Edisi 1

2016

STEM CELL EPIGENETIK

**Profesor Hadyanto Lim,
Dr. dr. M.Kes, SpFK, FESC, FIBA, FAHA**

**Professor of Pharmacology and Molecular Sciences,
Cardiovascular Division, Department of Pharmacology and Molecular Biology
Faculty of Medicine, Methodist University of Indonesia (UMI), Medan
Cardiovascular Molecular Biology Research, Postgraduate Program,
Faculty of Medicine, University of Sumatra Utara (USU), Medan.**

PT. SOFMEDIA

KATA PENGANTAR

Dalam laporan awal artikel Human Genome Project yang dimuat di jurnal terkemuka dunia, *Nature* tahun 2011, oleh satu konsorsium melibatkan 20 kelompok peneliti dari 6 negara besar mengemukakan “*it is has not escaped our notice that the more we learn about the human genome, the more there is to explore.*” “Tidak luput dari perhatian kami bahwa semakin banyak kita pelajari tentang genom manusia, semakin banyak pula harus kita eksplorasi.” Ungkapan yang mirip dengan kalimat yang amat terkenal disampaikan pertama kali oleh Watson dan Crick dalam artikel “Struktur DNA” di jurnal yang sama, tahun 1953 “*It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.*” “Tidak luput dari perhatian kami bahwa pasangan basa spesifik yang kami postulasikan dapat menjelaskan mekanisme replikasi materi genetik.” Kalimat yang diungkapkan ini menjadi batu loncatan perkembangan ilmu biologi molekuler, bukan mega proyek yang mengungkapkan berbagai mekanisme kejadian patobiologi pada tingkat genom, melainkan kemajuan pengetahuan yang akhirnya sampai pada tingkat pengetahuan “EPIGENETIK”, yang menjelaskan semua perubahan ekspresi gen yang mendasari perubahan fenotipe penyakit tanpa mengubah sekuensi gen, sampai pada diferensiasi stem cell.

EPIGENETIK adalah hasil perkembangan penelusuran genom yang belum lengkap, sehingga “ILMU BARU GENETIK” pantas disandang oleh “EPIGENETIK”, untuk menjelaskan permasalahan yang tidak dapat diungkapkan oleh “ILMU GENETIK”. Oleh sebab itu, perubahan fenotipe pada tingkat stem cell, tidak luput dari pengaruh dinamika lanskap epigenetik. Sehingga mekanisme stem cell baik pluripotensi, diferensiasi, dediferensiasi, *reprogramming*, yang merupakan bagian plastisitas stem cell dapat dijelaskan, dan menjadi landasan dalam pengembangan terapi stem cell untuk proses perbaikan dan regenerasi jaringan yang rusak akibat penyakit kardiovaskuler, stroke, diabetes melitus juga penyakit neurodegeneratif seperti penyakit Alzheimer dan penyakit Parkinson.

Buku Stem Cell Epigenetik ini tersusun atas 6 bab. Bab 1, memaparkan tentang penemuan sel, ilmu stem cell sampai pada epigenetik, sehingga dapat dirangkaikan proses perkembangan pengetahuan. Pada bab 2, menjelaskan bahwa epigenetik adalah suatu ilmu baru yang mengungkapkan proses yang terjadi di dalam genetik yang berpengaruh pada fenotipe. Bab 3, memaparkan stem cell *self renewal* sebagai salah satu sifat stem cell dengan penjelasan mekanisme pada tingkat epigenetik. Bab 4, mengungkapkan bagaimana diferensiasi stem cell berperan penting terhadap proses perbaikan dan regenerasi pada jaringan yang mengalami injuri dan inflamasi. Dengan berlandaskan pada penjelasan epigenetik, maka proses pemahaman menjadi lebih detail. Bab 5, memaparkan pengetahuan diferensiasi sel yang direprogram menjadi tipe sel pada turunan yang berbeda. Penelitian *reprogramming* direk secara *in vivo* saat ini menjadi trend penelitian dunia, yang berupaya untuk mengubah sel yang abnormal menjadi normal kembali dalam tubuh manusia dengan mengubah identitas sel. Sedangkan bab terakhir memfokuskan pada kemampuan stem cell berubah menjadi tipe sel lain pada garis turunan berbeda pada berbagai organ tubuh.

Buku ini tidak akan dapat diselesaikan tanpa dorongan dan pengertian dari berbagai pihak. Kepada PT. Sofmedia yang senantiasa mendorong dan bersedia menerbitkan buku ini, saya ucapkan banyak terima kasih.

Kepada istri saya tercinta, Sophia Hadyanto dan anak-anak saya: Vina Hadyanto, Steven Hadyanto, dan Richard Hadyanto, yang selalu memberikan kedamaian, kebanggaan, dan sukacita dalam kehidupan ini, saya sampaikan terima kasih.

Akhir kata, kami mengharapkan kontribusi kami yang kecil ini dapat menambah khazanah ilmu pengetahuan kepada semua pembaca baik kalangan ilmuwan, dokter dan spesialis, para mahasiswa kedokteran dan kesehatan, serta bagian farmasi yang ingin mengembangkan pengetahuan dan penelitian di bidang keilmuan stem cell. Semoga bermanfaat !

Hadyanto Lim

DAFTAR ISI

Kata Pengantar	iv
Daftar Isi.....	vi
1. Sel, Stem Cell dan Epigenetik	1
2. Epigenetik : Ilmu Baru Genetik	48
3. Stem Cell : Self-Renewal.....	78
4. Stem Cell : Diferensiasi	102
5. Diferensiasi : Reprogram Sel.....	125
6. Stem Cell : Plastisitas dan Dediferensiasi.....	154
Indeks	182

1

Sel, Stem Cell dan Epigenetik

PENDAHULUAN	1
PEMBELAHAN SEL	5
Siklus sel	6
STEM CELL	10
JENIS STEM CELL	11
EMBRYONIC STEM CELL	11
ADULT STEM CELL	14
Bone marrow-derived stem cell	14
Hematopoietic stem cell	14
Nonhematopoietic stem cell	21
Mesenchymal stem cell	21
MSC jaringan adiposa	25
Unfractionized bone marrow-derived stem cell	25
Cardiac Stem Cell	30
Cardiosphere dan Cardiosphere-derived cell	31
INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL	32
EPIGENETIK	32

"We shall not cease from exploration. And the end of all our exploring will be to arrive where we started, and know the place for the first time."

- T. S. Eliot -

PENDAHULUAN

Setiap organisme hidup yang bermukim di muka bumi; manusia, hewan, tumbuh-tumbuhan, fungi atau mikroorganisme dibentuk oleh sel. Sel adalah unit dasar biologik, karena sel mampu tumbuh dan berkembang biak, memperbanyak diri, berespon terhadap stimuli serta beradaptasi terhadap lingkungan. Hal ini

menunjukkan sel bersifat dinamis dan mampu menyesuaikan diri terhadap lingkungan mikro (niche). Karena itu, sel disebut sebagai pembentuk kehidupan makhluk hidup.

Pemahaman sel sebagai unsur pembentuk organ tubuh yang menunjang kehidupan didasarkan atas penemuan sel pada tahun 1665. Ilmuwan Inggris Robert Hooke, seorang kurator

instrumen di Royal Society, London pertama kali mengamati potongan gabus di bawah mikroskop hasil ciptaannya dengan pembesaran 30 x. Beliau mengamati bagian kecil gabus tersusun menyerupai sarang lebah, sehingga ia menamakannya sebagai *cell*, dalam bahasa Latin, *cellula*, berarti “ruang kecil.” Penemuan Hooke dituliskan dalam buku “*Micrographia*” hasil pengamatan berbagai miniatur objek mulai dari sel hingga berbagai serangga kecil, dengan tujuan untuk membuka cakrawala pemikiran dibawah objek yang tidak terlihat.¹

Beberapa tahun kemudian, Antonie van Leeuwenhook, seorang pedagang tekstil dari Belanda, menciptakan sebuah lensa mikroskop dengan pembesar 300 x. Dengan pembesaran lensa yang lebih superior, van Leeuwenhook dapat mengamati sel hidup, termasuk bakteri, sel darah, sel sperma, berbagai organisme bersel tunggal seperti protozoa dan algae. Meskipun beliau sanggup mengamati sel hidup, struktur sel secara detail belum mampu diungkapkan pada abad ke-17. Pada abad ke 19, baru ditemukan mikroskop kombinasi menggabungkan pembesaran pada lensa pengamatan terhadap lensa objektif dan lensa okular, sehingga didapati pembesaran yang lebih jelas dan besar.

Namun, kontribusi penemuan mikroskop pertama oleh Hooke meletakkan dasar bagi pengembangan penemuan yang lebih baik. Karena itu, untuk memperingati 350 tahun penemuan sel oleh Robert Hooke, the Royal Society, London, mengadakan seminar *Cell – dari Robert Hooke hingga terapi stem cell* – diadakan tanggal 5-6 Oktober 2015. Dalam pertemuan yang dihadiri para ilmuwan, saya diundang untuk menyaksikan betapa besar pengaruh selama perjalanan 350 tahun terhadap pemahaman sel hingga stem cell yang digunakan dalam terapi untuk menyembuhkan penyakit yang sulit disembuhkan melalui obat-obatan.

