

Peranan *Endothelial Progenitor Cell* dalam Neovaskularisasi

Saut H.H.Nababan, Adrian P. Purba, Frisca, Nurul Aini, Boenjamin Setiawan, Ferry Sandra
Stem Cell and Cancer Institute, Kalbe Pharmaceutical Company, Jakarta, Indonesia

ABSTRAK

Studi dan penelitian berkelanjutan mengenai sel induk pada beberapa dekade terakhir ini telah membuka cakrawala baru sebagai alternatif terapi bagi pasien-pasien penyakit degeneratif. *Endothelial progenitor cell* (EPC) terbukti dan diakui potensinya dalam proses regeneratif sel yang mengalami kerusakan. Walau jumlah EPC sedikit ditemukan dalam manusia, dapat diupayakan untuk meningkatkan jumlah EPC, sehingga bisa ditingkatkan fungsinya dalam aplikasi klinik.

Kata-kata kunci : EPC, sel induk, neovaskularisasi, jaringan iskemia

I. PENDAHULUAN

EPC merupakan sel-sel yang memiliki kemampuan untuk membelah dan berdiferensiasi menjadi sel-sel endotel. EPC merupakan bagian dari sel induk yang bersifat lebih matang dan unipoten. Secara klinis, EPC dapat memperbaiki kondisi-kondisi penyakit yang diawali dengan kerusakan sel-sel endotel, baik secara anatomis/struktural maupun fungsional, melalui mekanisme neovaskularisasi. Hingga sekarang, para peneliti terus mengembangkan penggunaan klinis EPC yang meliputi aspek penentuan indikasi, dosis, dan cara pemberian, baik dalam jangka waktu pendek maupun panjang dibandingkan dengan pilihan terapi yang sudah ada. Sejalan dengan itu, usaha para peneliti untuk menentukan sumber EPC yang paling baik, mempelajari mekanismenya dalam neovaskularisasi dan memperbanyak jumlah EPC sampai saat ini terus berlangsung. Dalam tulisan ini akan diuraikan peranan EPC dalam proses neovaskularisasi dan hal-hal yang telah dicapai dalam usaha menggali potensi EPC.

II. SEKILAS TENTANG EPC

Para peneliti menyakini bahwa di dalam sumsum tulang dan aliran darah tepi terdapat sel-sel yang mampu membelah dan berdiferensiasi menjadi sel-sel endotel dan memperbaiki jaringan iskemik akibat rusaknya dinding pembuluh darah. Sel-sel ini disebut *endothelial progenitor cell* atau EPC^{1,2}. Akan tetapi, para peneliti sampai sekarang belum sepaham dalam menentukan kelompok sel yang lebih menggambarkan EPC, baik dari segi asal-usul, morfologi, ekspresi, maupun kemampuannya secara *in vitro* dan *in vivo*. Melalui eksperimen *in vitro*, telah diketahui tiga kelompok sel yang memiliki kemampuan neovaskularisasi, antara lain kelompok EPC yang berasal dari sumsum tulang³, kelompok sel endotel dari dinding pembuluh darah yang bersirkulasi di dalam darah tepi (*circulating endothelial cell* [CEC]), serta

kelompok sel yang disebut *endothelial outgrowth cell* (EOC)³. CEC dan EOC diperoleh dari hasil kultur sel-sel mononuklear darah tepi di dalam medium yang sesuai.

Pada masa embriogenesis, *hemangioblast* bersifat bipotensial, mampu berdiferensiasi menjadi sel induk hematopoietik [*Hematopoietic Stem Cell* (HSC)] dan EPC³. Dilaporkan pula, bahwa secara *in vivo* sel-sel endotel dapat berasal HSC⁴, *common myeloid progenitor*, *granulocyte macrophage progenitor*⁵, dan *mesenchymal stem cell*⁶ (Gambar 1).

Kemungkinan sumber EPC lain adalah sel-sel monosit yang berperan dalam proses neovaskularisasi melalui mekanisme yang berbeda dari keempat sumber di atas. EPC hasil diferensiasi sel monosit tidak langsung membentuk sel endotel, tetapi bermigrasi ke *perivascular space* dan mensekresikan *proangiogenic cytokine*, seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Human Growth Factor* (HGF), *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF), dan *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF). Secara morfologi EPC dari sel-sel monosit berbentuk *spindle*, menyerupai sel-sel fibroblast⁷. Sedangkan EPC yang berasal dari sumsum tulang berbentuk seperti *cobblestone*, menyerupai sel endotel⁷.

