

Stem Cell Retina: Harapan Baru untuk Mengatasi Kebutaan?

Meta W. Djojosubroto

Hôpital Ophtalmique Jules Gonin, Avenue de France 15
1044 Lausanne, Switzerland

Retinitis pigmentosa (RP) dan degenerasi makular akibat penuaan (DMP) merupakan dua jenis kebutaan yang disebabkan oleh kelainan pada sel-sel fotoreseptor. Hingga saat ini belum ditemukan cara pengobatan yang paling sesuai untuk mengatasi kedua kondisi kebutaan tersebut. Walaupun demikian, penelitian telah menunjukkan kemajuan dalam pengembangan beberapa terapi yang dapat digunakan. Salah satunya adalah dengan menggunakan *stem cells* yang ditransplantasikan pada retina.

Penyakit degenerasi dan trauma pada sistem saraf sentral yang terjadi pada otak, retina, maupun sumsum tulang belakang merupakan sumber utama kelumpuhan jangka panjang. Pada retina, degenerasi dapat terjadi pada sel-sel fotoreseptor, yang dapat menyebabkan antara lain retinitis pigmentosa (RP). RP adalah penyakit mata keturunan. Pada pasien RP, degenerasi sel fotoreseptor terjadi secara bertahap menyebabkan hilangnya penglihatan secara progresif. Jumlah penderita RP diperkirakan memiliki rasio 1:4000 dan gejala klinis umumnya timbul pada usia 20-30 tahun. Selain RP, penyakit degenerasi retina lain yang menyebabkan hilangnya penglihatan sentral secara progresif adalah degenerasi makular akibat penuaan (DMP). DMP umumnya terjadi pada usia 60-70 tahun, dan merupakan penyebab utama kebutaan pada orang-orang yang berusia lebih dari 55 tahun. Sampai saat ini belum ada metode penyembuhan RP maupun DMP. Walaupun demikian, para peneliti telah berhasil mengembangkan beberapa metode pengobatan yang menjanjikan, antara lain dengan *artificial retinal implants*¹, terapi gen^{2,3}, transplantasi *stem cell*⁴, maupun pemberian nutrisi khusus^{5,6}.

STEM CELLS

Stem cells adalah sel-sel yang memiliki potensi tinggi untuk berkembang menjadi berbagai jenis sel dalam tubuh. Pada dasarnya, *stem cells* berfungsi sebagai salah satu mekanisme perbaikan tubuh. Dengan kemampuan membelah diri yang dapat dikatakan tak terhingga, *stem cells* dapat menggantikan sel-sel yang rusak atau mati sepanjang hidup suatu organisme. Jika suatu *stem cell* membelah, sel anakan

yang baru memiliki potensi untuk tetap menjadi *stem cell* atau menjadi suatu jenis sel dengan fungsi spesifik, misalnya sel otot, sel darah, atau sel otak.

Berdasarkan asalnya, *stem cell* dibedakan menjadi *stem cell embrio* dan *stem cell dewasa*. *Stem cell embrio* diperoleh dari embrio yang berkembang dari sel telur yang dibuahi sel sperma secara *in vitro*, dilakukan di klinik fertilisasi *in vitro*, dan didonasikan untuk riset dengan sepengetahuan donor. Berbeda dengan *stem cell embrio*, *stem cell dewasa* umumnya berada di beberapa jaringan tertentu dan berfungsi menghasilkan sel-sel yang membentuk jaringan tersebut. Contohnya *stem cell hematopoetik* pada sumsum tulang belakang dapat menghasilkan berbagai jenis sel darah seperti eritrosit dan leukosit. *Stem cell embrio* memiliki potensi tertinggi (totipotensi atau multipotensi) untuk berkembang menjadi hampir semua jenis sel pada tubuh, sedangkan *stem cell dewasa* memiliki potensi berkembang yang lebih rendah (pluripotensi) karena umumnya terbatas pada jenis-jenis sel tertentu.

Sampai saat ini, penelitian *stem cell* pada umumnya masih berfokus pada pertanyaan-pertanyaan dasar: bagaimana mengarahkan *stem cell* agar dapat berdiferensiasi menjadi jenis sel yang diperlukan untuk mengobati kondisi tertentu (misalnya neuron untuk mengobati penyakit Parkinson), bagaimana memastikan sel-sel tersebut tetap hidup setelah transplantasi, bagaimana supaya sel-sel tersebut tidak ditolak oleh sistem imun inang, serta bagaimana mencegah terjadinya pembelahan sel yang tak terkendali yang dapat berakibat kanker.

