta permeabilitas vaskuler, koagulasi, dan ekstrasvasi sel (*trafficking*) (Davidson, 2010). Sel endotel juga memiliki peran dalam menjaga keseimbangan pengeluaran faktor vasokonstriksi dan faktor vasodilatasi seperti *nitric oxide*, prostasiklin, dan endothelin yang menjaga tonus vaskuler, tekanan darah, dan aliran darah (McCarron *et al.*, 2017).

Sel endotel memiliki peran penting dalam pengaturan pembekuan darah. Pengaturan tersebut melibatkan faktor anti-koagulan dan pro-koagulan. Pada kondisi fisiologis, sel endotel mengekspresikan penghambat faktor pembekuan dan trombomodulin, yang mencegah aktivasi molekul pro-koagulasi seperti faktor X, trombin, dan fibrin (Chien, 2007). Sedangkan ketika terjadi cedera, permukaan sel endotel akan berubah menjadi penunjang pengaktifan faktor pro-koagulasi dan membantu mengaktifkan kaskade pembekuan darah (McCarron *et al.*, 2017).

Selain memiliki fungsi dalam proses homeostasis darah, sel endotel juga memiliki peran penting dalam pengaturan permeabilitas vaskuler. Fungsi ini mengatur proses migrasi sel ke dalam dan keluar sistem sirkulasi, terutama saat respon inflamasi. Pada kondisi normal, sel basal endotelium dapat menjadi media difusi beberapa larutan



seperti glukosa, ion, dan beberapa metabolit sel (Giannotta *et al.*, 2013). Sedangkan ketika terjadi inflamasi, permeabilitas sel endotel meningkat sehingga dapat dilalui sel imun. Selain sel imun, pada proses inflamasi, molekul protein besar juga melalui endotelium sehingga terjadi edema (Mai *et al.*, 2013). Permeabilitas endotel ini diatur oleh dua proses, yaitu paraseluler dan transeluler (Giannotta *et al.*, 2013).

c. Disfungsi Sel Endotel Pulmonal (PAEC)

Endotelium pembuluh darah sangat dinamis dan memiliki banyak fungsi yang saling berkolaborasi antara sel satu dengan lainnya. Endotelium menghasilkan beberapa molekul yang berperan dalam proses autokrin dan parakrin untuk mengatur fungsi pembuluh darah secara keseluruhan seperti yang telah disebutkan sebelumnya (McCarron *et al.*, 2017, Mai *et al.*, 2013, Giannotta *et al.*, 2013). Salah satu tanda endotel masih berfungsi baik adalah adanya keseimbangan antara faktor pro dan anti-oksidan, vasodilator dan vasokonstriktor, molekul pro dan anti inflamasi, serta faktor pro dan anti-trombotik (Sanchez *et al.*, 2014). Jika sel endotel kehilangan fungsi untuk mengatur keseimbangan hal-hal tersebut, maka akan terjadi disfungsi endotel (Donato *et al.*, 2015).

Penyebab utama disfungsi endotel adalah kerusakan sel yang dapat dipicu oleh proses inflamasi, tekanan, ataupun reaksi stres oksidatif (Sanchez *et al.*, 2014). Kerusakan sel endotel akan menyebabkan tidak efektifnya proses aktivasi sel endotel untuk menjaga keseimbangan vaskuler. Aktivasi sel endotel juga mempengaruhi fungsi dari jaringan sekitar. Salah satu proses aktivasi endotel yang penting adalah respon endotel terhadap inflamasi. Pada saat inflamasi, endotel memproduksi vasodilator utama yaitu prostasiklin yang menyebabkan peningkatan aliran darah dan membantu leukosit untuk menuju jaringan tempat infeksi. Sitokin



proinflamasi seperti *tumor necrosis factor* (TNF- $\alpha$ ) dan interleukin-1 (IL-1) menyebabkan sel endotel memproduksi siklooksigenase (Cox), yang juga menyebabkan peningkatan produksi prostasiklin (Pober *et al.*, 2009). Contoh aktivasi lain yaitu adanya ekspresi molekul adhesi yang membantu proses diapedesis dan kemotaksis leukosit (Mai *et al.*, 2013). Secara singkat, aktivasi endotel dapat dipahami sebagai perubahan fungsi sel endotel yang berhubungan dengan proses inflamasi dan koagulasi sebagai bagian mekanisme pertahanan tubuh (Pober *et al.*, 2009).

Sedangkan disfungsi endotel adalah kegagalan endotel untuk mempertahankan fungsi pengaturan proses homeostasis, seperti mengatur aliran darah, mempertahankan volume cairan darah, pertukaran makromolekul dan cairan antara darah dengan jaringan, dan pencegahan inflamasi berlebihan (Pober *et al.*, 2009). Kegagalan pengaturan proses inflamasi berlebihan dan kegagalan pengaturan faktor vasodilator dan vasokonstriktor pada PAEC merupakan penyebab utama terjadinya HP (Lang and Gaine, 2015).

d. Apoptosis Sel Endotel Pulmonal (PAEC)

Apoptosis adalah kematian sel terprogram yang dimediasi oleh aktivasi dari protease intrasel yang disebut protein *Caspase3*. Apoptosis berbeda dari nekrosis, dimana nekrosis merupakan sebutan untuk kerusakan yang melibatkan jaringan. Kematian akibat apoptosis dimediasi oleh pengaktifan protein *Caspase3* yang kemudian melepaskan endonuklease aktif intrasel. Endonuklease yang aktif akan memotong untai DNA sehingga proses sintesis protein sel terganggu. *Caspase3* juga menyebabkan fragmentasi inti sel yang berujung pada kematian sel (Pober *et al.*, 2009). Bukti sebelumnya menyebutkan bahwa lepasnya sel endotel dari membran basalis dapat memicu proses apoptosis (Greijer *et al.*, 2004). Protein BMPR2 sebaliknya membantu membentuk integritas lapis tunggal pada sel endotel sehingga diduga dapat mencegah apoptosis (Long *et al.*, 2015).

e. Integritas Sel Endotel Pulmonal (*PAEC*)

Integritas *PAEC* merupakan salah satu mekanisme penting dalam memelihara homeostasis paru. Kerusakan pada integritas *PAEC* merupakan salah satu penyebab mekanisme terjadinya disfungsi endotel (Humbert and Ghofrani, 2016). Salah satu protein yang berperan dalam integritas *PAEC* adalah *VE-Cadherin* yang juga dikenal sebagai CD144. *VE-Cadherin* merupakan penyusun hubungan tautan antar sel endotel. Protein ini berperan dalam menjaga dan memperbaiki integritas vaskular melalui serangkaian mekanisme kompleks yang melibatkan pengaturan sitoskeleton sel endotel dan modulasi transkripsi gen (Giannotta *et al.*, 2013).

f. Hipoksia Sel Endotel Pulmonal (*PAEC*)

Hipoksia diketahui merupakan salah satu pencetus pembuluh darah paru untuk konstriksi, sedangkan pada pembuluh perifer menyebabkan dilatasi. Penelitian sebelumnya menunjukkan hipoksia dapat memicu proliferasi sel fibroblas arteri pulmonalis (Weerackody *et al.*, 2009), sedangkan efek proliferasi pada *PAEC* masih menjadi perdebatan (Song *et al.*, 2016, Porter *et al.*, 2014, Yu and Hales, 2011).

Salah satu jalur pensinyalan sel yang memiliki peran sebagai pengaturan pertumbuhan sel, respon stres seluler, dan pengaturan pengeluaran sitokin adalah p38 MAPK. Jalur ini juga memiliki peran penting dalam menjalankan fungsi endotel, regulasi inflamasi, proliferasi dan apoptosis sel (Weerackody *et al.*, 2009), serta merupakan jalur yang berperan penting dalam mekanisme terjadinya disfungsi endotel (Widder *et al.*, 2004). Bersama dengan HIF-1 $\alpha$ , p38 MAPK memiliki peran bersama dalam aktivasi faktor transkripsi untuk ekspresi gen terkait hipoksia dan stress lingkungan sel.

Gen terkait hipoksia ini akan menyebabkan terjadinya *remodelling* pembuluh darah paru yang dimediasi sel endotel. Pada proses *remodelling* ini sel endotel akan memproduksi faktor vasokonstriktif pro-proliferasi sel (endotelin-1 (ET-1), angiotensin II,

tromboxane A<sub>2</sub>) dan mereduksi produksi faktor vasodilatasi dan faktor antiproliferasi (NO dan prostaglandin-I<sub>2</sub>) (Pak *et al.*, 2007). *Reactive oxygen spesies* (ROS) dapat mengaktivasi p38 MAPK. Aktivasi p38 MAPK oleh ROS ternyata memiliki respon yang berbeda terhadap sel, yaitu memicu apoptosis dan menghambat pertumbuhan (Kennedy *et al.*, 2007). Hipoksia dapat menginduksi terbentuknya ROS dan kemudian mengaktifkan p38 MAPK yang memiliki peran dalam patogenesis terbentuknya ROS dan disfungsi endotel, dimana pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penghambatan jalur p38 MAPK akan meningkatkan produksi NO dan mengurangi produksi ROS sehingga dapat memperbaiki disfungsi endotel (Weerackody *et al.*, 2009).