Dalam usaha mengidentifikasi EPC, para peneliti mencoba mencari *marker* antigen yang spesifik untuk EPC dengan menggunakan *fluorescent-activated cell sorter* (FACS) maupun *immunomagnetic bead cell separator*. Untuk saat ini, diketahui bahwa EPC mengekspresikan *marker* antigen CD34, CD133 & VEGFR-2⁸. Selain di sumsum tulang maupun darah tepi, EPC juga terdapat di dalam darah tali pusat⁹. Bahkan diketahui, darah tali pusat mengandung EPC 10 kali lebih banyak dengan kemampuan membelah diri yang

lebih besar¹⁰. Dengan demikian EPC yang berasal dari darah tali pusat sangat potensial untuk *allogenic transplant*¹¹ pada pasien dengan faktor-faktor risiko kardiovaskuler, diabetes¹², hipertensi¹³, hiperlipidemia¹⁴, gagal ginjal kronik¹⁵, dan artritis rematoid¹⁶, yang jumlah dan fungsi EPCnya menurun dibandingkan dengan dewasa normal (0.002% dari total sel mononuklear atau sekitar 66 sel/ml¹⁷). Walaupun demikian, kemungkinan timbulnya *graft-versus-host disease* (GVHD) perlu diperhatikan.

Hasil akhir dari peran EPC dalam proses neovaskularisasi secara makroskopis adalah terbentuknya pembuluh darah kolateral pada jaringan iskemik. Selain itu, EPC juga berperan dalam proses reendotelialisasi, yaitu memperbaiki permukaan sel endotel yang rusak.

III. APLIKASI KLINIK EPC

Tateishi dkk (2002) mengawali studi *randomized controlled trial* (RCT) pada 22 pasien dengan iskemia tungkai. Mereka mengambil sel-sel mononuklear dari sumsum tulang penderita itu sendiri dan kemudian menginjeksikannya pada bagian tungkai yang mengalami iskemia secara intramuskular. Hasilnya menunjukkan perbaikan yang signifikan, baik secara subyektif (*rest pain*) maupun obyektif (*Ankle Brachial Index* (ABI), *transcutaneous O₂* [TcPO₂], *pain-free-walking time*¹⁸).

Para peneliti selanjutnya mulai melihat efek pemberian EPC pada penyakit-penyakit yang dilatarbelakangi oleh kerusakan endotel seperti aterosklerosis, maupun proses inflamasi pada penyakit arteri perifer¹⁹, infark miokard akut²⁰, dan *stroke*²¹. Pada fase awal infark miokard akut²² ataupun

trauma vaskular²³, jumlah EPC terlihat meningkat. Akan tetapi seiring dengan waktu, jumlahnya akan terus menurun. Selain itu, menurunnya jumlah EPC dapat disebabkan pula oleh faktor-faktor predisposisi seperti usia lanjut, merokok²⁴, dan kurang olahraga²⁵. Oleh karena itu, penambahan/terapi dengan EPC sangat dibutuhkan.