Untuk mengetahui bagaimana sel digunakan sebagai pemahaman awal hingga pada tingkat pemahaman stem cell, perlu diketahui tentang teori sel hingga anatomi dan fungsi sel.

Teori sel pertama kali dikemukakan oleh Matthias Schleiden berdasarkan pengamatan bahwa semua jaringan tumbuh-tumbuhan disusun oleh sel dan tumbuhan embrio dibentuk oleh sel tunggal. Hasil pengamatan beliau dikonfirmasi oleh ahli sel Jerman yaitu Theodore Schwann pada jaringan hewan. Hal ini menunjukkan bahwa baik sel tumbuh-tumbuhan maupun sel hewan dibentuk oleh sel. Dari hasil pengamatan ini, disusun postulasi oleh Schwann bahwa semua organisme tersusun atas satu atau lebih sel dan sel adalah unit dasar pembentuk semua organisme hidup. Berdasarkan pengamatan oleh Robert Brown bahwa di dalam setiap sel tumbuh-tumbuhan didapati struktur bulat di dalamnya yang dinamakan nukleus, maka Karl Nagali menambahkan bahwa sel mampu membelah. Karena itu, Rudolf Virchow tahun 1855 menyatakan bahwa sel dibentuk oleh hasil pembelahan sel sebelumnya. Dalam bahasa Latin dikenal dengan sebutan : *omnis cellula e cellula*.

Sebagai unit dasar pembentuk organisme dan reproduksi, sel bersifat amat dinamis, baik struktur yang beragam, dari bentuk spiral pada bakteri *Treponema* hingga berbentuk cakram pada sel darah merah manusia. Bentuk sel dapat memberikan gambaran fungsi. Sel saraf manusia bercabang memberi petunjuk bahwa sel ini berinteraksi dengan berbagai sel saraf (neuron) lain.

Dengan perkembangan teknologi yang amat pesat dalam abad ke 21 ini, maka dapat diciptakan berbagai jenis mikroskop baik mikroskop optik (cahaya), yang mampu mengamati sel hidup hingga beresolusi 200 nanometer, mikroskop elektron mampu mengamati sel hingga 100.000 x pembesaran.

Dengan menggunakan mikroskop elektron transmisi, dapat diukur besarnya struktur sel dalam skala 100 nanometer. Dengan mikroskop elektron voltase tinggi, dapat dipelajari struktur subseluler dengan ketebalan 1µm. Untuk menampakkan permukaan sel dan organel, dibutuhkan mikroskop elektron scanning. Dengan mikroskop elektron transmisi

dapat diamati membran retikulum endoplasmik di dalam sitoplasma dalam bentuk dua dimensi sedangkan mikroskop elektron *scanning* dapat menampakkannya dalam bentuk tiga dimensi, sehingga struktur subseluler tampak lebih nyata.

Bagaimana sel melaksanakan fungsi pertumbuhan yang bersifat dinamis ? Apa yang terkandung dalam struktur sel yang memberikan kemungkinan tersebut? Bentuk molekul apa yang memberikan replikasi yang amat akurat dan tak terbatas sehingga dapat mengarahkan perkembangan organisme dan kehidupan sel ? Jawaban terhadap pertanyaan ini mulai muncul tahun 1940-an, ketika ilmuwan menemukan bahwa informasi genetik terutama berfungsi sebagai instruksi pembentuk protein. Karena protein adalah unsur pembentuk sel, membentuk enzim yang mengkatalisis reaksi kimia sel, mengatur ekspresi gen, memungkinkan komunikasi antara satu sel dengan sel lain sehingga timbul proses pergerakan.

Informasi genetik hasil pengamatan pada akhir abad 19 dilaksanakan oleh kromosom, struktur seperti benang di dalam nukleus sel eukariot yang dapat dilihat di bawah mikroskop cahaya ketika sel mengalami pembelahan, pertama kali dilaporkan oleh ahli biologi Jerman Walther Flemming. Beliau menyebut proses pembelahan sel sebagai *mitosis*, yang berasal dari kata Yunani berarti benang.

Hasil analisis biokimia mendapatkan bahwa kromosom terdiri dari asam deoksiribonukleat dan protein. Tahun 1930, DNA telah dikenal tersusun oleh 4 nukleotida, sedangkan protein tersusun oleh 20 asam amino yang berbeda. Sebenarnya hingga pertengahan abad ke 20, masih terdapat pemikiran bahwa protein adalah pembawa informasi genetik karena merupakan komponen nukleas satu-satunya yang memiliki beragam komponen yang bersesuaian dengan beragam gen.

Dalam studi bakteri yang dilaporkan ahli biokimia dari Kanada, Oswald Avery Collin

McLeod dan ilmuwan Amerika Maclyn McCarty, sama –sama bekerja di Universitas Rockefeller, mendapatkan bahwa DNA dapat mentransformasikan *strain* bakteri nonpatogen menjadi *strain* patogen. Delapan tahun kemudian, Alfred Hersley dan Martha Chase, ahli biokimia Amerika, menunjukkan bahwa DNA, bukan protein, masuk ke dalam sel bakteri ketika terinfeksi dan secara genetik diubah oleh virus. Tahun 1940, George Beadle dan Edward Tatum, bekerja menggunakan *Neurospora crassa*, merumuskan konsep “satu gen –satu enzim” yaitu satu gen mengatur pembentukan protein.

Dari pemaparan di atas, telah ditemukan bahwa DNA adalah pembawa informasi genetik, namun belum diketahui bagaimana informasi ini dicopy dan dihantarkan dari satu sel ke sel lain. Tahun 1953, misteri ini dapat dipecahkan melalui penjelasan James Watson dan Francis Crick, yaitu ditemukan struktur DNA, dengan menggunakan *X-ray crystallography* yang dihasilkan Rosalind Franklin. Dengan diketahui bahwa DNA tersusun atas untai ganda (*double helix*), maka problem tentang cara replikasi molekul dapat diketahui. Satu untai DNA saling berkomplementer dan terpilih satu sama lain dengan pasangan basa di dalamnya dan ditopang oleh *sugar phosphate*.

Tahun 1960 ditemukan enzim polymerase yang mensintesa DNA dan RNA dan diketahui “kode genetik” yang mengemukakan hubungan urutan nukleotida di dalam DNA atau RNA dan urutan asam amino di dalam protein. Ahli biokimia Jacques Monod dan ahli Genetika Francois Jacob mengemukakan mekanisme yang mendasari pengaturan ekspresi gen pada bakteri.

Setelah penemuan struktur DNA tahun 1953, Francis Crick menyampaikan model informasi genetika yang dinamakan sebagai dogma sentral biologi molekuler.

Informasi genetik melibatkan replikasi DNA untuk menghasilkan dua *copy* identik, yaitu dua untai ganda (double helix) yang saling komplementer. Ketika terjadi proses transkripsi, kedua untai DNA terbuka oleh enzim helicase polymerase DNA seperti terbukanya zigzag untai DNA. Untai induk akan menjadi “template” bagi untai baru, dengan demikian akan terbentuk dua untai baru. Proses pembentukan dua untai baru DNA yang berlangsung secara semikonservatif, dimana satu untai menjadi cetakan bagi pembentukan untai baru merupakan suatu proses replikasi DNA.

Sedangkan informasi transkripsi dari DNA dalam pembentukan RNA dan translasi informasi RNA menjadi protein adalah proses untuk pembentukan sel. Transkripsi menunjukkan bahwa sintesis RNA menggunakan DNA sebagai *template*, karena ekspresi gen hanya berupa pemindahan informasi dari satu asam nukleat menjadi yang lain. Sedangkan dari asam nukleat menjadi urutan molekul RNA yaitu urutan asam amino dari rantai polipeptida dilaksanakan melalui proses translasi.

Dari pemaparan di atas, dapat dipahami bahwa sel sebagai unit dasar pembentuk kehidupan dibentuk dari informasi genetik yang terkandung di dalam DNA, yang terdapat di dalam inti sel (nukleus), maka dapat dikemukakan beberapa sifat dasar sel yang menunjang kehidupan :

1. Sel adalah struktur yang kompleks

Meskipun seluruh sel tubuh dibentuk dengan informasi genetik yang sama, fungsi masing-masing sel mengemban tugas berbeda. Misalnya, sel jantung seperti kardiomyosit berfungsi untuk berdenyut. Dengan kesatuan sel membentuk jaringan jantung, berarti sel jantung berfungsi sebagai pompa untuk memompakan darah ke seluruh tubuh. Sedangkan sel epitel usus yang melapisi usus tersusun dengan sangat rapat menyerupai susunan batu bata berfungsi mengabsorpsi nutrisi makanan, karena pada ujung (apikal sel) terdapat mikrovili yang memudahkan proses absorpsi. Pada bagian

basal (bawah) sel usus ini mempunyai sejumlah besar mitokondria yang memberikan energi untuk kebutuhan proses transportasi membran, karena masing-masing mitokondrion tersusun atas sejumlah protein, termasuk enzim yang mensintesis ATP (adenosin trifosfat). Karena itu, struktur sel yang berbeda mengemban fungsi yang berbeda pula.