3. Sel Epitel Tali Pusat (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell / HUVEC*) sebagai Rekombinan Sel Endotel Pulmonal (*PAEC*)

Sel epitel tali pusat memiliki bentuk menyerupai sel endotel pembuluh darah paru berupa sel epitel squamous (Arutyunyan *et al.*, 2016). Karena keterbatasan masalah etika kedokteran, umumnya penelitian mengenai sel endotel arteri pulmonal manusia diambil dari jaringan endotel vaskular mamalia, sumsum tulang ataupun sel epitel tali pusat.

Kultur primer endotel yang didapatkan dari *HUVEC* saat ini telah banyak dikembangkan mengingat tidak invasif, cepat dan mudah dikerjakan di laboratorium. Rekombinan sel endotel ini memiliki bentuk dan sifat yang menyerupai sel epitel vaskular pulmonal (Siow CM, 2012). Teknik kultur primer dikerjakan dengan mengambil sel endotel vena umbilikalis dan ditumbuhkan pada media khusus sel epitelium diinkubasi pada kondisi tekanan atmosfer oksigen lebih rendah untuk merangsang proliferasi dengan menekan kebutuhan metabolisme basal seluler (Liu *et al.*, 2016a).

Remodelling pembuluh darah yang terjadi pada kondisi hipertensi pulmonal dapat diupayakan dengan mengkondisikan *HUVEC* hipoksia

selama minimal 24 jam untuk dinilai respon molekuler biologis yang terjadi (Dal Monte *et al.*, 2011). Kondisi hipoksia akan merangsang sekresi dan meningkatkan ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), tetapi hal ini sangat bergantung pada jumlah pasase sel kultur yang mempengaruhi ekspresi seluler protein (Sakao *et al.*, 2010).

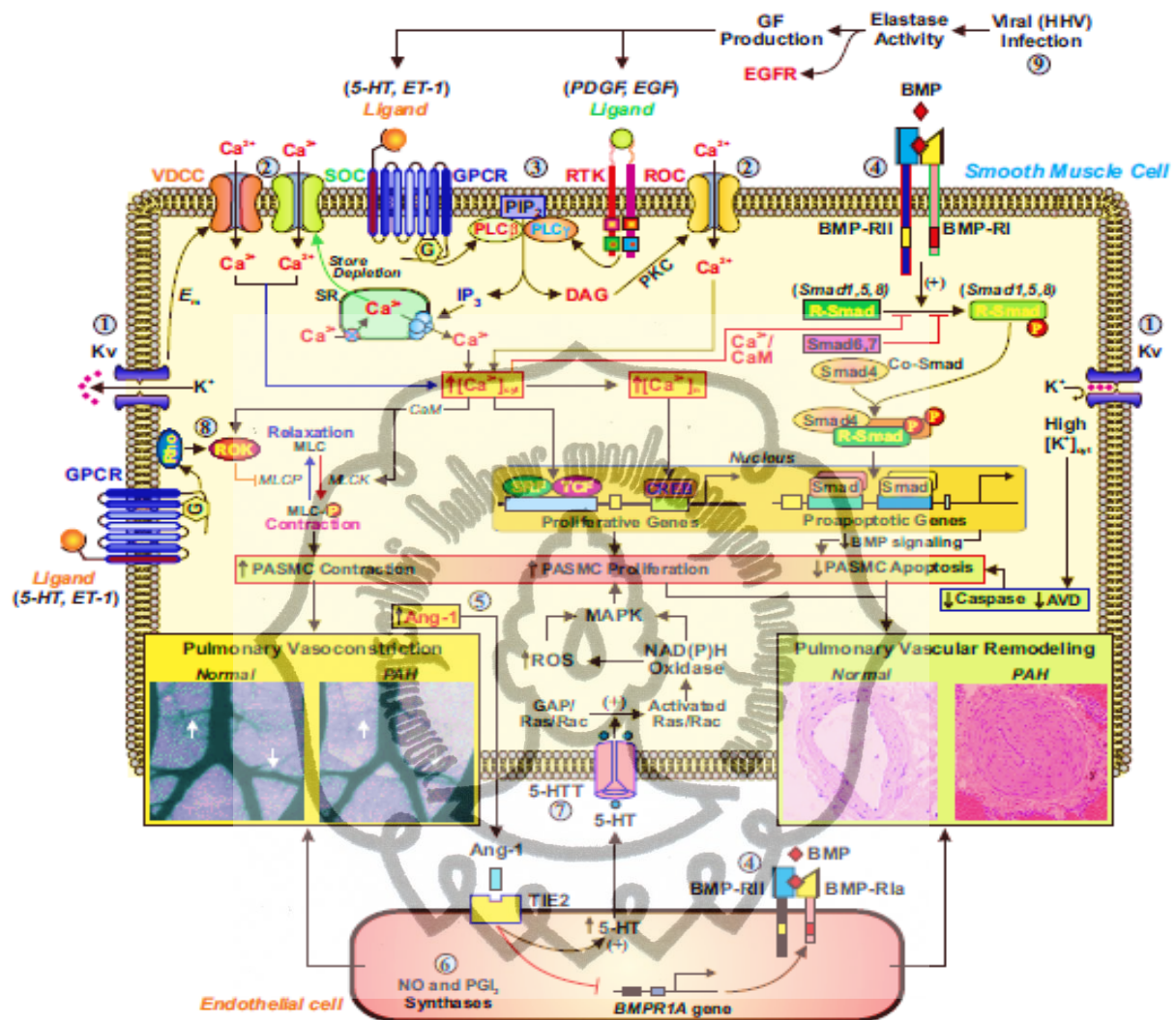
#### 4. Patofisiologi Molekuler Hipertensi Pulmonal

Hipertensi pulmonal (HP) tersering terjadi akibat disfungsi sel endotel arteri pulmonalis (PAEC). Pada HP terjadi disfungsi endotel, penurunan rasio apoptosis:proliferasi sel otot polos arteri pulmonalis (*Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells* / PSMCs), penebalan intima media, proliferasi tunika adventisia dan aktivasi adventisia metaloprotease yang berlebihan menimbulkan thrombosis *in situ* mirip seperti pada kanker dan aterosklerosis (Morrell *et al.*, 2009).

Pada HP tampak produksi vasokonstriktor seperti endotelin dan tromboksan oleh endotel meningkat, namun disisi lain terjadi penurunan produksi vasodilator seperti prostasiklin (PGI). Prostasiklin (PGI) merupakan vasodilator poten dan berfungsi menghambat aktivasi platelet. Sedangkan tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) merupakan vasokonstriktor poten yang berfungsi membantu proliferasi dan aktivasi platelet. Keduanya merupakan produk metabolit asam arakidonat mayor yang pada kondisi normal aktivitasnya seimbang, namun pada HP keseimbangan kedua molekul tersebut bergeser ke arah tromboksan A<sub>2</sub>, yang berakibat terjadinya trombosis, proliferasi dan vasokonstriksi (Morrell *et al.*, 2009).

Plasma endotelin-1 (ET-1) adalah vasokonstriktor poten yang merangsang pembentukan PSMCs. Kadarnya juga meningkat dan berkorelasi dengan prognosis dan keparahan penyakit HP (Maron *et al.*, 2012, Sitbon and Morrell, 2012). Selain itu pada lumen pembuluh darah HP ditemukan peningkatan kadar serotonin plasma yang dapat merangsang proliferasi sel otot polos jantung dan merupakan pertanda penting dalam patogenesis HP (Morrell *et al.*, 2009).





**Gambar 2.5** Patofisiologi molekular hipertensi pulmonal (Morrell *et al.*, 2009)

Pada HP ditemukan kelainan pada *PASMCs* yang berakibat menurunnya rasio apoptosis:proliferasi. Kelainan tersebut meliputi perubahan aktivitas faktor transkripsi seperti faktor HIF-1 $\alpha$  dan NFAT, menurunnya ekspresi beberapa kanal K<sup>+</sup> (Kv1.5 dan Kv2.1) dan perubahan ekspresi protein anti-apoptotik, *survivin*. Kelainan tersebut dapat dilihat pada hewan coba (tikus) dan penderita HP berupa hilangnya Kv1.5, aktivasi *survivin* dan translokasi HIF-1 $\alpha$  (Morrell *et al.*, 2009). Pada HP terjadi proliferasi *PASMCs* yang berlebihan akibat respons sel terhadap faktor pertumbuhan/beta yang sedang bertransformasi. Hal itu



berkaitan dengan akumulasi sel yang berlebihan akibat kerusakan pada sistem apoptosis sel otot polos (Hassoun *et al.*, 2009).