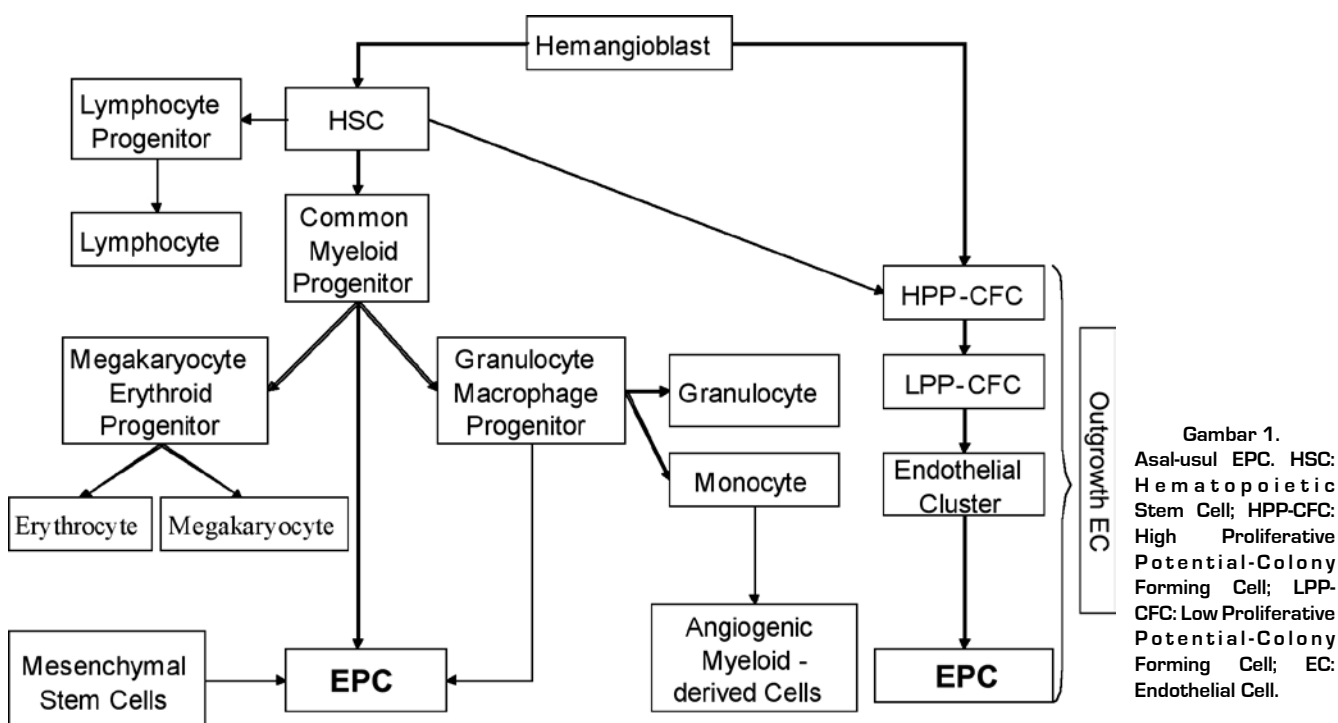
Para peneliti sedang mengembangkan teknik pemberian EPC yang paling optimal, baik secara sistemik maupun lokal. Teknik penyuntikan EPC hasil kultur sel-sel mononuklear dilakukan secara intrakoroner^{20,26} maupun intramuskular²⁷ kepada tikus percobaan. Kedua teknik tersebut memberikan efektifitas yang hampir sama.

Teknik pemberian lainnya adalah dengan memobilisasi EPC dari sumsum tulang ke dalam aliran darah tepi dengan *cytokine* atau *growth factor*^{28,29} (VEGF, SDF-1, GCSF, GM-CSF, dan Ang-1)³⁰, sehingga diperoleh EPC dalam jumlah yang memadai. Kemudian EPC diisolasi dari darah tepi menggunakan mesin *apheresis*. Pilihan lainnya adalah menggunakan EPC dari darah tali pusat, walaupun perlu dilakukan *Human Leukocyte Antigen* (HLA) *typing* terlebih dahulu untuk mencegah terjadinya GVHD.

Yang harus dipertimbangkan dalam terapi EPC adalah kenyamanan pasien, efektivitas, serta efisiensi suplai EPC pada jaringan yang mengalami iskemi sehingga proses neovaskularisasi dapat terjadi.

IV. UPAYA PENGEMBANGAN POTENSI EPC

Mengingat menurunnya jumlah dan fungsi EPC pada pasien-pasien dengan faktor-faktor risiko di atas, maka



perlu dilakukan upaya meningkatkan jumlah dan fungsi EPC tersebut agar tercapai neovaskularisasi yang maksimal. Upaya tersebut di antaranya adalah pengembangan metode ekspansi dan transfer gen.

Metode-metode ekspansi yang sudah dikembangkan antara lain *adherence assay*³¹ menggunakan *fibronectin*, *preplating*³² atau *serial discarding*³³; akan tetapi metode-metode tersebut hanya berlangsung singkat (*short-term culture*). Oleh karena itu, perlu dikembangkan suatu metode ekspansi agar EPC dapat dikultur dalam jangka waktu lama tanpa mengubah sifat-sifat intrinsik yang dimilikinya.