2. Sel memiliki program genetik

Pembentukan sel adalah berasal dari informasi genetik, yang tersimpan di dalam satu set kromosom yang menempati ruangan inti sel. Gen adalah unit terkecil penyimpan informasi genetik sebagai *blueprint* pembentuk struktur sel. Program pembentukan sel tersimpan dalam bentuk faktor transkripsi, menghasilkan berbagai bentuk sel berbeda, untuk mengemban tugas berbeda dalam jaringan berbeda, seperti diuraikan di atas. Sel jantung berfungsi untuk berdenyut, sel usus sebagai pengabsorpsi makanan.

3. Sel dapat berproliferasi untuk memperbanyak diri dan berdiferensiasi

Melalui proses pembelahan, satu sel induk menghasilkan dua sel anak. Pembelahan secara simetrik menghasilkan dua sel anak dengan volume yang hampir sama. Juga terdapat pembelahan asimetrik, dimana satu sel induk menghasilkan satu sel induk baru disebut proliferasi dan satu sel anak yang akan berdiferensiasi membentuk sel yang sama sesuai dengan lingkungan mikro sel anak ini berada. Plastisitas sel ini merupakan salah satu upaya sel untuk menggantikan sel yang mengalami kerusakan, melalui proses regenerasi.

4. Sel dapat menghasilkan dan menggunakan energi

Sumber energi yang diperoleh dari sinar matahari dapat disimpan melalui pigmen pengabsorpsi cahaya yang berada di dalam membran sel fotosintesis. Energi cahaya diubah menjadi energi kimia melalui proses fotosintesis, disimpan dalam bentuk sukrosa, karbohidrat kaya energi. Pada manusia, glukosa

yang disimpan di dalam hati masuk ke dalam darah untuk memberikan energi kimia bagi semua sel tubuh. Di dalam sel tubuh, energy ini disimpan dalam bentuk ATP, yang digunakan dalam bentuk energi.

5. Sel melaksanakan fungsi reaksi kimia

Sel mampu melaksanakan berbagai fungsi transformasi kimia karena adanya enzim. Enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia. Metabolisme sel menggambarkan besarnya reaksi kimia yang terjadi di dalam sel. Semakin besar metabolisme yang diemban oleh sel, semakin besar pula reaksi kimia terjadi.

6. Sel mampu melakukan berbagai aktivitas sel

Sel bersifat dinamik dalam fungsi atau aktivitasnya. Perubahan mekanik terjadi di dalam sel diawali perubahan bentuk protein sebagai motor penggerak. Protein penggerak hanya merupakan salah satu tipe mesin molekul penggerak sel dalam melaksanakan aktivitas mekanik.

7. Sel mampu memberikan respon terhadap stimuli

Sel mempunyai reseptor terhadap hormone, faktor pertumbuhan, dan materi ekstraseluler dan substansi dari sel lain. Karena itu, sel dapat memberikan respon melalui sel reseptor terhadap rangsangan yang mengubah aktivitas metabolisme, pembelahan sel dan pergerakan serta bunuh diri.

8. Sel mampu mengatur sendiri

Bukti pengaturan sel dapat dilihat ketika terjadi kerusakan. Kegagalan koreksi pada tingkat sel dapat terjadi akibat kegagalan duplikasi pada DNA, sehingga terjadi mutasi, yang mengakibatkan gangguan pada pengaturan pertumbuhan sel yang dapat berubah menjadi sel kanker. Karena itu, semua informasi dari sel berada di dalam asam nukleat, yang menghasilkan protein yang membentuk sel.

9. Sel dapat berkembang

Perkembangan sel dapat dilihat dari struktur

yang berbeda antara sel yang lebih sederhana, seperti sel prokariotik pada bakteri. Sel yang lebih kompleks seperti sel eukariotik, termasuk gunfi, tumbuh-tumbuhan, dan hewan. Sel prokariotik pertama kali muncul dimuka bumi sekitar 2,7 miliar tahun yang lalu, seperti pada mikroba yang telah menjadi fosil, termasuk sianobakteri. Sedangkan sel eukariotik diperkirakan telah ada di bumi lebih dari 1 miliar tahun lalu.

PEMBELAHAN SEL

Jumlah sel dalam tubuh seseorang kurang lebih 100 trilion sel. Pertumbuhan dan reproduksi adalah sifat dasar semua makhluk hidup. Ketika protein, asam nukleat, karbohidrat, dan lipid dibentuk yang baru, volume sel bertambah, membran plasma mengembang untuk mencegah sel pecah. Namun, ukuran pertambahan sel mencapai satu ukuran maksimal ketika sel terus tumbuh berkembang, hingga rasio permukaan dan volume mengecil dengan kapasitas pertumbuhan dipengaruhi lingkungan.¹ Karena itu, pertumbuhan sel diikuti dengan pembelahan, dengan menghasilkan dua sel anak (Gambar 1).

Gambar 1. Skema pembelahan mitosis dari satu sel induk menghasilkan dua sel anak melalui proses replikasi DNA secara semikonservatif. Pembelahan meiosis adalah pembelahan dari satu sel induk disebut stem cell yang berada di dalam zigot dapat membelah menjadi satu sel induk lain dan sel anak. Proses pembelahan dari satu sel induk menjadi sel induk lain disebut proliferasi untuk mempertahankan identitas sel sedangkan sel anak akan berdiferensiasi membentuk sel lain sesuai dengan lingkungan mikro, bertujuan untuk proses regenerasi.

Siklus sel

Siklus sel dimulai ketika dua sel baru yang dibentuk dari hasil pembelahan satu sel induk dan berakhir ketika salah satu sel anak membelah menjadi dua sel. Keseluruhan siklus pembelahan sel dapat terjadi di dalam tubuh atau pada piring kultur.

Siklus sel dibagi atas 2 fase berdasarkan aktivitas sel yang tampak di bawah mikroskop cahaya yaitu fase M dan interfase. Fase M terjadi ketika terjadi proses pembelahan nukleus diikuti pembelahan sitoplasma. Pembelahan nukleus disebut mitosis (Gambar 2), dan pembelahan sitoplasma dikenal sebagai pembelahan menghasilkan dua sel anak disebut sitokinesis. Sedangkan interfase adalah periode di antara pembelahan sel, yaitu terjadi pertumbuhan sel karena adanya aktivitas metabolik, yang berlangsung dalam hitungan hari, minggu atau lebih lama, bergantung pada tipe dan kondisi sel.

Inti pembelahan mitosis terdapat di dalam kromosom. Mitosis diawali dengan kondensasi kromosom yaitu melingkar dan melipat dari kromatin sel (Gambar 3).¹ yang membentuk kromosom yang dapat dilihat di bawah mikroskop cahaya.

Gambar 2. Empat fase siklus sel. Fase G (gaps) memisahkan kejadian pada fase S dengan fase M. G₁ adalah gap antara fase M dan fase S, sedangkan G₂ gap antara fase S dan fase M.

Dua kromosom yang terbentuk dari hasil pembelahan dikenal *sister chromatid*. Kromatid membentuk *mitotic spindle* yang dapat terpisah membentuk dua kromosom karena saling bergerak ke arah berlawanan. Ketika proses mitosis telah selesai, diikuti sitokinesis membentuk dua sel anak.

Secara rinci, fase M terdiri dari 5 fase. Awal mitosis dikenal sebagai profase, ketika kromosom berkondensasi pada satu tempat yang dapat dilihat di bawah mikroskop cahaya. Karena molekul DNA kromosom telah mengalami replikasi pada fase S, kromosom profase tersusun atas dua *sister chromatid*, melekat kuat satu sama lain. Pada awal profase, sentrosom yang mengalami duplikasi pada fase S mulai terpisah satu sama lain dan bergerak ke arah berlawanan dari nukleus dan kedua kromosom tersusun atas dua *sister chromatid*. Pada fase prometaphase, *sister chromatid* melekat pada *mitotic spindle*, suatu microtubule pada kedua kutub. Terjadi fragmentasi membran nukleus envelope. Fase metaphase terjadi ketika *sister chromatid* melekat pada kutub berlawanan dari *spindle*. Kohesi *sister chromatid* terlepas sehingga terbentuk fase anafase, yang memisahkan *sister chromatid*. Fase anafase merupakan fase paling singkat, berlangsung beberapa menit. *Spindle* atau benang kromatin yang terpisah namun kromosom menyatu dalam satu nukleus yang terpisah dikenal fase telofase. Pada fase ini, kromosom anak telah mencapai kutub *spindle*. Pada sitokinesis, sel terpisah menjadi dua, sehingga terbentuk dua nukleus yang mewarisi satu dari dua nukleus (Gambar 4).²

Pada sel mamalia, fase M hanya berlangsung kurang dari 1 jam. Fase interfase berlangsung jauh lebih lama, meliputi fase S (Sintesis), fase G₁ terjadi sebelum fase S, dan G₂ memisahkan fase S dengan fase M berikutnya (Gambar 3).¹

Seluruh siklus sel di dalam kultur pada sel mamalia berlangsung 18-24 jam. Dengan diketahui waktu siklus total, maka dapat ditentukan waktu masing-masing fase berlangsung. Sel dipaparkan secara radioaktif dengan DNA diberi label radioaktif (3H-

thymidine) dalam waktu singkat, dan diperiksa di bawah autoradiografi. Dengan pemeriksaan radioaktif ini, biasanya fase S pada kultur berlangsung sekitar 0.33, artinya panjang fase S 6-8 jam. Fase M dapat ditentukan dari perkalian

lamanya waktu total dengan persentase sel pada masa pembelahan. Persentase ini disebut indeks mitotik. Indeks mitotik untuk sel mamalia berkisar 3-5% artinya fase M berlangsung 30-45 menit.