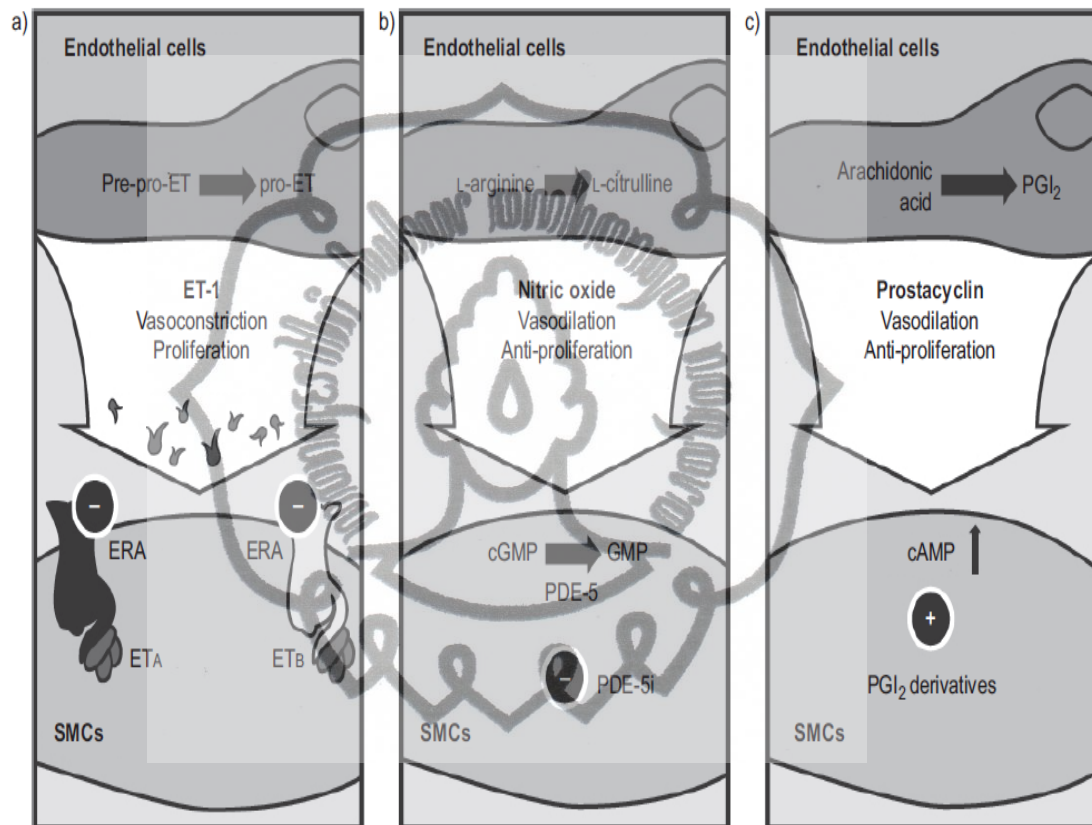
Apoptosis yang tidak berfungsi baik merupakan salah satu faktor penting yang berhubungan dengan hiperpolarisasi mitokondria, aktivasi faktor transkripsi seperti HIF-1 $\alpha$  dan NFAT, dan ekspresi *denovo* antiapoptosis protein *survivin*. Kondisi tersebut juga terjadi pada sel endotel yang berakibat disfungsi endotel (Hassoun *et al.*, 2009). Ekspresi berlebihan pada sistem kanal kalium juga berperan dalam proses terjadinya HP yang berujung pada vasokonstriksi (Morrell *et al.*, 2009).

Pada penyakit jantung bawaan (PJB) akan terjadi kelebihan volume yang akan menyebabkan perubahan pada endotel, otot polos, pengeluaran mediator inflamasi dan *growth factor* (Lacis *et al.*, 2014). *Growth factor* memiliki efek yang sama dengan mediator inflamasi guna menyebabkan *remodelling* pembuluh darah paru. Mediator yang berperan adalah PDGF, FGF, dan VEGF (Hassoun *et al.*, 2009). Peran VEGF dalam hal ini cukup besar, walaupun sebagai *remodelling* tetapi memiliki efek-efek lain yang dapat memperbaiki aliran pembuluh darah arterial paru, seperti angiogenesis dan vasodilatasi (Farkas *et al.*, 2009).

Endotel yang mengalami perubahan akan banyak mengeluarkan sitokin yang sifatnya vasokonstriksi (TxA2 dan ET-1) pembuluh darah paru dan sebaliknya akan mengalami penurunan sitokin yang bersifat vasodilator (PGI<sub>2</sub> dan NO) (Morrell *et al.*, 2009, Sitbon and Morrell, 2012). Otot polos pembuluh darah paru juga mengalami perubahan. Terjadi penurunan kanal K<sup>+</sup>, yang akan mempengaruhi penurunan apoptosis, meningkatkan proliferasi dan meningkatkan kontraksi otot pembuluh darah arterial paru (Hassoun *et al.*, 2009). Penggabungan mekanisme perubahan endotel dan otot polos arterial paru ini menyebabkan peningkatan tonus pembuluh darah arterial paru (Morrell *et al.*, 2009).

Pada hipertensi pulmonal yang diakibatkan oleh penyakit jantung bawaan, mediator inflamasi memiliki peranan yang penting. Dalam hal ini

terjadi peningkatan IL-1 $\alpha$ , IL-6, dan TNF- $\alpha$ . Semua mediator tersebut akan menyebabkan *remodelling* pada pembuluh darah arterial paru (Luan *et al.*, 2012). Mediator tersebut memiliki efek penurunan kanal K<sup>+</sup> sehingga terjadi konstriksi pembuluh darah. Kemudian IL-6 secara tidak langsung mengkatalisis pembentukan TxA<sub>2</sub> (Humbert and Ghofrani, 2016).



**Gambar 2.6** Patogenesis hipertensi pulmonal (Sitbon and Morrell, 2012)

Hipertensi pulmonal secara fisiologis akan membebani kerja dari ventrikel kanan sehingga terjadi hipertrofi ventrikel kanan dan akhirnya jatuh dalam keadaan gagal jantung kanan yang dapat menyebabkan kematian. Secara molekuler faktor-faktor penyebab hipertensi pulmonal dapat menyebabkan gagal jantung kanan. Adanya peningkatan mediator inflamasi akan menyebabkan depresi otot jantung dan menurunkan kontraktilitas (Luan *et al.*, 2012, van der Laarse *et al.*, 2015). Sedangkan penurunan VEGF dapat menyebabkan penurunan kontraktilitas jantung (Farkas *et al.*, 2009).

## 5. Peran BMPR2 pada sel endotel pulmonal (PAEC)

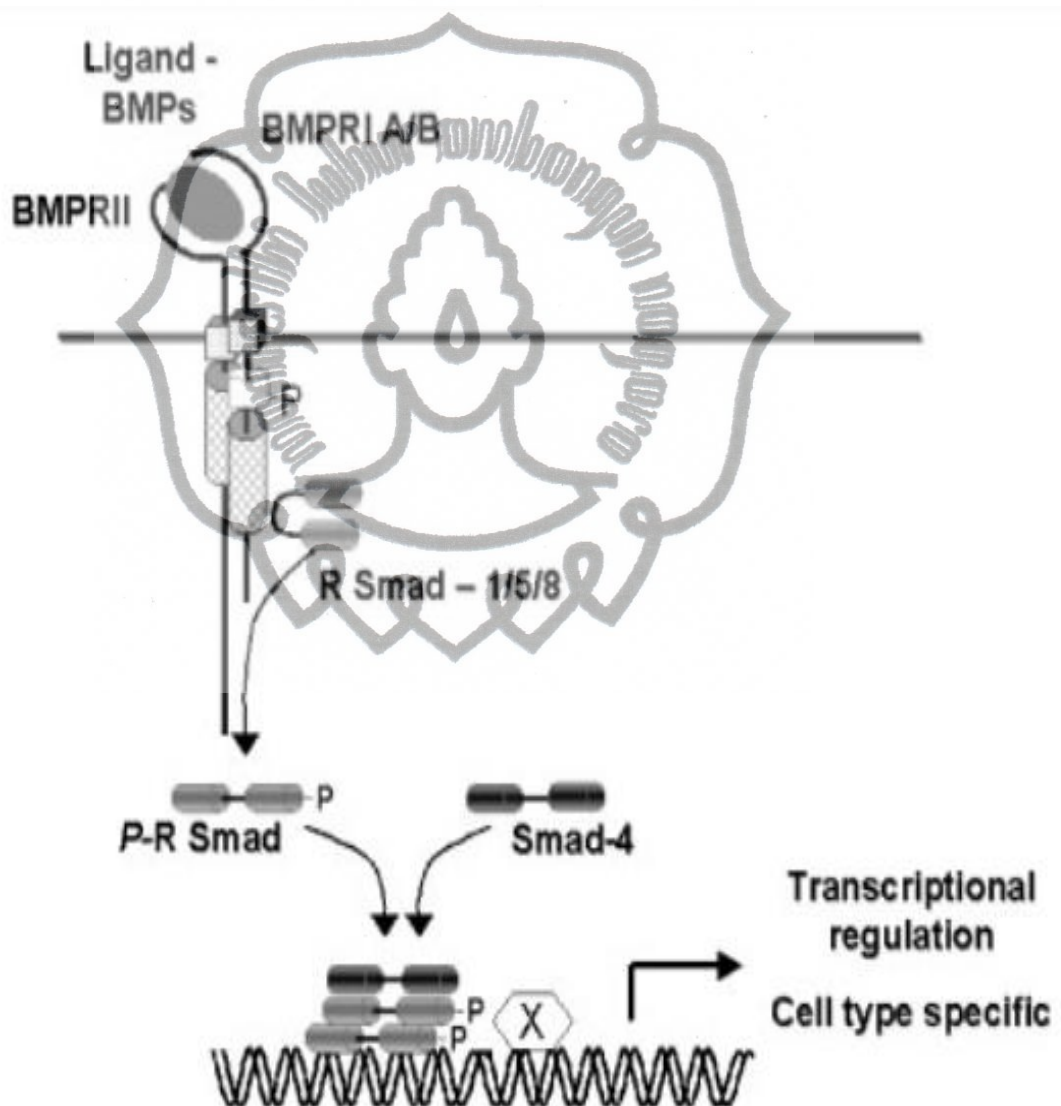
BMPR2 (*Bone Morphogenetic Protein Receptor type 2*) adalah reseptor serine/threonine kinase tipe 2 dengan panjang total 90 kb yang terletak pada kromosom 2q33 (terdiri dari 13 ekson dan 12 intron) dan mengkode 1038 asam amino. BMPR2 termasuk ke dalam golongan *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- $\beta$ ) yang diekspresikan secara terus-menerus di sel endotel pembuluh darah pulmonal (Morse JH, 2005). BMPR2 merupakan reseptor untuk protein *bone morphogenetic-9* (BMP-9) yang pengaktifan pada jalur ini pada PAEC akan memiliki efek anti-apoptosis, integritas lapis tunggal, dan merangsang sintesis matriks ekstraseluler (ECM). Sedangkan pada PSMC, BMPR2 akan memiliki efek antiproliferasi sel (Morrell *et al.*, 2016). Mutasi pada BMPR2 akan menyebabkan terjadinya *remodelling* pada proliferasi endotel vaskular paru melalui mekanisme anti-apoptosis, inflamasi, dan trombosis (Majka *et al.*, 2011).