Stem cells untuk pengobatan

Transplantasi *stem cells* pada berbagai jaringan dan organ, terutama penggunaan *stem cells hematopoetik* dari darah tali pusat (*cord blood*) untuk pengobatan penyakit darah, sangat menjanjikan. Dalam beberapa tahun terakhir terjadi peningkatan penggunaan darah tali pusat untuk pengobatan pasien dari berbagai golongan usia. Jepang telah menggunakan darah tali pusat pada lebih dari 50% transplantasi pada pasien anak-anak maupun dewasa. Di Amerika Serikat, darah tali

pusat juga telah digunakan lebih dari 50% dari total transplantasi pada anak-anak, sedangkan pada pasien dewasa mendekati 20%⁷.

Keberhasilan transplantasi *stem cells* pada jaringan darah sayangnya belum berhasil diikuti keberhasilan pada sistem saraf. Pada saat ini, pengobatan penyakit saraf seperti penyakit Parkinson, Alzheimer, atau degenerasi sel retina dengan transplantasi *stem cells* masih terlalu dini untuk dilakukan. Walaupun demikian, percobaan transplantasi *stem cell* saraf pada berbagai hewan percobaan telah menunjukkan berbagai kemajuan yang makin mendekati penggunaan *stem cells* untuk pengobatan penyakit saraf ke arah klinik (diulas di Ref.⁸).

TRANSPLANTASI PADA RETINA

Transplantasi menggunakan enten (*graft*) retina pada otak inang neonatal menunjukkan bahwa enten retina dapat sintas (*survive*), berkembang, dan bahkan membuat hubungan saraf dengan otak inang⁹. Hasil eksperimen tersebut menimbulkan asumsi bahwa penggunaan enten retina yang ditransplantasikan pada retina lain bisa lebih mudah menghasilkan hubungan saraf dibandingkan enten retina pada otak. Sayangnya, ternyata tidak semudah itu. Selama lebih dari satu dekade terakhir para peneliti retina masih berkutat pada permasalahan pengentenan, sintasan, dan diferensiasi sel-sel yang ditransplantasikan.

Teknik bedah mata modern telah memungkinkan transplantasi sel pada daerah subretina. Transplantasi menggunakan kumpulan sel-sel yang berbentuk lembaran diperkirakan lebih menjanjikan daripada transplantasi menggunakan sel-sel tunggal. Salah satu hasil eksperimen yang menggunakan metode tersebut dilaporkan oleh group Maureen A. McCall¹⁰. Retina dari fetus tikus normal ditransplantasikan pada retina tikus yang memiliki mutasi pada gen rhodopsin. Rhodopsin adalah pigmen di retina yang berperan dalam pembentukan sel fotoreseptor pada fetus dan dalam persepsi cahaya pada mata dewasa. Karena tidak adanya rhodopsin, tikus mutan mengalami degenerasi retina seperti pada RP. Beberapa minggu setelah transplantasi, uji histologi menunjukkan bahwa retina donor dapat mengenteni dengan baik. Yang lebih menarik lagi, retina tikus inang menunjukkan respon saat diberi rangsangan cahaya pada daerah transplantasi, sementara daerah yang tidak mendapat transplan tidak memberikan respon karena fotoreseptornya telah mengalami degenerasi. Walaupun hasil penelitian ini sangat menjanjikan, kelemahannya adalah diperlukannya banyak embrio sebagai donor retina untuk dapat meliputi seluruh retina mata dewasa. Hal ini jelas tidak mungkin dilakukan pada manusia dan dalam hal ini *stem cells* menjadi donor yang lebih menjanjikan.