Gambar 3. Siklus sel eukariotik. (a) Fase M (mitotik), fase pembelahan sel merupakan fase terdiri dari proses saling tumpang tindih antara mitosis dan sitokinesis. Pada mitosis, benang mitotik berkumpul dari kromosom kondensasi menjadi dua nuklei sel anak ; sedangkan pada sitokinesis, sitoplasma membelah menjadi dua sel anak yang identik. (b) Antara pembelahan. Sel dalam interfase, adalah ketika fase S (antara replikasi nukleus DNA) dan dua fase “gap” yaitu G1 dan G2. Sel mengalami pertumbuhan sepanjang interfase, karena aktivitas metabolik tinggi.

Dikutip dari Hardin J and Bertoni G. *Becker's world of the cell. The cell cycle and mitosis*. 9 ed. Pearson Education, Inc., USA 2016; p. 714- 745.

Gambar 4. Fase M (mitosis) terbagi atas 5 fase; profase, prometafase, metafase, anafase, dan telofase. Pada masa transisi metafase ke anafase, terjadi perubahan biokimiawi yang cepat. Sel bisa berhenti pada metafase sebelum masa transisi ini, tetapi jika fase ini bisa dilewati, proses mitosis dapat berakhir pada seluruh fase termasuk sitokinesis dan masuk ke interfase.

Dikutip dari Alberts B et eds. *Molecular biology of the cell*. 5 ed. Garland Science. 2008, p. 1053-1114.

Dengan mempelajari siklus sel dari sel normal atau sel kanker yang diisolasi dan ditumbuhkan di dalam piring kultur plastik dengan media kultur yang diberi nutrisi dan faktor lain, maka dapat dipelajari fase pembelahan (Gambar 5).² Contoh, sel fibroblast manusia akan berhenti pembelahan secara permanen setelah 25-40 kali proses pembelahan, suatu proses dikenal sebagai *replicative cell senescence*.

Gambar 5. Sel mamalia berproliferasi di dalam kultur. Sel fibroblast tikus dilihat di mikroskop elektron.

Dikutip dari Alberts B et eds. *Molecular biology of the cell*. 5 ed. Garland Science. 2008, p. 1053-1114.

Fase G1 bergantung pada tipe sel, umumnya berlangsung 8-10 jam. Selama fase G1, ditentukan kapan sel membelah lagi. Pada fase G1, sel menunggu signal yang memicu masuknya kembali ke siklus sel. Masa ini dikenal sebagai fase G0 (G zero). Sel yang keluar dari siklus sel mengalami diferensiasi terminal, berarti sel tidak membelah lagi; seperti sel saraf, dengan daya diferensiasi rendah. Ada sel yang terhenti membelah pada G2. Namun, waktu G2 lebih pendek daripada G1 dan lebih seragam, biasanya berlangsung

4-6 jam.

Selain penggunaan mikroskop elektron untuk mengetahui proliferasi siklus ada media kultur. Sintesis DNA dapat dipelajari menggunakan analog timidin, sebagai pengganti timidin radioaktif. Sel diinkubasi selama fase S dengan 5-bromodeoxyuridine (BrdU) atau 5-ethynyl- 2'- deoxyuridine (EdU), yang masuk ke dalam DNA. Dengan mikroskop *fluorescence* dan pewarnaan *immunostaining* (jika menggunakan BrdU) atau reaksi kimia jika menggunakan EdU, dapat ditentukan sintesis DNA dalam siklus sel.¹

Sebagai implikasi adalah pemahaman proses regenerasi pada sel. Misalnya, dengan menggunakan kultur sel kardiomyosit (sel otot jantung) di dalam media kultur secara *in vitro*, dan ditambahkan sejenis protein parakrin, C3orf58, suatu hypoxia and Akt induced stem cell factor (HASF) yang baru dihasilkan *mesenchymal stem cell*, Beigi et al., mengubah siklus sel kardiomyosit yang bersifat *dormant* sesudah lahir menjadi sel yang mampu masuk ke dalam siklus sel dengan sintesis DNA meningkat sebesar 60%, diukur menggunakan bromodeoxyuridine (BrdU) (Gambar 6).³

Dari hasil pemeriksaan kardiomyosit neonatal secara *in vitro*, peneliti melanjutkan penelitian pada hewan coba mencit secara *in vivo* menggunakan overekspresi HASF. Mencit wild type (WT) (sham operated) sebagai kontrol atau mencit transgenic(Tg) overekspresi HASF yang telah dilakukan infark miokard atau injuri pada kardiomyosit, disuntikan EdU or BrdU secara intraperitoneal untuk mengukur sintesis DNA dua hari setelah pembedahan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sintesis DNA meningkat secara signifikan pada kardiomyosit dewasa pada mencit overekspresi HASF dibandingkan dengan mencit wild type (infark miokard sebesar 54%) dengan nilai $p < 0.05$ (Gambar 7).³

Gambar 6. HASF meningkatkan sintesis DNA pada kardiomyosit neonatal secara *in vitro*. A, Ambilan BrdU oleh kardiomyosit neonatal diukur dengan ELISA. FGF1 (5,8 nmol/L) sebagai kontrol positif. B, Image representatif kardiomyosit BrdU+ dengan atau tanpa pengobatan hypoxia and Akt induced stem cell factor (HASF) dilihat di bawah mikroskop konfokal. Pembesaran dapat dilihat pada gambar inset di sebelah kanan. C, perhitungan kardiomyosit neonatal BrdU + cTnT + 7 hari setelah pengobatan dengan HASF. Cardiac troponin T (cTnT; merah), BrdU (hijau), dan nuclear 4',6-diamidino-2-phenylindole (biru). * $P < 0.05$ versus tidak diberi pengobatan.

Dikutip dari Beigi F, Schmeckpeper J, Pow-anpongkul P, Payne JA, Zhang L, Zhang Z, Huang J, Mirotso M, Dzau VJ. *C3orf58, a novel paracrine protein, stimulates cardiomyocyte cell-cycle progression through the PI3K-AKT-CDK7 pathway.* Circ Res. 2013;113:372-380.

Gambar 7. Hypoxia and Akt induced stem cell factor (HASF) menginduksi sintesis DNA pada kardiomyosit dewasa secara *in vivo*. A. Image representatif jaringan jantung dewasa pada area perinfark 2 minggu pasca infark miokard (MI) dilihat di bawah mikroskop konfokal ($\lambda \sim 40$), menunjukkan proliferasi kardiomyosit cTnT+ 9 panah putih dan proliferasi cTnTneg nonkardiomyosit (panah kuning). Contoh kardiomyosit proliferasi (kotak) dapat dilihat pada inset yang diperbesar di bawah. 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (merah), cardiac troponin T (cTnT; hijau) dan lamini (Lam; biru). B, perhitungan jumlah total EdU+ atau BrdU + dari kardiomyosit cTnT+ yang berproliferasi. ‡ $P \leq 0.05$ for ‡Tg versus WT untuk efek pengobatan for dan * $P \leq 0.05$ untuk Tg-MI versus WT-MI.

Dikutip dari Beigi F, Schmeckpeper J, Pow-anpongkul P, Payne JA, Zhang L, Zhang Z, Huang J, Mirotso M, Dzau VJ. *C3orf58, a novel paracrine protein, stimulates cardiomyocyte cell-cycle progression through the PI3K-AKT-CDK7 pathway.* Circ Res. 2013;113:372-380.

Selain itu, siklus sel juga dapat dipelajari dengan alat flow cytometry. Flow cytometry adalah suatu teknik pengukuran (*metry*) terhadap sifat sel (*cyto*) ketika sel bergerak di dalam aliran cairan (*flow*).⁴ Pemeriksaan ini juga memungkinkan analisis kimia pada satu sel.¹ Proses pemisahan sel dengan

menggunakan pewarna *fluorescence* atau antibody dengan flow cytometry dikenal sebagai *fluorescence-activated cell sorting* (FACS). Dengan menggunakan FACS Calibur, saya dapat mempelajari marker stem cell endotel yaitu CD34⁺ sebagai antigen. Dengan menggunakan *monoclonal antibody*, memungkinkan pemeriksaan stem cell CD34⁺ seseorang, sehingga saya dapat mengetahui kapasitas regeneratif stem sel.

STEM CELL

Sel membentuk berbagai jaringan tubuh dapat menjalankan berbagai fungsi berbeda. Misalnya, sel saraf mengirimkan sinyal elektrik, sel retina merespon terhadap cahaya. Sel tulang sebagai penyangga tubuh dan mengatur kadar kalsium, sel darah merah

mengangkut oksigen, dan sel otot berfungsi untuk pergerakan.