### a. Efek parakrin BMPR2

Ikatan BMPR2 dengan ligannya (BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMP9, BMP10) memicu fosforilasi BMPR2 dan mengaktifasi sinyal SMAD. SMADs kemudian membentuk kompleks SMAD4 yang mengaktifkan VE-Cadherin (menjaga integritas *monolayer*). BMPR2 akan tersedia dalam jumlah yang adekuat dan dapat berfungsi dengan baik dalam kondisi normoksia. Aktivasi, fungsi, dan kadar BMPR2 akan berkurang ketika terjadi kondisi hipoksia di dalam tubuh melalui mekanisme penghambatan ekspresi BMPR2 itu sendiri dan penghambatan fosforilasi protein SMAD1/5/8 sehingga tidak terjadi ekspresi gen BMPR2 di dalam sel (Hartopo AB *et al.*, 2019).

*Bone Morphogenetic Protein Receptor type 2* berperan mengatur pertumbuhan, diferensiasi, dan maturasi tulang dan kartilago. Protein reseptor ini bekerja dengan cara menjangkau seluruh membran sel, di mana seluruh bagian sel dapat menerima dan mentransmisikan sinyal sehingga terjadi proses proliferasi dan proses apoptosis secara

seimbang. Jalur transduksi sinyal TGF- $\beta$ /BMPR/BMP berperan dalam proses proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis pada sel endotel arteri pulmonal dan sel-sel otot polos (Wei M *et al.*, 2012). Pensinyalan BMP berperan dalam memelihara *conotruncal ridge* dan pembentukan katup semilunaris. Aktivasi TGF- $\beta$  dan *activin pathway* mempengaruhi sinyal BMP secara *in vitro* (Délot EC *et al.*, 2003).



**Gambar 2.7** Jalur pensinyalan yang diperantarai BMPR2 dalam kondisi fisiologis (Orlova VV *et al.*, 2016).

*Bone Morphogenetic Protein Receptor type 2* akan berikatan dengan ko-reseptor tipe 1 untuk membentuk kompleks heterometrik. Kompleks ini merangsang reseptor tipe 2 untuk memfosforilasi reseptor tipe 1. Proses tersebut kemudian memfosforilasi sinyal transduksi target secara *canonical* dan *non-canonical*. Jalur *canonical* terjadi ketika R-SMAD (SMAD1/5/8) terfosforilasi dan membentuk kompleks dengan co-SMAD (SMAD4) untuk masuk ke dalam nukleus.

Di dalam nukleus, kompleks tersebut berikatan dengan BRE (*BMP Respond Element*) dan menranskripsi *inhibitor of DNA Binding 1,2,3* (ID1,2,3) untuk menjalankan fungsi regulasi migrasi, proliferasi, dan apoptosis sel (Andruska A *et al.*, 2018). Jalur SMAD4-independent berkaitan dengan jalur SMAD8 sehingga terjadi mutasi gen SMAD9 (gen yang meng-*encode* SMAD8) dan menurunkan maturasi mikro RNA (Hartopo AB *et al.*, 2019).

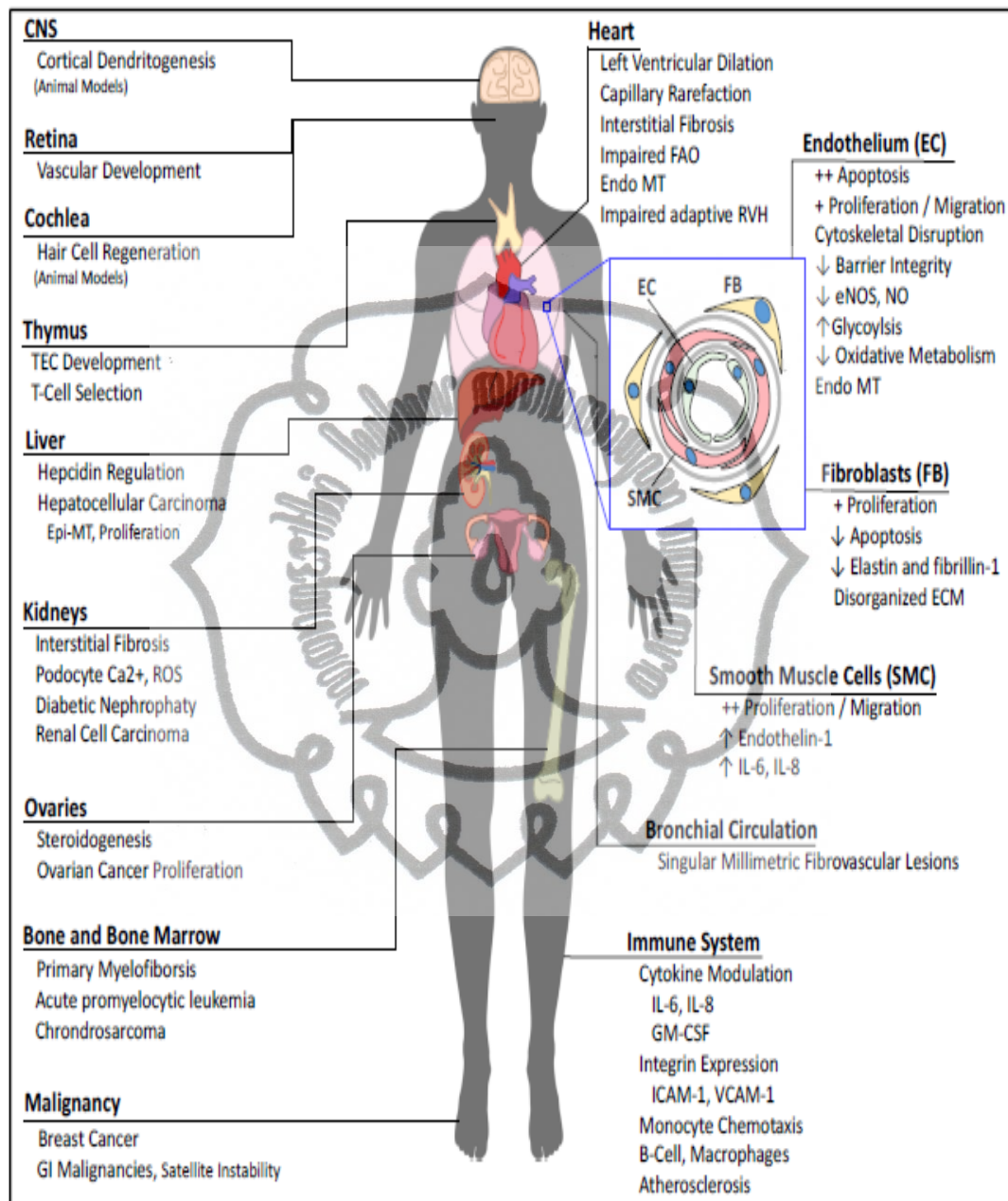
Jalur *non-canonical* teraktivasi oleh BMPR2 terhadap *Extracellular Signal Regulated Kinase* (ERK), p38 *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), Lin II, I $\kappa$ B, Mec-3 *domain Kinase* (LIMK), NOTCH, dan jalur Wnt.