Sebagaimana penggunaan *stem cells* pada penyakit saraf lainnya, *stem cell* untuk mengobati kebutaan akibat RP atau DMP hingga saat ini masih dalam tahap penelitian. Beberapa grup peneliti telah menunjukkan kemajuan yang membesarkan hati. Salah satu contohnya adalah transplantasi *stem cell* dari hipokampus yang disuntikkan ke *vitreous* mata. Hasil pengamatan setelah 4 minggu menunjukkan bahwa sel-sel tersebut dapat bermigrasi dari *vitreous* menuju berbagai lapisan retina¹¹. Walaupun menjanjikan, keberhasilan sel donor

berintegrasi pada lapisan retina menjadi mentah bila tidak diikuti oleh kemampuan *stem cell* donor untuk berdiferensiasi menjadi jenis sel retina yang tepat. Hasil uji ternyata menunjukkan bahwa walaupun *stem cells* hipokampus berhasil berintegrasi dan menunjukkan morfologi yang menyerupai sel neuron, tidak ditemukan penanda-penanda khas retina pada sel-sel tersebut, yang mengisyaratkan bahwa neuron dari *stem cell* hipokampus tersebut belum mampu menggantikan fungsi neuron retina.

Kemampuan *stem cell* hipokampus mengenteni pada retina dan bahkan berdiferensiasi menjadi neuron menimbulkan pemikiran bahwa penggunaan *stem cell* yang benar-benar berasal dari retina mungkin memberikan hasil yang lebih baik. Bersama dengan laboratorium Dr. van der Kooy, grup kami telah berhasil mengembangkan metode isolasi *stem cells* retina manusia dari donor berbagai usia (prenatal hingga 70-an tahun)¹². *Stem cell* retina dewasa tersebut ditemukan pada daerah *pars plicata* dan *pars plana* pada *retinal ciliary margin*, dengan rasio 1:500¹².

Dalam penelitian kami, selain *stem cell* retina manusia juga digunakan *stem cell* retina dewasa yang diisolasi dari mencit. Sel-sel tersebut dapat dikultur hingga lebih dari satu tahun (setara dengan sekitar 10⁴⁶ sel) menunjukkan bahwa kondisi kultur yang digunakan dapat menunjang *self-renewal* sel-sel tersebut¹³. Lebih meyakinkan lagi, hasil uji kimia imunitas dan *RT-PCR* menunjukkan bahwa sel-sel tersebut mengekspresikan protein nestin, yaitu protein pada rangka sel epitelial saraf *immature* yang merupakan penanda sel saraf progenitor¹⁴, dan protein Bmi1 yang merupakan penanda *stem cell*. Selain Bmi1, penanda *stem cell* lainnya yang sering digunakan adalah Notch, Numb, Musashi-1 dan Presenilin. Selain itu ada pula penanda inti seperti FGF4, Fz9, Sox2, dan Nucleostemin yang banyak digunakan sebagai penanda *stem cell* saraf^{15,16}.

Selain dari jaringan otak maupun retina, sel-sel retina dapat pula dihasilkan dari *stem cells* embrio. Baru-baru ini, grup Thomas Reh dari University of Washington di Seattle, Amerika Serikat, telah mempublikasikan hasil penemuan mereka mengenai kondisi kultur yang dapat digunakan untuk menginduksi *stem cell* embrio manusia menjadi sel-sel retina (sel-sel ganglion dan amakrin)¹⁷.

Walaupun keberhasilan mengisolasi dan membiakkan *stem cell* retina secara *in vitro* sangat menjanjikan, sayangnya belum cukup untuk menjamin penggunaannya untuk mengatasi kebutaan. Masalah yang dihadapi peneliti *stem cell* di seluruh dunia antara lain adalah bagaimana mengatur sintasan dan diferensiasi sel-sel yang telah mengenteni. Sel yang ditransplantasikan harus dari tahap yang tepat agar dapat menyintas dengan baik, dan agar kemudian dapat berdiferensiasi menjadi sel yang tepat untuk mengobati penyakit yang menjadi target. Salah satu cara misalnya dengan melakukan *priming* dengan kondisi *in vitro* tertentu selama 7 hari sebelum transplantasi, yang terbukti menunjang sintasan *stem cells* saraf fetus tikus setelah transplantasi¹⁸.

Untuk mengetahui cara menginduksi diferensiasi yang tepat dilakukan eksperimen menggunakan berbagai kombinasi faktor pertumbuhan sel secara *in vitro*. Salah satu studi yang

sedang saya lakukan adalah upaya mengarahkan *stem cell* agar berdiferensiasi menjadi sel-sel retina yang spesifik, misalnya agar menjadi sel-sel fotoreseptor, bipolar, amakrin, dan sebagainya. Penting untuk diketahui bahwa sel-sel retina terbentuk dengan urutan yang spesifik. Pada perkembangan mata pra- dan *post-natal*, sel retina yang pertama terbentuk adalah sel ganglion retina, diikuti oleh fotoreseptor runjung (*cone*) dan sel-sel amakrin. Kemudian muncul sel horizontal yang diikuti fotoreseptor batang (*rod*). Sel bipolar dan sel glia Müller merupakan sel-sel yang terbentuk paling akhir pada neurogenesis¹⁹. Jelas bahwa organisasi sel-sel pada retina terbentuk melalui suatu proses perkembangan yang rumit yang mengikutsertakan berbagai faktor instrinsik dan ekstrinsik.