Apa yang membedakan stem cell dari sel. Apa yang membuat sel dalam berbagai jaringan memiliki fungsi yang berbeda dengan proses siklus sel yang sama? Mengapa hal ini bisa terjadi?

Semua jenis sel didalam tubuh berasal dari stem cell selama proses perkembangan fetus. Terdapat tiga sifat yang membedakan stem cell dengan sel :

1. Mampu memperbanyak diri (self renewal) dan berdiferensiasi menghasilkan sel anak.
2. Dalam kondisi tidak berdiferensiasi (unspecialized).
3. Dapat berdiferensiasi menjadi jenis sel lain dalam kondisi sesuai.⁵

Gambar 8. Sel niche (hijau) terdapat di *basement membrane* memberi signal ke stem cell (merah) untuk memblokir diferensiasi dan mengatur pembelahan. Jika mekanisme *lineage* dominan (sel mitotik rendah), stem cell membelah dengan satu sel anak berhubungan dengan *niche*, sedangkan sel lain (kuning) mengadakan diferensiasi. Ketika mekanisme populasi dominan (sel mitotik tinggi), pembelahan stem cell dapat berlangsung simetrik atau asimetrik (tidak ditunjukkan), bergantung pada faktor lokal. ECM, extracellular matrix.

Dikutip dari Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414: 98-104.

Dengan sifat ini, stem cell merupakan sumber pengganti sel dengan potensi mengobati berbagai penyakit pada manusia. Misalnya, terdapat dua juta stem cell di dalam sumsum tulang membelah setiap detik untuk mempertahankan jumlah sel darah merah yang memadai di dalam tubuh. 1 Stem cell berada di dalam “niche” atau lingkungan mikro jaringan seperti di sumsum tulang dalam kondisi “diam” atau “dormant”, namun dapat diaktivasi masuk ke dalam siklus sel atau setelah mengalami injuri.^{6,7}

Meskipun penggunaan stem cell baru berkembang dalam satu atau lebih dekade ini, stem cell sebenarnya telah dikenal lebih dari satu abad yang lalu oleh Alexander A. Moximow.⁸ Dalam 2 dekade ini, embryonic human stem cell dapat dikultur di luar tubuh sehingga dapat dipelajari perilaku stem cell, dilakukan rekayasa genetik atau diubah menjadi tipe sel lain dengan faktor kimia, sehingga dapat digunakan sebagai awal perkembangan terapi stem cell.⁹

Telah diketahui bahwa stem cell bersifat *self renewal*, berproliferasi untuk memperbanyak diri dan berdiferensiasi, karena stem cell sendiri dalam kondisi *undifferentiated*. Hanya saja, perlu diketahui bahwa stem cell pada tahap perkembangan yang berbeda memiliki kapasitas *self renewal* dan diferensiasi berbeda. Karena itu, jenis stem cell mana terbaik digunakan dalam aplikasi klinis masih menimbulkan perdebatan.

JENIS STEM CELL

Tiga jenis stem cell yang telah digunakan dalam penelitian : stem cell dewasa (adult stem cell), stem cell embrio (embryonic stem cell, ESC) dan induced pluripotent stem cell. Embryonic stem cell biasanya berasal dari hasil invitro fertilization (IVF), atau hasil fertilisasi secara *in vitro* dikenal sebagai bayi tabung, yang disumbangkan untuk penelitian dengan *informed consent* dari donor. ESC berasal dari *inner cell mass* blastocyst yang mempunyai sifat pluripoten, artinya dapat membentuk

ketiga lapisan sel germinal, baik endoderm, mesoderm dan ectoderm (Gambar 9).¹⁰

Gambar 9. Embryonic stem cell berasal dari *inner cell mass* blastocyst; sel yang menyusun *inner cell mass* diisolasi dan dikultur pada media kultur, dengan selapis feeder cells.

Dikutip dari Gearhart J. *New human embryonic stem-cell lines -more is better.* *N Engl J Med* 2004; 350: 1275-1276.

EMBRYONIC STEM CELL

Embryonic stem cell (ESC) pertama kali diisolasi dari mencit tahun 1981 oleh Martin Evans, dan Kaufman yang diperoleh dari blastocyst.¹¹ ES lines yang dikultur di media membuka lembaran baru untuk mendapatkan stem cell pluripotent yang dapat menghasilkan

semua jenis tubuh.¹² Meskipun diferensiasi ESC ini dapat membentuk tumor teratoma pada tempat ektopik, namun lebih mudah dikontrol daripada sel embryonic carcinoma.¹³ Tahun 1998, James Thomson melaporkan pertama kali penemuan embryonic stem cell manusia dan sejak itu, terapi stem cell mendapat perhatian dari para ilmuwan dan publik.⁹ Satu tim peneliti dari *Advanced Cell Technology* melaporkan bahwa transplantasi menggunakan

embryonic stem cell pluripoten yaitu sel retinal pigment epithelial (RPE) pada pasien dengan degenerasi makula mendapatkan perbaikan tajam penglihatan 4 bulan tanpa pembentukan tumor atau rejeksi imun. (Gambar 10).¹⁴ Hasil penelitian yang juga dilaporkan kelompok peneliti yang sama mendapatkan keamanan penggunaan hESC jangka panjang pada pasien dengan degenerasi makula dan distrofi makula Stargardt.¹⁵

Gambar 10. Tempat transplantasi hESC-RPE (human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium) pada pasien distrofi makula Stargardt. Foto fundus berwarna pada makula kiri sebelum dan sesudah operasi (A-C). Regio di dalam kotak adalah batas transplantasi yang dilakukan sesuai dengan tempat atrofi makula. (A) image makula dengan RPE dan atrofi makula neurosensori sebelum operasi (baseline). Tampak berkurangnya pigmentasi, menunjukkan regio atrofi RPE *baseline*. Pigmentasi ini meningkat pada minggu ke 3 sesudah operasi (C). (D-G) foto fundus berwarna dan image SD-OCT pada *baseline* (D) dan bulan ke 3 setelah transplantasi (F). Image berwarna menunjukkan peningkatan pigmentasi pada level RPE dari *baseline* ke bulan ke 3. Image SD-OCT (E,G) menunjukkan peningkatan pigmentasi pada level RPE dengan *engraftment* RPE satu lapis normal, dan survival pada bulan ke 3 (panah) dekat regio membrane Bruch tanpa RPE. hESC=human embryonic stem cells. RPE=retinal pigment epithelium. SD-OCT=spectral domain ocular coherence tomography.

Dikutip dari Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 2012; 379: 713–20.

Gambar 11. Sumber stem cell digunakan untuk perbaikan fungsi jantung. Yang termasuk bone marrow-derived stem cell mencakup *hematopoietic stem cell*, *endothelial progenitor cell* dan *nonhematopoietic stem cell* (*mesenchymal stem cell*, dan *unfractionated mononuclear cell*).

Dikutip dari Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure. A comprehensive overview of experimental and clinical studies. Current challenges, and future directions. *Circ Res*. 2013;113:810-834.

Karena itu, embryonic stem cell dapat digunakan dalam kedokteran regeneratif sebagai sumber sel baru untuk berbagai penyakit yang memerlukan perbaikan dan pergantian jaringan akibat hilangnya atau disfungsi jaringan oleh berbagai penyakit kronik^{14,14}

Optimisasi kultur human embryonic stem cell (hESCs) lines atau embryonic stem cell manusia secara *in vitro* telah mengalami

perkembangan dalam satu dekade ini. hESC semula dikultur menggunakan media pertumbuhan mengandung *fetal calf serum* atau derivat hewan lainnya, bersama dengan selapis fibroblast sebagai “feeder” cell untuk menopang faktor pertumbuhan (Gambar 9).¹⁰ Penggunaan produk hewan menghalangi penggunaan dalam terapi, karena dikhawatirkan adanya patogen hewan atau terkontaminasi prion selama kultur. Karena itu, dikembangkan serum bukan produk hewan

(xeno-free) malah media tanpa serum (serum-free) yang digunakan sekarang agar dapat digunakan dalam klinis.¹⁶

Kardiomiosit yang diperoleh dari hESC, diisolasi dari *embryoid bodies* melalui metode diseksi mekanik atau enzimatis,¹⁷ memperlihatkan morfologi kardiomiosit dewasa dengan struktur sarkomerik dan ekspresi faktor transkriptor seperti NK2 homeobox 5 (Nkx2.5), GATA binding protein (GATA-4), myocyte-specific enhancer factor 2C (MEF2C).¹⁸ Sel ini juga memperlihatkan aktivitas denyutan spontan dengan potensial aksi atrium, ventrikel dan nodal.^{19,20} Dalam studi Manard et al., menggunakan ESC jantung mencit, ditransplantasikan ke miokard domba dengan infark mengalami diferensiasi menjadi kardiomiosit dan meningkatkan fungsi jantung.²¹ Penelitian Cai et al., melaporkan bahwa terjadi pembentukan graft kardiomiosit dengan penggunaan kardiomiosit diperoleh dari ESC pada mencit, menyebabkan perbaikan fungsi jantung dan pengurangan remodeling, namun terjadi pembentukan teratoma, tumor pada jantung.²²