Jalur *non-canonical* diregulasi secara kompleks oleh Endoglin, pseudoreseptor (BMP *Activin Membrane-Bound Inhibitor* [BAMBI]), dan antagonis BMP (Noggin, Gremlin-1, dan Chordin). Protein SMAD dapat diinhibisi oleh SMAD6 dan SMAD7, sedangkan SMAD6 dapat ditingkatkan melalui fosfo-SMAD1/5/8 (Andruska A *et al.*, 2018).

Penginduksian aktivitas reseptor BMPR2 dan protein pensinyalan di bawahnya dapat berperan dalam perbaikan disfungsi endotel melalui jalur perbaikan integritas endotel (Mueller M *et al.*, 2016). Hipoksia dapat menghambat pensinyalan jalur BMPR2 melalui 1) penghambatan ekspresi gen BMPR2 dan 2) penghambatan fosforilasi protein *downstream*-nya yaitu SMAD 1/5/8 (Takahashi *et al.*, 2007).



## b. Efek defisiensi BMPR2

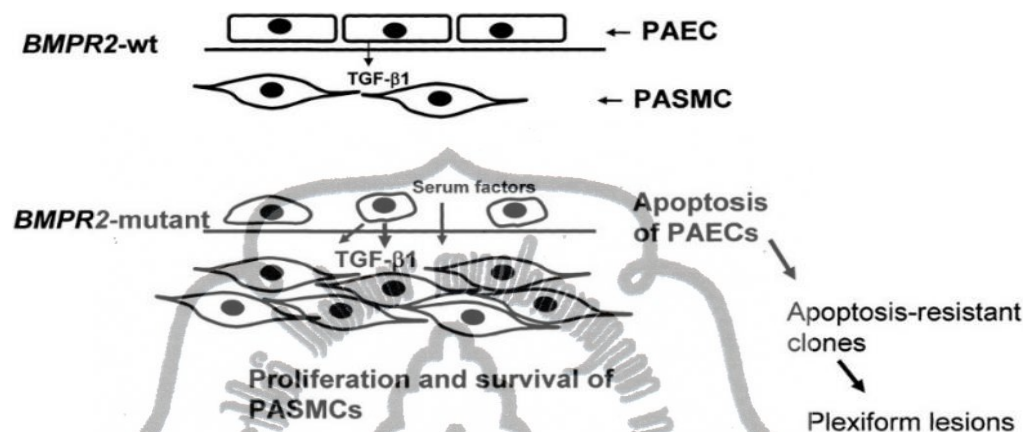


**Gambar 2.8** Manifestasi defisiensi BMPR2 pada berbagai sistem organ  
(Andruska A *et al.*, 2018)

## 1) Efek pada sel otot polos dan sel endotelial

Dengan adanya defisiensi BMPR2, produksi ID1 dan ID2 akan ditekan secara keseluruhan tanpa dimediasi BMP4. BMP4

dan BMP7 akan dibatasi sehingga produksi Endotelin-1 meningkat dan terjadi vasokonstriksi. Peningkatan Endotelin-1 juga akan menurunkan ekspresi BMPR2 sehingga memperberat kondisi vasokonstriksi (Andruska A *et al.*, 2018).



**Gambar 2.9** Mutasi BMPR2 merangsang apoptosis endotelial dan proliferasi sel otot polos (Orlova VV *et al.*, 2016).

Penghambatan sinyal BMPR2 di sel endotel akan meningkatkan kadar HMGA1, SNAI1, Slug, Acta2, SM22 $\alpha$ , dan phospho-vimentin. Peningkatan sitokin tersebut mengaktifasi *Endotelial to Mesenchymal Transition* (EndoMT) dan menyebabkan lesi oklusif pada tunika intima (Andruska A *et al.*, 2018).

## 2) Efek pada sistem kardiovaskular

Pada kasus penyakit jantung bawaan (PJB) yang tidak disertai hipertensi pulmonal (HP) juga ditemukan adanya peran dari BMPR2. Mutasi/defisiensi BMPR2 tidak selalu menyebabkan hipertensi pulmonal. Gangguan pensinyalan atau mutasi BMPR2 berkaitan dengan peran jalur BMP selama proses embriogenesis jantung dan pembuluh darah (Liu D *et al.*, 2016). Pensinyalan BMP2 berperan dalam migrasi, integrasi, dan diferensiasi sel-sel miokardium. Penyakit jantung bawaan dihubungkan dengan defisiensi ekspresi dan pensinyalan BMPR2 (Andruska A *et al.*, 2018).

Mutasi BMPR2 atau SMAD6 yang menghambat jalur BMP2 menyebabkan gangguan migrasi dan integrasi sel; gangguan diferensiasi sel miokard dan bantalan endokardium; ukuran ventrikel yang mengecil dan menipis; gangguan pembentukan katup-katup jantung; dan hilangnya trabekula miokard. SMAD6 adalah antagonis sinyal BMP pada *endotracheal ridge* yang dimediasi BMPR2. Efek lain dari mutasi BMPR2 terhadap jantung adalah penurunan indeks *stroke volume*, indeks kardiak, dan fraksi ejeksi ventrikel kanan (Wei M *et al.*, 2012).

Tipe defek pada penyakit jantung bawaan tidak berhubungan dengan laju mutasi BMPR2 (Liu D *et al.*, 2016). Apabila sinyal BMP terlalu berlebihan, pada kasus mutasi SMAD6, akan terjadi hiperplasia. Sedangkan bila sinyal BMP tidak adekuat, pada kasus mutasi BMP6 dan BMP7, akan terjadi hipoplasia. Penelitian pada tikus mutan SMAD6, gangguan sinyal BMP menyebabkan hiperplasia katup, defek pemisahan ventrikel, dan defek pembuluh darah keluar jantung (Délort EC *et al.*, 2003).

### 3) Efek pada pembuluh darah pulmonal (arteri pulmonalis)

Mutasi BMPR2 merupakan penyebab genetik tersering pada hipertensi pulmonal (HP) yang berkaitan dengan penurunan sinyal BMP. Hingga saat ini terdapat  $\pm 350$  jenis mutasi BMPR2 diketahui menyebabkan HP (Suzuki H *et al.*, 2017). Mutasi BMPR2 ditemukan pada 75% kasus *Familial Pulmonary Arterial Hypertension* (FPAH) dan 25% kasus HP lainnya. Pada kasus FPAH, juga dilaporkan terdapat mutasi ALK1, ACVRL1, TBX4, dan Endoglin (ENG). Pada kasus HP akibat PJB, sebanyak 60% disebabkan oleh mutasi BMPR2 yang berkaitan dengan mutasi ALK1 (Hartopo AB *et al.*, 2019). Mutasi BMPR2 merusak struktur, menurunkan jumlah gen dalam sel, dan menghambat BMPR2 mencapai permukaan sel sehingga ekspresi pada permukaan sel menurun (Délort EC *et al.*, 2003). Kondisi tersebut

mengakibatkan sel tidak dapat menerima dan mentransmisikan sinyal. Gangguan transmisi sinyal akan meningkatkan proses proliferasi sel tanpa diimbangi proses apoptosis sel. Ketidakseimbangan rasio proliferasi/apoptosis sel menyebabkan penyempitan diameter pembuluh darah pulmonalis dan peningkatan *Pulmonal Vascular Resistance* (PVR), tekanan di ventrikel kanan, serta arteri pulmonalis (Pascall E *et al.*, 2018).

Pada kasus HP genetik/*familial*, HP idiopatik, dan HP akibat PJB, telah teridentifikasi 6 jenis mutasi BMPR2. Gangguan transduksi sinyal akibat mutasi BMPR2 menyebabkan hiperplasia PAECs (*Pulmonary Arterial Endothelial Cells*) dan sel-sel otot polos sehingga terbentuk lesi-lesi pleksiform sehingga terjadi HP. Ekspresi BMPR2 yang lebih rendah pada kasus PJB yang tidak disertai dengan HP (Atkinson *et al.*, 2002). Proliferasi PAECs juga meningkat akibat teraktivasinya jalur pensinyalan Wnt. Jalur Wnt diaktivasi oleh terdegradasinya  $\beta$ -Catenin.  $\beta$ -Catenin berfungsi sebagai penyusun struktur *junction* dan berperan dalam pensinyalan (Morse JH, 2005).