Penelitian menunjukkan bahwa faktor ekstrinsik sangat mempengaruhi pembentukan sel-sel retina. Perkembangan fotoreseptor batang didorong oleh berbagai faktor, antara lain *fibroblast growth factor-2* (FGF-2), *sonic hedgehog* (SHH) dan laminin b2. *Ciliary neurotrophic factor* (CNTF) dan *leukemia inhibitory factor* (LIF) diketahui berperan menghalangi diferensiasi fotoreseptor batang dengan mendorong sel-sel yang sedang berdiferensiasi menjadi fotoreseptor batang untuk membentuk sel-sel bipolar. Secara *in vitro*, *retinoic acid* diketahui mendorong diferensiasi fotoreseptor. Activin A juga diketahui meregulasi diferensiasi pada perkembangan retina. Selanjutnya diketahui pula bahwa protein Prox-1 mempengaruhi keluarnya sel progenitor retina dari siklus sel, dan ditemukan pada sel-sel horizontal, bipolar dan amakrin sepanjang perkembangan retina. Selain itu, ada pula Math3 dan NeuroD yang meregulasi spesifikasi sel amakrin. Walaupun kemajuan teknologi transgenik telah membawa pengertian lebih lanjut terhadap perkembangan retina, masih perlu banyak penelitian yang dilakukan sebelum peneliti dapat dengan mudah memanipulasi dan mengontrol diferensiasi *stem cell* retina.

Eksperimen *in vitro* yang grup kami lakukan berusaha meniru keadaan pembentukan mata pada fetus. Pada saat cawan optik terbentuk, sel-sel yang membentuk lensa mata mensekresikan FGF ke sel-sel di sekitarnya, termasuk sel-sel yang kemudian akan menjadi retina. Grup kami berusaha meniru kondisi ini dengan memaparkan kultur *stem cells* terhadap FGF-2 selama 2 hari (tahap *priming*), diikuti dengan pemberian B27 (suplemen yang mengandung *retinoic acid*). Metode tersebut terbukti efektif untuk menginduksi *stem cell* retina menjadi sel neuron retina (57%), termasuk sel-sel dengan penanda sel fotoreseptor (antara 25-35% dari jumlah sel total)²⁰. Saat ini, kami sedang mencoba berbagai kombinasi faktor ekstrinsik untuk menginduksi diferensiasi *in vitro* menjadi sel-sel retina yang lain dengan jumlah yang lebih banyak.

Secara *in vivo*, grup kami telah melakukan transplantasi *stem cells* retina pada vitreous mata mencit. Setelah 4 minggu, sebagian besar sel-sel tersebut telah bermigrasi secara acak ke lapisan sel ganglion dan beberapa sel mencapai lapisan *inner plexiform*. Sel-sel tersebut berdiferensiasi menjadi jenis sel retina sesuai dengan lapisan retina di mana sel-sel tersebut berintegrasi. Sayangnya, dalam eksperimen ini, grup kami tidak berhasil menemukan sel yang berdiferensiasi menjadi

fotoreseptor²¹. Saat ini kami mencoba berbagai pendekatan lain dalam teknik transplantasi, selain juga berupaya meningkatkan pengetahuan dan kemampuan kami dalam memproduksi *stem cell* retina yang berada dalam tahap yang tepat untuk transplantasi.

Hal-hal yang dapat dilakukan saat ini dan di masa depan untuk menunjang riset *stem cell* retina

Untuk dapat mencapai keberhasilan penggunaan *stem cells* retina untuk mengobati kebutaan, para peneliti perlu mengembangkan eksperimennya secara sederhana namun tepat pada sasaran. Banyak masalah yang perlu diselesaikan sebelum transplantasi dapat diterapkan pada manusia, dan setiap usaha ke arah itu harus multidisiplin, mulai dari riset sains yang paling mendasar hingga yang paling klinis. Selain itu, penerapan berbagai metode baru seperti *tissue engineering* dapat meningkatkan keberhasilan transplantasi.