Peningkatan fungsi EPC dapat dilakukan melalui transfer gen yang menyandi faktor-faktor proangiogenesis ke dalam EPC³⁴. Selain itu, para peneliti juga mentransfer gen-gen yang menyandi protein-protein yang diduga ikut berperan dalam memobilisasi EPC ke jaringan yang iskemik³⁵. Cara lain yang mungkin dapat dilakukan adalah penggabungan kedua metode tersebut sebelum ditransplantasikan.

V. MASA DEPAN EPC

Penggunaan EPC secara klinis telah dilaporkan bermanfaat sebagai *biomarker* untuk berbagai kondisi patologis yang penting untuk diagnosis. Beberapa penelitian telah menunjukkan adanya hubungan antara faktor risiko aterosklerosis dengan rendahnya jumlah dan fungsi EPC.

Dengan kerjasama antara para peneliti *basic science* dan klinisi, prospek penggunaan EPC sebagai alternatif regenerasi di masa depan memiliki potensi yang sangat besar. Oleh karena itu, penelitian tentang asal-usul, morfologi, *marker* antigen dan mekanismenya dalam proses neovaskularisasi perlu terus dikembangkan sehingga potensi kegunaan klinis EPC dapat dioptimalkan. ■

KEPUSTAKAAN

- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, dkk. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964-7.
- Shi Q, Rafii S, Wu MH, dkk. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998; 92:362-7.
- Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*. 1992;116:435-9.
- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origin of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest*. 2000;105:71-7.
- Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M, dkk. Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood*. 2004;103:13-9.
- Bailey AS, Willenbring H, Jiang S, dkk. Myeloid lineage progenitors give rise to vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:13156-61.
- Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, dkk. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22:377-84.
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, dkk. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:288-93.
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, dkk. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95:952-8.
- Duan HX, Cheng LM, Wang J, dkk. Angiogenic potential difference between two types of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood. *Cell Biol Int*. 2006;30:1018-27.
- Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, dkk. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104:2752-60.
- Finney MR, Greco NJ, Haynesworth SE, dkk. Direct comparison of umbilical cord blood versus bone marrow-derived endothelial precursor cells in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12:585-93.
- Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, dkk. Human endothelial progenitor cells from type II diabetic exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 2002;106:2781-6.
- Nikos W, Georg N. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:257-66.
- Imanishi T, Hano T, Matsuo Y, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial progenitor cell differentiation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30:665-70.
- Choi JH, Kim KL, Huh W, dkk. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1246-52.
- Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, dkk. Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2005;111:204-11.
- Dulic-Sills A, Blunden MJ, Mawdsley J, dkk. New flow cytometric technique for the evaluation of circulating endothelial progenitor cell levels in various disease groups. *J Immunol Methods*. 2006;316:107-15.
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, dkk. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:427-35.
- Lenk K, Adams V, Lurz P, dkk. Therapeutic potential of blood-derived progenitor cells in patients with peripheral arterial occlusive disease and critical limb ischemia. *Eur Heart J*. 2005;26:1903-9.
- Assmus B, Schächinger V, Teupe C, dkk. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106:3009-17.
- Ghani U, Shuaib A, Salam A, dkk. Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke*. 2005;36:151-3.
- Massa M, Rosti V, Ferrario M, dkk. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood*. 2005;105:199-206.
- Gill M, Dias S, Hattori K. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2⁺AC133⁺ endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001;88:167.
- Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, dkk. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1442-7.
- Rehman J, Li J, Parvathaneni L, dkk. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:2314-8.
- Kim D, Kim MJ, Joh JH, dkk. Angiogenesis facilitated by autologous whole bone marrow stem cell transplantation for buerger's disease. *Stem Cells*. 2006;24:1194-200.
- Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, dkk. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol*. 2006;97:823-9.
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, dkk. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999;18:3964-71.
- Powell TM, Paul JD, Hill JM. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:296-300.
- Barber CL, Iruela-Arispe ML. The ever-elusive endothelial progenitor cell: identities, function and clinical implications. *Pediatr Res*. 2006;59:26-32.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, dkk. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:3422-7.
- Hill J, Zalos G, Halcox J, dkk. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593-600.
- Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*. 2002;105:732-8.
- Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1 enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation*. 2004;109:2454-61.