Jenis mutasi pada BMPR2 adalah mutasi *nonsense*, *missense* (terdiagnosis lebih cepat dengan *survival rate* yang lebih rendah), dan *frameshift*. Pada penelitian terhadap 400 kasus HP akibat mutasi BMPR2, 70% kasus disebabkan oleh mutasi *nonsense* atau *frameshift* (Suzuki H *et al.*, 2017). Pada kelompok PJB-HP ditemukan adanya mutasi BMPR2 dengan tipe *missense* pada ekson 2,3,5, dan 11 (Robert *et al.*, 2004). Mutasi pada ekson 8 BMPR2 diketahui menyebabkan AVSD (*Atrioventrikular Septal Defect*). Telah diketahui adanya mutasi Val348Ile pada BMPR2 yang menyebabkan hipertensi pulmonal (Wel *et al.*, 2012).

Akibat mutasi BMPR2 dilaporkan dapat menyebabkan kenaikan rerata tekanan arteri pulmonalis (*mean Pulmonary Arterial Pressure*) dan PVR; penurunan indeks kardiak; kurang

beresponnya pasien terhadap terapi vasodilator akut; dan kemungkinan pasien untuk menjalani transplantasi paru (Giannotta M *et al.*, 2013). Hipertensi pulmonal yang terjadi di usia dewasa dikaitkan dengan anomali jalur *canonical*: SMAD8, Laveolin-1, GDF2/BMP9, dan ALK1 (Andruska A *et al.*, 2018).

#### 6. Peran VE-Cadherin pada Integritas Satu Lapis Sel Endotel

VE-Cadherin merupakan protein yang berfungsi menjaga integritas sel endotel. Peningkatan jumlah protein ini menunjukkan integritas endotel yang baik. VE-Cadherin dikenal juga sebagai CD144 yang merupakan penyusun *adherens junctions* antarsel endotel (Giannotta *et al.*, 2013). Protein ini berperan penting dalam menjaga dan memperbaiki integritas vaskular melalui serangkaian mekanisme kompleks yang melibatkan pengaturan sitoskeleton sel endotel dan modulasi transkripsi gen (Sanabria *et al.*, 2017). VE-Cadherin dapat dirangsang produksinya melalui aktivasi protein SMAD 4 oleh BMPR2 sehingga dapat menjaga integritas sel endotel (Giannotta *et al.*, 2013). Kerusakan pada integritas endotel merupakan salah satu penyebab mekanisme terjadinya disfungsi endotel (Morrell *et al.*, 2016).

#### 7. Peran Caspase3 pada Regulasi Apoptosis Sel

Caspase3 merupakan endoprotease yang berfungsi sebagai efektor dengan cara memecah substrat sehingga mengubah morfologi dan biokimia sel-sel yang mengalami apoptosis. Apoptosis adalah kematian sel terprogram yang dimediasi oleh aktivasi protease intrasel yaitu protein Caspase3. Protein Caspase3 melepaskan endonuklease aktif intrasel yang kemudian memotong rantai DNA sehingga proses sintesis protein sel terganggu. Protein Caspase3 diaktifkan oleh regulator apoptosis BAX. Pada kondisi hipoksia, HIF-1 $\alpha$  menstimulus protein p53 menjadi aktif dan merangsang produksi BAX (Sendoel *et al.*, 2014).

Protein Caspase3 yang merupakan singkatan dari *cystein-aspartic proteases* juga menyebabkan fragmentasi inti sel yang berujung pada



kematian sel. Bukti sebelumnya menyebutkan bahwa lepasnya sel endotel dari membran basalis dapat memicu proses apoptosis. BMPR2 diketahui dapat membantu pembentukan integritas lapis tunggal pada sel endotel dan merangsang SMAD untuk menghambat jalur p38 MAPK sehingga diduga dapat mencegah apoptosis (Poher *et al.*, 2009).

#### 8. Peran TNF- $\alpha$ pada Induksi Proliferasi Sel

*Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) merupakan mediator utama inflamasi. Produksinya meningkat saat terjadi proses peradangan. TNF- $\alpha$  bersama dengan IL-1 akan merangsang sel endotel untuk memproduksi siklooksigenase (COX), yang juga menyebabkan peningkatan produksi prostasiklin (Selvasandran *et al.*, 2017). TNF- $\alpha$  pada kasus hipertensi pulmonal dapat menurunkan BMPR2 secara *in vitro* dan *in vivo*. TNF- $\alpha$  berkaitan dengan berkurangnya ekspresi BMPR2 dan pembelahan BMPR2 di dalam sel-sel pembuluh darah, serta berperan dalam proses proliferasi yang tidak tepat (Morrel *et al.*, 2016). Penurunan kadar BMPR2 juga ditemukan pada sel-sel endotel paru. TNF- $\alpha$  meningkatkan pelepasan domain ekstraseluler BMPR2 akibat pengurangan rantai BMPR2 pada sel otot polos aorta. Peningkatan TNF- $\alpha$  diketahui berkaitan dengan nyeri, kelelahan, dan kecemasan (Ranganath *et al.*, 2012).

Stimulus *Tumor Necrosis Factor* (TNF- $\alpha$ ) terhadap PAEC dapat menurunkan ekspresi BMPR2 melalui miRNA dan memperpanjang aktivasi p38-MAPK2 dengan meningkatkan translasi *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) mRNA. Aktivasi p38-MAPK2 kemudian meningkatkan ekspresi protein *Caspase3*. TNF- $\alpha$  meningkatkan sekresi *A Disintegrin and Metalloprotease* (ADAM) 10 dan 17 yang kemudian memecah BMPR2 dan melepaskan ektodomain sebagai jebakan ligan ekstraseluler. Hilangnya ekspresi atau sinyal BMPR2 memfosforilasi Src dan pensinyalan BMP6 yang dimediasi ActR-IIA/ALK2 sehingga terjadi peningkatan NOTCH dan proliferasi sel (Andruska A *et al.*, 2018).

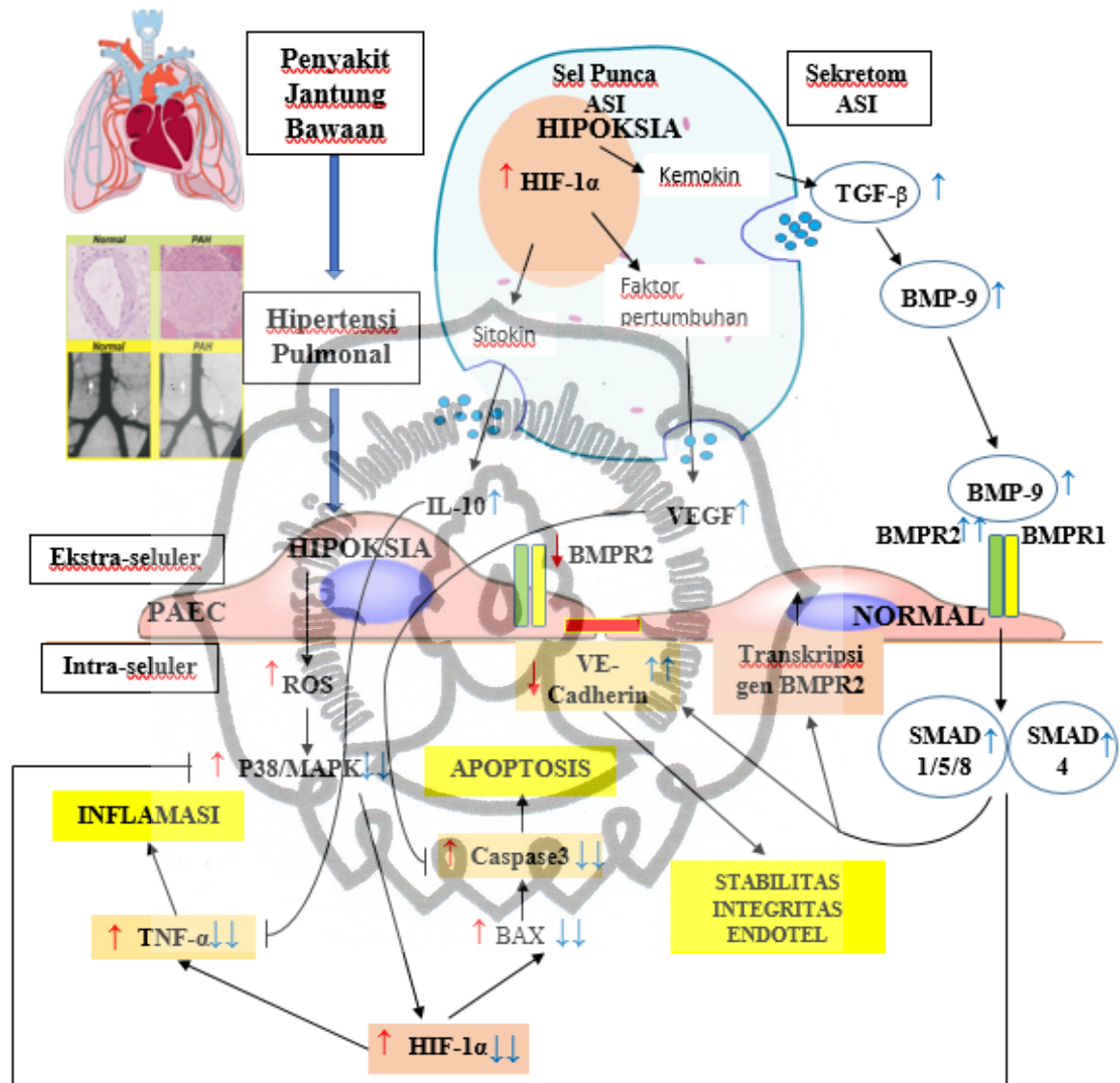
#### 9. Peran HIF-1 $\alpha$ terhadap neo-angiogenesis pada hipoksia seluler

Sel endotel hipoksia akan mengekspresikan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) reseptor  $\alpha$  dan  $\beta$  yang memediasi ekspresi VEGF pada sel perivaskuler (Rezza *et al.*, 2014). Pada kondisi hipoksia seluler akan mengaktivasi *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT-3), suatu protein sitoplasmik yang bila terfosforilasi akan membentuk dimer dan translokasi ke dalam inti sel yang akan mengaktivasi sel target terutama VEGF (Muellner *et al.*, 2010).