Meskipun kapasitas ESC dapat berdiferensiasi menjadi jantung, masalah etika dan kekhawatiran biologik seperti pembentukan teratoma, dan rejeksi graft,²³ menghalangi penggunaan terapi embryonic stem cell pada pasien.²⁴ Pembentukan teratoma mencegah penggunaan ESC dalam uji klinis, meskipun dilakukan manipulasi ESC.^{25,26} Belum ada satu uji klinis yang menggunakan ESC pada penyakit kardiovaskuler sampai saat ini. Namun dalam kurun waktu 2 dekade belakangan ini, penggunaan adult stem cell telah dilakukan pada beribu-ribu pasien dengan hasil aman digunakan, sehingga memungkinkan uji klinis fase II dan fase III.²⁴

ADULT STEM CELL

BONE MARROW-DERIVED STEM CELL

Sumsum tulang mengandung adult stem cell; hematopoietic stem cell dan nonhematopoietic

stem cell, yang berpotensi berdiferensiasi menjadi fenotipe stem cell (Gambar 11).²⁴ Stem cell di dalam sumsum mudah diperoleh baik dengan cara sentrifugasi gradient atau mobilisasi, sehingga banyak digunakan dalam penelitian preklinis dan klinis.²⁴

Yang termasuk kelompok Bone Marrow-Derived Stem Cell adalah :

HEMATOPOIETIC STEM CELL

Hematopoietic stem cell (HSC) adalah satu-satunya sel di dalam sistem hematopoietik yang mempunyai sifat multipotensi dan self renewal. Multipotensi berarti kemampuan berdiferensiasi menjadi seluruh sel darah, sedangkan *self-renewal* adalah kemampuan untuk menghasilkan sel yang identik dengan HSC tanpa diferensiasi.²⁷ Konsep *hematopoietic stem cell* pertama kali disampaikan oleh James Till dan Ernest McCulloch dari hasil penelitian terhadap sistem regenerasi di dalam darah mencit.²⁷

Darah merupakan komponen sel yang mempunyai daya regenerasi amat tinggi. Setiap hari sebanyak 1 trillion sel darah (10^{12}) dihasilkan oleh sumsum tulang. Namun para ahli anatomi memperhatikan adanya morfologi sel dan tingkat diferensiasi yang berbeda di dalam sel sumsum tulang. Dr. Alexander Maximow, pertama sekali mengemukakan bahwa keberagaman sel di dalam sumsum tulang berasal dari proses hematopoiesis yang tersusun di dalam satu sel prekursor dikenal sebagai hematopoietic stem cell (HSC). Maka lahir istilah stem cell tahun 1909, yang disampaikan ilmuwan Rusia ini.²⁸

Kejadian jatuhnya bom atom di Hiroshima dan Nagasaki tahun 1945 mengakibatkan ratusan ribu korban. Penelitian retrospektif menunjukkan bahwa para korban meninggal dengan dosis radiasi terkecil akibat gagal hematopoietik. Namun, banyak di antara yang selamat menderita leukemia akibat radiasi. Pengamatan dengan mikroskop menunjukkan bahwa sumsum tulang normal bersifat

radiosensitif.²⁹ Ray Owen tahun 1945 mengamati bahwa sapi kembar jantan yang memiliki satu plasenta dapat saling membagi sel darah.³⁰ Pengamatan ini mendasari penelitian Medawar dan Bellingham tahun 1953 yang mendapatkan graft kulit pada kembar heterozigot dan homozigot (identik) hampir dapat ditoleransi dalam sel hematopoietik. Penemuan Medawar ini menghantarkan beliau mendapat hadiah Nobel bidang kedokteran tahun 1960.³⁰

Penelitian pada mencit tahun 1950 mendapatkan bahwa sindroma radiasi dapat dicegah dengan melindungi limpa dengan tembaga,³¹ atau menyuntikan sel limpa atau sumsum tulang.^{32,33} Hasil penelitian membuka jalan perkembangan transplantasi sel hematopoietik.³⁰ Pengamatan Till dan McCulloch tahun 1961 dari penelitian menggunakan mencit yang diberi sel sumsum dari mencit lain (alogenik) mendapatkan bahwa di dalam limpa mencit resipien terbentuk koloni sel pada hari ke 10.³⁴ Koloni sel dinamakan colony-forming cell spleen (CFU-S) yang terdiri dari berbagai sel diferensiasi. Till dan McCulloch mengusulkan bahwa koloni sel ini adalah *hematopoietic stem cell*, karena sel ini bersifat *self-renewal* dan mampu menghasilkan semua jenis darah.³⁰ Penelitian berikutnya membuktikan bahwa CFU-S adalah sel klonogenik tunggal, yang mampu menghasilkan lebih banyak *myeloerythroid colony-forming cells* pada mencit yang diradiasi dengan dosis subletal.³⁵ Penelitian secara *in vivo* dilanjutkan oleh Pluznik dan Sachs, yang meneliti karakteristik HSC dan mengidentifikasi growth factor yaitu G-CSF untuk sel hematopoietik. Dalam perkembangan selanjutnya, dapat diidentifikasi CD34 sebagai marker HSC dan progenitor cells.³⁶

Weissman dan kolega menggunakan monoclonal antibody mengisolasi repopulating cells jangka panjang pada mencit,³⁷ dan mendapatkan bahwa stem cell terdapat di dalam satu populasi dengan marker : c-Kit+, Thy-1.1, lineage marker^{neg}, dan Sca+ (KTLS). Populasi HSC ini bersifat *multilineage* pada mencit karena mampu melakukan rekonstitusi

jangka panjang (3 bulan) pada seluruh sistem hematopoiesis pada mencit yang diberikan penyinaran dosis mematikan meskipun jumlahnya hanya 0.05% dari sel sumsum tulang.³⁰ Osawa et al., melakukan isolasi HSC mencit dengan efisiensi cloning 90% secara *in vitro* dan memberikan kepada mencit yang telah mendapat penyinaran dosis letal, juga mampu menginduksi hematopoiesis.³⁸

Hal yang sama terjadi pada manusia. Dengan pemurnian HSC yang menunjukkan marker CD34+, Thy⁺, Lin⁻, CD38- dan CD34RA⁻, diberikan kepada mencit dengan gangguan imun berat (*severe combined immunodeficiency*, SCID), mampu menimbulkan hematopoiesis.²⁷ Hal ini menunjukkan bahwa populasi sel HSC manusia mempunyai kemampuan daya regenerasi meskipun sulit menentukan efek jangka panjang. Struktur hierarki perkembangan hematopoietik sebagai multipotensi secara progresif mengalami keterbatasan (Gambar 12).³⁰ Pada awalnya, HSC menghasilkan MPP (multipotent progenitors) yang tidak memiliki sifat *self-renewal*, namun berdiferensiasi dalam skala penuh, yaitu berdiferensiasi menjadi CLP (*common lymphoid progenitor*) dan CMP (*common myeloid progenitor*). Progenitor oligopotensi ini menghasilkan sel efektor *megakaryocyte/erythrocyte progenitors* (MEPs) and *granulocyte/macrophage progenitors* (GMPs), sedangkan CLL menghasilkan progenitor limfosit T dan B matang, natural killer (NK) cells. Sedangkan CLL dan CMP sama-sama menghasilkan sel dendritik (Gambar 12).³⁰

Marker sel permukaan pertama sekali diperoleh pada HSC manusia adalah CD34, suatu ligand L-selectin yang hanya berjumlah 0.5-5% dari sel darah di dalam hati fetus manusia, darah plasenta dan sumsum tulang dewasa.^{39,40,41} Semua sel CD34+ bersifat multipotensi²⁷ artinya dapat menghasilkan semua jenis sel darah juga sel endotel vaskuler, terutama pada ujung pembuluh darah, tempat proliferasi paling aktif terjadi.⁴² Sel endotel memiliki plastisitas tinggi untuk memberikan respon terhadap signal angiogenik.⁴³ Angiogenesis adalah proses pertumbuhan pembuluh darah melalui tumbuhnya percabangan

daripembuluh darah yang sudah ada.⁴³ Sel endotel menjadi motil, aktif membentuk filopodia akibat respon terhadap signal angiogenik, seperti vascular endothelial growth factor (VEGF), yang dihasilkan CD34⁺ stem cell. Melalui pembentuk ujung sel, terbentuk lumen dan berproliferasi untuk menopang pemanjangan lumen (Gambar 13B).⁴³ Ujung sel beranastomosis dengan

pertumbuhan sel lain membentuk loop pembuluh darah. Dengan masuknya aliran darah, pembentukan *basement membrane*, rekrutmen sel mural untuk menstabilkan hubungan, maka diakhiri dengan berhentiknya signal angiogenik, maka kondisi ini kembali menjadi tidak aktif (*quiescence*) setelah terbentuk pembuluh darah baru. (Gambar 13 C) (Gambar 14).⁴³

Hematopoietic Hierarchy

Gambar 12. Perkembangan hematopoietic menunjukkan hierarki diferensiasi hematopoietik. Pertama permukaan isolasi pada manusia (atas) dan mencit (bawah) menunjukkan stem dan progenitor cell. HSC menunjukkan rekonstitusi jangka panjang, self renewing; MPP, multipotent progenitor cell dengan self renewal terbatas ; CMP, common myeloid progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; BLP, B lymphocyte protenitor; ProT, T-cell progenitor; GMP, granulocyte/macrophage progenitor; MEP, megakaryocyte/erythroid progenitor; MkP, megakaryocyte progenitor; EP, erythroid progenitor.