Kemampuan untuk menginduksi diferensiasi *stem cells* menjadi sel-sel retina secara *in vitro* walaupun belum dapat digunakan untuk transplantasi pada manusia tidak menjadi percuma. Sel-sel retina yang spesifik seperti fotoreseptor sangat berguna misalnya untuk skrining kandidat obat yang dapat memproteksi fotoreseptor terhadap degenerasi. Selain itu, sel-sel tersebut juga dapat digunakan untuk uji coba transplantasi pada hewan percobaan.

Mengingat proses transplantasi pada hewan kecil (misalnya mencit dan tikus) memiliki banyak halangan teknis, transplantasi telah mulai dicoba pada hewan percobaan yang lebih besar, misalnya pada babi²². Transplantasi menggunakan hewan besar sangat berguna untuk menentukan keberhasilan *graft* secara lebih akurat, serta dapat digunakan untuk mengembangkan metode operasi transplantasi yang selanjutnya dapat digunakan di klinik.

KEPUSTAKAAN

1. Chow AY *et al.* The artificial silicon retina microchip for the treatment of vision loss from retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* 2004;122, 460-469.
2. Yanez-Munoz,RJ *et al.* Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat. Med.* 2006; 12: 348-353.
3. Kostic,C. *et al.* Activity analysis of housekeeping promoters using self-inactivating lentiviral vector delivery into the mouse retina. *Gene Ther.* 2003; 10: 818-821
4. Otani,A. *et al.* Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J. Clin. Invest* 2004; 114: 765-774
5. Schmidt-Erfurth,U. Nutrition and retina. *Dev. Ophthalmol.* 2005; 38, 120-147
6. Berson,E.L. Nutrition and retinal degenerations. *Int. Ophthalmol. Clin.* 2000; 40: 93-111
7. Rubinstein,P. Why cord blood? *Hum. Immunol.* 2006; 67: 398-404
8. Lindvall,O., Kokaia,Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 2006; 441: 1094-1096
9. Klassen,H. & Lund,R.D. Retinal transplants can drive a pupillary reflex in host rat brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 6958-6960.
10. Sagdullaev BT, Aramant RB, Seiler MJ, Woch G., McCall MA. Retinal transplantation-induced recovery of retinotectal visual function in a rodent model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003 ; 44:1686-1695.

11. Young MJ, Ray J, Whiteley SJ, Klassen H, Gage FH. Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats. *Mol. Cell Neurosci.* 2000; 16:197-205.
12. Coles BL *et al.* Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2004; 101:15772-15777.
13. Angenieux B, Schorderet DF, Arsenijevic Y. Epidermal growth factor is a neuronal differentiation factor for retinal stem cells in vitro. *Stem Cells* 2006; 24: 696-706.
14. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990; 60: 585-595.
15. Cai J. *et al.* Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). *Dev. Biol.* 2002;251: 221-240
16. Tsai RY, McKay RD. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev.* 2002;16: 2991-3003
17. Lamba DA, Karl MO, Ware CB, Reh TA. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2006.
18. Gao J. *et al.* Transplantation of primed human fetal neural stem cells improves cognitive function in rats after traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 2006.
19. Young RW. Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat. Rec.* 1985; 212: 199-205
20. Merhi-Soussi F *et al.* High Yield of Cells Committed to the Photoreceptor Fate from Expanded Mouse Retinal Stem Cells. *Stem Cells* 2006.
21. Canola K. *et al.* Retinal stem cells transplanted into models of late stages of retinitis pigmentosa preferentially adopt a glial or a retinal ganglion cell fate. 2006. Ref Type: Unpublished Work
22. Warfvinge K. *et al.* Retinal progenitor cell xenografts to the pig retina: morphologic integration and cytochemical differentiation. *Arch. Ophthalmol.* 2005; 123: 1385-1393.

Cermin Dunia Kedokteran merasa sangat kehilangan atas meninggalnya :
Bapak Sriwidodo WS
Salah seorang yang pengabdianannya untuk Majalah Cermin Dunia Kedokteran
sejak awal sangat berarti dalam membesarkan majalah ini
di RS Husada, Jakarta pada tanggal 15 Agustus 2006