*Hypoxia Inducible Factor 1* merupakan heterodimer terdiri dari dua subunit : HIF-1 $\alpha$  yang bersifat labil dan HIF-1 $\beta$  yang cenderung stabil. HIF-1 $\alpha$  pada keadaan normoksia akan mengalami degradasi terus menerus oleh proteosom. HIF-1 $\alpha$  pada kondisi hipoksia akan terakumulasi dalam inti sel dan berikatan dimer dengan HIF-1 $\beta$  untuk mengaktifkan lebih dari 70 gen yang lain (Guadall *et al.*, 2011).

Patofisiologi hipertensi pulmonal terjadi akibat ketidakseimbangan proliferasi dan apoptosis sel endotel yang diikuti gangguan integrasi monolayer sehingga mengakibatkan penebalan dan rigiditas sel endotel vaskuler. Proses remodelling sel endotel ini umumnya dipicu oleh kondisi hipoksia jaringan yang ditandai sekresi protein HIF-1 $\alpha$  (Dal Monte *et al.*, 2011). Jalur pensinyalan protein ini akan diteruskan melalui transkripsi genetik protein seluler untuk menghasilkan berbagai sitokin, kemokin, faktor pertumbuhan diantaranya TNF- $\alpha$ , BMPR2, VE-Cadherin, Caspase3, VEGF, TGF- $\beta$ . Pada beberapa penelitian sebelumnya telah ditunjukkan adanya peningkatan kadar marker HIF-1 $\alpha$  pada kondisi *remodelling* endotel pulmonal pada keadaan seperti *acute respiratory distress syndrome*, hipertensi pulmonal, dan edema paru (Dal Monte *et al.*, 2011).

## B. Kerangka Berpikir



Keterangan:

■ Variabel yang diukur

■ Jalur disfungsi endotel

↓↓ menurun saat dilakukan perlakuan

↑ naik saat diinduksi hipoksia

—| menghambat

→ mengaktivasi

↑ naik saat dilakukan perlakuan

↓ menurun saat diinduksi hipoksia

**Gambar 2.10.** Kerangka teori Peranan Sel Punca Air Susu Ibu pada Perbaikan

Homeostasis Paru. BMPR2: *bone morphogenic receptor type 2*;

TNF-α: *Tumor necrosis factor-α*; VE-Cadherin: *vascular*

*endothelial-cadherin*; Caspase3: *cysteine-aspartic proteases*.

Keterangan gambar :

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa di dalam sel ASI terdapat sel epitelial progenitor (Cregan *et al.*, 2007) dengan karakteristik mirip sel punca mesenkimal (Hassiotou *et al.*, 2012). SP-ASI dapat berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel progenitor yaitu sel neuron, sel epitelial, hepatosit, sel beta pankreas, osteoblas, kondrosit, dan adiposit (Hassiotou *et al.*, 2012, Hosseini *et al.*, 2014). Sel dewasa tersebut sebelumnya berasal dari jaringan ektoderm (neuroektoderm dan mammoektoderm), mesoderm, dan endoderm sehingga dapat disimpulkan SP-ASI bersifat *pluripotent* karena dapat berdiferensiasi menjadi seluruh sel dewasa (Hassiotou *et al.*, 2012).

Disfungsi endotel dapat disebabkan oleh proses inflamasi, pemberian tekanan, dan hipoksia. Kondisi hipoksia akan menyebabkan kerusakan mitokondria (Pak *et al.*, 2007). Hipoksia akan mengaktivasi protein *hypoxia inducible factor 1* (HIF-1). HIF-1 akan menstabilkan p53 kemudian mengaktifkan protein pro-apoptotic lain, BAX. Aktivasi BAX akan menginduksi apoptosis melalui jalur sinyal protein *Caspase3* (Sendoel and Hengartner, 2014, Greijer and Van der Wall, 2004). Hipoksia juga akan menginduksi terbentuknya ROS yang kemudian mengaktivasi jalur p38 MAPK (Weerackody *et al.*, 2009). Pensinyalan sel jalur BMPR2, melalui protein efekturnya, SMAD, akan menginaktivasi p38 MAPK yang memiliki pengaruh dalam induksi dan pengaktifan HIF-1 $\alpha$  (Pak *et al.*, 2007). Sehingga pada kondisi hipoksia, penginduksian sinyal BMPR2 akan mencegah apoptosis sel dan menghambat produksi ROS. Sel punca ASI memiliki efek parakrin dalam penginduksian sinyal BMPR2 sehingga dapat membantu memperbaiki disfungsi endotel.

Sel punca memiliki efek parakrin terkait kemampuannya dalam menghasilkan sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan. Salah satu protein yang dihasilkan oleh sel punca adalah BMP, dimana BMP memiliki peran utama dalam memelihara pluripotensi sel punca (Morikawa *et al.*, 2016, Zhang and Li, 2005). BMP9 memiliki peran dalam anti-apoptosis dan menjaga integritas satu lapis sel endotel. BMP9 akan berikatan dengan BMPR2 untuk peran anti-apoptosis sel endotel (Morrell *et al.*, 2016). Ikatan BMPR2 dengan BMP9 akan menyebabkan



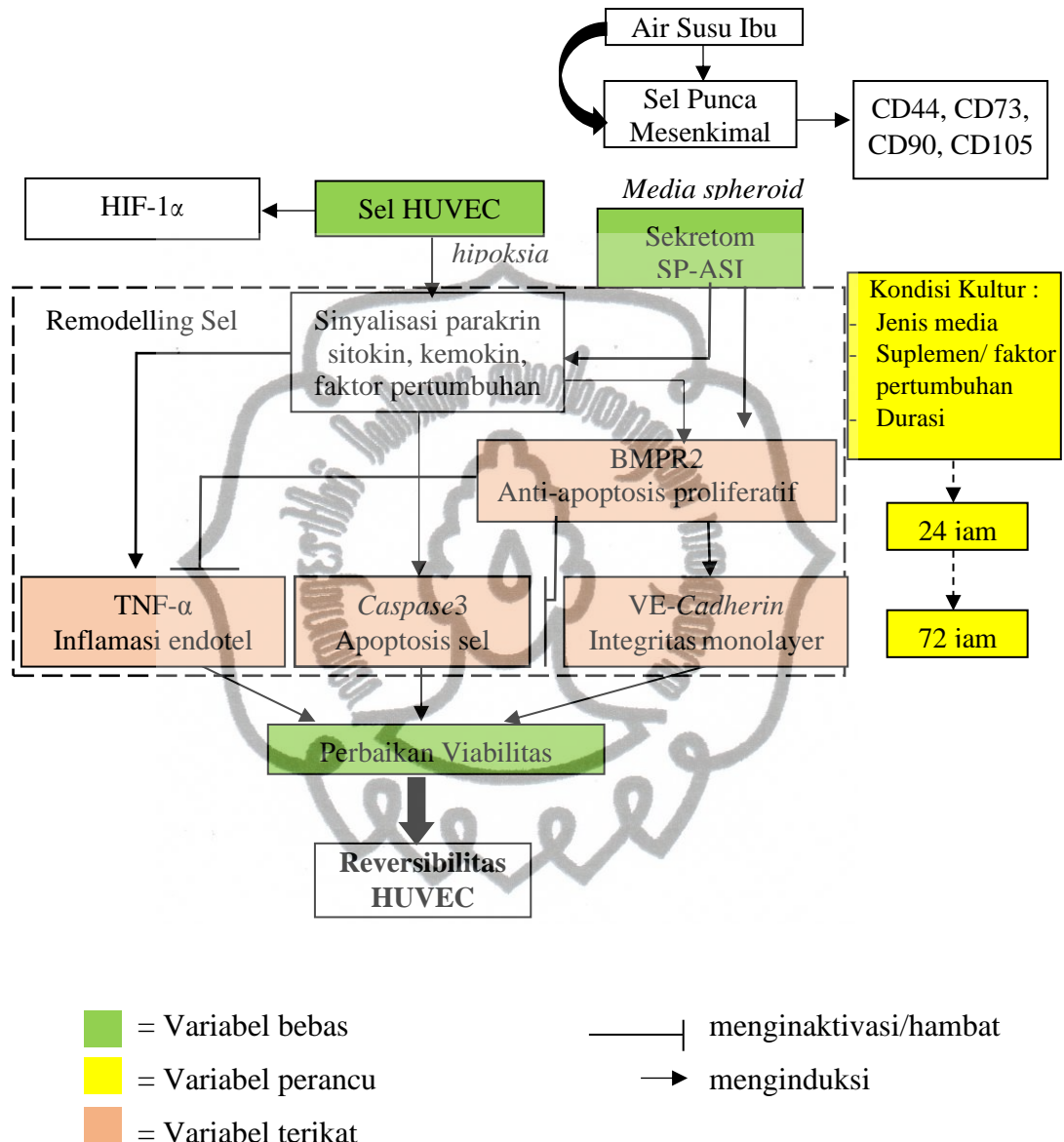
protein pensinyalan sel yaitu SMAD 1/5/8 dan SMAD 4 (SMADs) menjadi aktif sehingga menghambat kinerja p38 MAPK. Protein p38 MAPK berperan dalam mengaktifkan HIF-1 $\alpha$  saat respon hipoksia. HIF-1 $\alpha$  kemudian memodulasi sintesis gen respon hipoksia termasuk pengaktifan p53 dan jalur *Caspase* yang menyebabkan apoptosis. Komplek SMADs aktif akan bertranslokasi ke nukleus bersama dengan faktor transkripsi akan mengekspresikan gen BMPR2 di membran sel. Peningkatan jumlah BMPR2 di membran sel akan memicu sintesis kembali BMPR2 oleh ikatan BMP9 sehingga jumlah BMPR2 akan meningkat (Morrell *et al.*, 2016). Protein SMAD4 yang aktif melalui jalur BMPR2 dapat memicu produksi *VE-Cadherin* sehingga dapat menjaga integritas sel endotel (Morrell *et al.*, 2016). Proses ini yang menjelaskan reversibilitas hipertensi pulmonal melalui jalur BMP9 pada hipertensi pulmonal dengan mutasi BMPR2 maupun karena kerusakan yang diinduksi faktor lain (Long *et al.*, 2015).