Dikutip dari Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 2008;112:3543-3553.

Gambar 13. Pembentukan pembuluh darah (A) Angioblast berdiferensiasi menjadi sel endotel, membentuk cetakan pembuluh darah, lumen dan sebagai awal fenotipe arteri dan vena (B) Langkah pertumbuhan pembuluh darah : (1) seleksi ujung/batang sel; (2) navigasi ujung sel dan proliferasi batang sel; (3) koordinasi percabangan; (4) elongasi batang sel, fusi ujung sel dan pembentukan lumen ; dan (5) perfusi dan maturasi pembuluh darah. (C) Langkah sekuensi remodeling vaskuler dari primitif (kotak kiri) menjadi pleksus pembuluh darah yang matur (kotak kanan) termasuk fenotipe falang endotel, deposisi *basement membrane*, penutupan dengan perisit dan regresi percabangan.

Dikutip dari Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. Cell* 2011;146:873-887.

Gambar 14. Pembentukan ujung sel. (A) Sebagai respon terhadap rangsangan vascular endothelial growth factor (VEGF) sel endotel (EC) terlepas dari *basement membrane* dan perisit terlepas, memungkinkan sel endotel bermigrasi (B) VSGF/Notch signaling menyeleksi ujung dan batang sel (C) Filopodia mengarahkan ujung sel dengan melalui respon terhadap rangsangan. Pembentukan filopodia diatur oleh CDC42 dan endositosis reseptor EphrinB2/VEGFR2. Signaling ROBO4/UNC5B diperlukan untuk menstabilkan lapisan endotel dengan menghmbat SRC.

Dikutip dari Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. Cell 2011;146:873-887.

Gambar 15. Peran *endothelial progenitor cell* (EPC) terhadap biologi vaskuler. Penyuntikan EPC menyebabkan reendotelialisasi dan neovaskularisasi pembuluh darah setelah injuri.

Dikutip dari Urbich C, Dimmeler S. *Endothelial progenitor cells. characterization and role in vascular biology. Circ Res.* 2004;95:343-353.

Karena itu, CD34+ stem cell sebagai bagian dari *endothelial progenitor cell* dapat meregenerasikan sel endotel pada pembuluh darah yang mengalami iskemia melalui proses neovaskularisasi dan re-endoteliasasi (Gambar 15).^{44,45}

Transplantasi CD34+ secara autologous telah dilakukan pada pasien dengan kardiomiopati iskemik⁴⁶ dan noniskemik.^{47,48} Penyuntikan CD34+ stem cell ke area periinfark ketika dilakukan coronary bypass secara off-pump meningkatkan fungsi kontraksi dibandingkan hanya dengan *coronary bypass*.⁴⁶ Penelitian

menggunakan CD34+ atau CD133-, CD34+ secara intrakoronaria pada pasien dengan infark miokard anterior juga mendapatkan perbaikan perfusi regional dan remodeling ventrikel kiri.⁴⁹ Vrtoves et al., dalam penelitian terhadap pasien kardiomiopati noniskemik dengan menyuntikan CD34+ cell secara intrakoronaria juga mendapatkan peningkatan fraksi ejeksi ventrikel kiri dan jarak jalan 6 menit serta penurunan kadar N-terminal probrain natriuretic peptide.⁴⁷ Penelitian lebih lanjut oleh kelompok peneliti yang sama mendapatkan bahwa efek ini bertahan dalam jangka waktu 5 tahun dengan menurunnya angka kematian (Gambar 16).⁴⁸

Gambar 16. Survival dan penyebab kematian pada pasien diberikan stem cell CD34+ dan kontrol. Survival 5 tahun dievaluasi dengan analisis Kaplan-Meier mendapatkan 2,3 kali lebih tinggi pada kelompok stem cell dibandingkan dengan kelompok kontrol (kanan), terutama karena mortalitas akibat gagal pompa (kiri).

Dikutip dari Vrtovec B, Pogljajen G, Lezaic L, Sever M, Domanovic D, Cernelc P, Socan A, Schrepfer S, Torre Amione G, Haddad F, Wu JC. *Effects of intracoronary CD34+ stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up. Circ Res.* 2013;112:165-173.

Gambar 17. Insiden angina per minggu pada bulan 6 dan bulan 12.

Dikutip dari Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Lee JS, Costa MA, Bass T, Mendelsohn F, Fortuin FD, Pepine CJ, Traverse JH, Amrani D, Ewenstein BM, Riedel N, Story K, Barker K, Povsic TJ, Harrington RA, Schatz RA, the ACT34-CMI Investigators. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res.*2011;109: 428-436.

Penelitian Losordo et al., pada pasien angina refrakter menggunakan penyuntikan CD34+ intramiokard secara autologus dengan dua dosis; 1x10⁵ atau 5x 10⁵ cells/kg, terhadap 167 pasien mendapatkan penurunan frekuensi angina selama 6 bulan (6.8± 1.1 versus 10.9±1.2, P< 0.020) dan 12 bulan (6.3±1.2 versus 11.0± 1.2, P< 0.035), dan durasi *exercise treadmill test* meningkat selama 6 bulan (139±151 versus 69±122 detik, P<0.014; 12 bulan : 140±171 versus 58 ±146 detik, P< 0.017) (Gambar 17).

Penelitian kami mendapatkan bahwa pasien dengan angina refrakter yang tidak bisa dilakukan balonisasi dengan tindakan angiografi koroner atau coronary *bypass* dapat dilakukan penyuntikan molekul untuk meningkatkan jumlah CD34+ stem cell dalam tubuh. Kemudian dilakukan tindakan apheresis untuk memisahkan jumlah stem cell di dalam satu kantong, lalu dilakukan transplantasi secara intravena. Hasil penelitian ini mendapatkan bahwa pasien yang diberikan stem cell mendapatkan penurunan angina secara signifikan pada minggu keempat (dari

15.07±4.03 vs 3.27±1.49, p<0.001) (Gambar 18), juga perbaikan toleransi olahraga dari 5.90±2.53 menit menjadi 8.41 ± 2.49 menit, p< 0.001) (Gambar 19).⁵¹ Hasil penelitian ini telah dipresentasikan pada seminar Basic Cardiovascular Sciences (BCVS), American Heart Association (AHA) tertanggal 18-21 Juli 2016 di Phoenix, Arizona, Amerika Serikat. Metode penelitian yang bersifat non-invasif ini merupakan pertama dilakukan di dunia dengan mendapatkan hasil yang menggembirakan. Sehingga hasil penelitian ini terpilih sebagai salah satu yang terbaik oleh AHA, dan diundang untuk memberikan presentasi pada pertemuan *Scientific Sessions*, American Heart Association, bulan November 2016.

Dari berbagai penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa transplantasi CD34+ stem cell, baik yang berasal dari darah perifer maupun *bone marrow-derived stem cell* dapat digunakan pada berbagai kondisi penyakit jantung; infark miokard, gagal jantung iskemik dan noniskemik dan angina refrakter serta memberikan hasil yang baik untuk jangka pendek dan panjang.

Gambar 18. Frekuensi angina pada *baseline* dan minggu ke 4 pada pasien dengan angina refrakter setelah dilakukan transplantasi CD34+ stem cell (15.07 ± 4.03 versus 3.27 ± 1.49 , $p < 0.001$).

Dikutip dari Lim H, Lindarto D, Zein U, Hariaji I. *Intravenous mobilized autologous peripheral blood CD34+ stem cell transplantation for angina*.

Gambar 19. Exercise treadmill test menunjukkan perubahan signifikan pada durasi olahraga antara *baseline* dengan minggu ke 4 setelah dilakukan transplantasi stem cell (5.90 ± 2.53 versus 8.41 ± 2.49 , $p < 0.001$).

Dikutip dari Lim H, Lindarto D, Zein U, Hariaji I. *Intravenous mobilized autologous peripheral blood CD34+ stem cell transplantation for angina*.