Kondisi hipoksia pada sel punca justru membantu dalam proliferasi sel punca serta untuk diferensiasi sel (Kusuma *et al.*, 2014, Abdollahi *et al.*, 2011). Efek immunosupresif sel punca ini dikarenakan sel punca dapat memproduksi sitokin anti-inflamasi IL-10 yang dapat menghambat produksi TNF- $\alpha$ , sitokin pro-inflamasi (Brunel *et al.*, 2016). Penghambatan tiga mekanisme utama disfungsi endotel yaitu anti-apoptosis, anti-inflamasi, dan pembentukan integritas endotel. Efek hipoksia pada sel endotel arteri pulmonalis (PAEC) dapat memicu proliferasi PAEC (Porter *et al.*, 2014). Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa hipoksia dapat menghambat ekspresi protein BMPR2 sehingga mengganggu jalur *downstream* dibawahnya (Takahashi *et al.*, 2007).

SP-ASI diasumsikan dapat memberikan efek yang maksimal pada sel endotel dalam kondisi hipoksia. SP-ASI yang berdiferensiasi menjadi sel endotel diasumsikan memiliki integritas satu lapis yang baik dengan mengekspresikan BMPR2. SP-ASI juga diasumsikan memiliki efek parakrin yang sangat penting untuk perbaikan disfungsi endotel, yaitu melalui efek BMP9 (anti-apoptosis dan penurunan produksi ROS) dan efek VEGF (penghambatan produksi ET-1).



### C. Kerangka Konseptual



**Gambar 2.11.** Kerangka Konseptual Peranan Sel Punca Air Susu Ibu pada Perbaikan Homeostasis Paru. BMPR2: *bone morphogenic receptor type 2*; TNF- $\alpha$ : *Tumor necrosis factor- $\alpha$* ; VE-Cadherin: *vascular endothelial-cadherin*; Caspase3: *cysteine-aspartic proteases*.

Keterangan gambar:

ASI mengandung sel punca mesenkimal yang ditandai oleh karakteristik penanda permukaan CD44, CD73, CD90, dan CD105 (Tang *et al.*, 2019). Penelitian ini menumbuhkan sel punca ASI dalam media *Mammocult*<sup>TM</sup> untuk mengaktivasi proliferasi sel punca, hal ini dibuktikan dengan pemeriksaan *flowcytometry* kadar marker penanda permukaan spesifik terhadap sel punca mesenkimal. Selanjutnya sel punca ASI ditumbuhkan dalam media standard bebas serum (*media spheroid*) untuk merangsang sekresi sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan lebih maksimal hingga pasase ketiga. Jumlah pasase sangat menentukan kemurnian sel punca dan kemampuan *pluripotent* yang dihasilkan, dikatakan optimal bila < 10 pasase.

Kemampuan sel punca ASI (SP-ASI) berdiferensiasi menjadi tiga lapis pembentuk jaringan menunjukkan sifat pluripotensinya yang diduga sangat bermanfaat untuk regenerasi seluler pada berbagai penyakit degeneratif stadium akhir melalui mekanisme sinyalisasi parakrin (Dell Aversana *et al.*, 2019). Penelitian ini menggunakan sekretom SP-ASI melalui proses pemecahan dan pengangkatan sel sehingga didapatkan supernatan. Untuk memaksimalkan sekresi sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan yang diharapkan, diberikan perlakuan hipoksia pada kultur sel punca pada pasase keempat selama 72 jam inkubasi.

Uji eksperimen ini menggunakan bahan dasar sel endotel HUVEC yang dikondisikan menyerupai hipertensi pulmonal. Rekombinan terbaik yang dapat mewakili endotel pembuluh darah pulmonal yaitu sel endotel talipusat (HUVEC) (Siow CM, 2012). Perlakuan hipoksia pada tekanan O<sub>2</sub> 1%, CO<sub>2</sub> 10% lingkungan mikro kultur primer sel endotel selama 24 jam inkubasi mampu menginduksi terjadinya *remodelling* melalui jalur aktivasi HIF-1 $\alpha$ . Untuk membuktikan telah terjadi *remodelling* tingkat seluler dilakukan pemeriksaan imunohistokimia ekspresi gen HIF-1 $\alpha$ .

Selanjutnya dilakukan intervensi pemberian sekretom SP-ASI hipoksia pada HUVEC yang telah dihipoksiakan dan mengalami *remodelling* melalui aktivasi jalur HIF-1 $\alpha$ . Proses sinyalisasi parakrin dari sitokin, kemokin, dan

faktor pertumbuhan dinilai pada inkubasi 24 jam dan 72 jam. Perbaikan fungsi mitokondria dinilai menggunakan biomarker BMPR2, VE-Cadherin, Caspase3, dan TNF- $\alpha$  secara kuantitatif menggunakan teknik ELISA. Untuk mendapatkan hasil yang *reliable* digunakan sampel *triplicate* pada setiap pemeriksaan. Kondisi lingkungan mikro sel punca dijaga seoptimal mungkin dengan memperhatikan sterilitas dari kontaminan, jenis media yang digunakan, suplemen/faktor pertumbuhan yang diberikan, dan durasi penggantian media. Hal ini dilakukan untuk menekan bias akibat ketidakseimbangan lingkungan mikro yang mempengaruhi viabilitas HUVEC.

Viabilitas sel endotel didapatkan melalui foto sel menggunakan mikroskop *inverted* dan hitung sel secara manual untuk menilai laju pertumbuhan sel. Selanjutnya kadar protein intraseluler dan ekstraseluler diukur menggunakan metode Bradford untuk memprediksi proses metabolisme yang terjadi tingkat seluler pada setiap perlakuan. Diharapkan intervensi ini dapat memperbaiki fungsi mitokondria sehingga proliferasi sel meningkat signifikan disertai kadar biomarker yang menunjang proses reversibilitas PAEC.

#### D. Hipotesis Penelitian

1. Pemberian sekretom SP-ASI hipoksia mampu memperbaiki fungsi homeostasis *HUVEC-4* hipoksia dalam anti-apoptosis proliferaatif dengan parameter peningkatan kadar BMPR2.
2. Pemberian sekretom SP-ASI hipoksia mampu memperbaiki fungsi homeostasis *HUVEC-4* hipoksia dalam memicu stabilitas integritas lapis tunggal dengan parameter peningkatan VE-Cadherin.
3. Pemberian sekretom SP-ASI hipoksia mampu memperbaiki fungsi homeostasis *HUVEC-4* hipoksia dalam menghambat apoptosis sel dengan parameter penurunan Caspase3.
4. Pemberian sekretom SP-ASI hipoksia mampu memperbaiki fungsi homeostasis *HUVEC-4* hipoksia dalam menghambat inflamasi endotel dengan parameter penurunan TNF- $\alpha$ .