NONHEMATOPOIETIC STEM CELL

MESENCHYMAL STEM CELL (MSC)

MSC, juga dikenal sebagai bone marrow stromal cells, adalah nonhematopoietic stem cell bersifat multipoten dan melekat pada kultur. MSC berdiferensiasi menjadi kondrosit, adiposit, osteoblast dan sel otot skeletal dan

dilaporkan berdiferensiasi menjadi kardiomyosit⁵² dan sel endotel,^{53,54} namun potensi kardiogenik ini masih kontroversial. 55 Ekspresi MSC secara khusus adalah CD105, CD73, CD90 dan STRO-1, tidak memiliki marker *hematopoietic* seperti CD45, CD34, dan CD14/11b).^{56,57} Selain terdapat di sumsum tulang, MSC juga dapat diisolasi dari darah perifer,^{58,59} darah tali pusat,⁶⁰ jaringan adiposa,⁶¹ jaringan sinovia,⁶² dan jaringan paru,⁶³ bersifat heterogen karena potensi pertumbuhan berbeda namun marker permukaan dan potensi diferensiasi sama.⁶⁴

Semua jaringan pembentuk MSC memiliki suplai pembuluh darah yang baik. Ketika sel perivaskuler diisolasi, dikultur dan diperiksa menggunakan dengan fluorescence activated cell sorting (FACS), maka tampak marker khas perisit dan MSC.⁶⁵ Karena itu, Caplan mengusulkan bahwa semua MSC adalah perisit.⁶⁶ Namun pericyte dengan diferensiasi tinggi bukan MSC. Dengan MSC sebagai perisit, maka MSC memiliki respon terhadap sel endotel. Perisit yang keluar dari pembuluh darah atau akibat inflamasi menjadi MSC. MSC aktif mensekresi dua jenis molekul bioaktif; imunomodulasi dan faktor trofik (Gambar 20).⁶⁷ Aktivitas imunomodulasi menghambat limfosit sehingga mencegah kerusakan jaringan, yang berpotensi menimbulkan reaksi autoimun. Molekul trofik menghambat apoptosis akibat iskemia, pembentukan jaringan parut (scar) dan meningkatkan angiogenesis dengan mensekresi vascular endothelial growth factor (VEGF), yang menarik sel endotel (Gambar 14).⁴³

Dengan fungsi ganda MSC tersebut, maka MSC merupakan ‘pabrik obat’ yang bersifat spesifik terhadap tempat injuri, berfungsi memperbaiki kerusakan jaringan di tempat yang dituju. Karena itu, kunci efikasi pengobatan MSC adalah membawa sedikit MSC ke tempat tujuan dengan mempertimbangkan tempat dan waktu yang tepat. Dengan demikian, MSC berfungsi sebagai pengantar sekresi beragam obat. Karena itu, Caplan menamakan MSC sebagai medicinal signaling cells (MSCs).⁶⁸ Pemahaman ini akan memberikan arah yang jelas terhadap penggunaan MSC untuk tujuan terapeutik.⁶⁷

Gambar 20. Injuri menginduksi pelepasan perisit yang menyebabkan MSC teraktivasi (A). MSC teraktivasi mensekresi sejumlah molekul bioaktif berperan sebagai (B) imunomodulasi dan trofik.

Dikutip dari Caplan AI. *MSCs: the new medicine*. In : Vertes AA eds. *Stem cells in regenerative medicine: science, regulation and business strategies*. Ed 1, John Wiley & Sons, Ltd, 2015, p. 415-421.

Berbagai penelitian preklinis dan klinis menunjukkan bahwa transplantasi MSC pada zona perbatasan infark miokard menunjukkan reduksi miosit yang mengalami apoptotik dan meningkatkan jumlah vaskularisasi,^{69,70} reduksi jaringan parut dan kardioproteksi. Amado *et al.*, menunjukkan bahwa dengan pencitraan *computed tomography* tampak restorasi kontraksi jaringan miokard pada penelitian menggunakan model babi.^{71,72} Gneccchi *et al.* mendapatkan bahwa penggunaan MSC dikultur di media hipoksik mengurangi apoptosis dan nekrosis pada kardiomyosit tikus yang dipapar dengan oksigen rendah.⁷³ MSC yang direkayasa dengan ekspresi Akt akan

meningkatkan kardioproteksi.⁷³ Kardioproteksi MSC secara *in vivo* mengurangi jumlah sel apoptotik pada tempat penyuntikan MSC.⁷⁴ Hal ini menunjukkan bahwa MSC dapat memproteksi atau mengurangi stimuli yang menyebabkan kerusakan miosit (Gambar 21).⁷⁵

Mekanisme kerja MSC terhadap penyakit kardiovaskular : reduksi fibrosis,⁷⁶ stimulasi angiogenesis,⁷⁷ dan restorasi fungsi kontraksi jantung melalui proses *engraftment*,⁵³ diferensiasi dan stimulasi *cardiac stem cell* secara endogen untuk proliferasi dan diferensiasi (Gambar 21).⁷⁵ Efek ini terjadi secara serentak dalam memperbaiki jaringan parut atau disfungsi miokard dengan jaringan kontraksi sehingga dapat memperbaiki perfusi jaringan. Sebagian besar studi mendapatkan bahwa *engraftment* terapi stem cell memperlihatkan retensi sel yang rendah. Toma *et al.*, mendapatkan bahwa setelah 4 hari, jumlah MSC yang ditransplantasi yang masih tertinggal didalam miokardium berkisar 0.44%.⁵³

Pada model kardiomiopati iskemik kronik dengan model babi, yang memiliki anatomi dan fisiologi seperti manusia,⁷⁸ Quevedo *et al.*, melaporkan bahwa MSC alogenik dapat mengadakan *engraftment* dan berdiferensiasi menjadi kardiomyosit, sel otot polos dan endothelium.⁸⁰ MSC sumsum tulang babi jantan yang disuntikan ke babi betina mendapatkan kolokalisasi dengan kromosom Y dengan pemeriksaan *fluorescence in-situ hybridization (FISH)*. Diferensiasi kardiomyosit didapati sebanyak 14% dengan kromosom Y positive pada MSC yang diidentifikasi dengan *costaining* untuk protein struktur jantung α -sarcomeric actinin dan tropomyosin, faktor transkripsi GATA-4 dan Nkx2.5.⁷⁹ Meskipun *engraftment* dan diferensiasi MSC rendah dibandingkan dengan pemulihan fungsional jantung setelah transplantasi sel, maka timbul pertanyaan apakah *engraftment* dan diferensiasi merupakan faktor dominan ?⁸⁰

MSC dapat menghasilkan sejumlah *soluble paracrine factors* yang berkontribusi terhadap kardiomyogenesis dan angiogenesis.^{73,81,82,83,84,85} MSC juga mensekresi sejumlah

sitokin dan *growth factor* yang menekan sistem imun, inhibisi fibrosis dan apoptosis, meningkatkan angiogenesis dan merangsang diferensiasi stem cell yang spesifik terhadap jaringan.^{86,87} Pemberian MSC intramiokard pada model babi dengan infark miokard dapat mengurangi besarnya infark dengan merekrut *cardiac stem cell* c-kit endogen, sedangkan pemberian media kultur MSC tidak memberikan efek.⁸⁸ Hal ini menunjukkan bahwa efek parakrin MSC merupakan mekanisme kerja utama yang mendasari

perbaikan fungsi dan regenerasi jaringan miokard (Gambar 21).⁷⁵

Sejak 2011, MSC dan preparat sel kultur telah diuji untuk gagal jantung kronik dengan jumlah sampel kecil. Uji klinis ini secara konsisten menunjukkan bahwa sel terapi dapat mengurangi ukuran jaringan parut infark miokard, memulihkan remodeling ventrikel, meningkatkan jarak jalan 6 menit dan meningkatkan kualitas hidup diukur dengan kuesioner (Tabel 1).^{89,90,91,92,93,94}

Gambar 21. Mekanisme kerja *mesenchymal stem cell* (MSC). Mekanisme kerja MSC adalah membentuk efek parakrin, autokrin dan langsung yang menginduksi regenerasi vaskuler, proteksi miokard, regenerasi kardiomyosit yang menyebabkan perbaikan jantung. Miro 1: mitochondria Rho-GTP ase.

Dikutip dari Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res.* 2015;116:1413-1430.

Tabel 1. Terapi Stem Cell pada Gagal Jantung Kronik

Nama uji klinis (Jumlah Pasien)	Δ 6MWT	Δ MLHFQ	Δ MI SIZE	Δ EF
Williams et al ⁶ (n=8)	...	...	-18.3 $\pm$ 8.3%	...
SCIPIO ²⁰ (n=21)	...	-19.8	-9.8 $\pm$ 3.5 g (-30%)	+8-12.3%
MESOBLAST ²³ (n=60)	+52.5 m*	...	...	+5.2 $\pm$ 9.3%*§
CADUCEUS ¹⁸ (n=25)	+33.0 m	-10.8†	-12.9 g (-42%)	†
POSEIDON ¹⁶ (n=30)	+43.5 m	-7.6	-33.21%	+2.0%*†
C-CURE ¹⁹ (n=33)	+62.0 m	$\pm$ 10*†	...	+7.0%
TAC-HFT ¹⁷ (n=59)	+32.6 m†	-6.3	-12.6 g (-32.9%)	†
MSC-HF‡ (n=59)	...	...	-4.4 $\pm$ 5.1 g	+5.5 $\pm$ 3.8%

6MWT : 6-minute walk test; C-CURE, Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE; CADUCEUS, CARDiosphere-Derived aUtologous Stem CELls to Reverse ventricUlar dySfunction; EF, ejection fraction; MESOBLAST, A Phase II Dose-escalation Study to Assess the Feasibility and Safety of Transendocardial Delivery of Three Different Doses of Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells (MPCs) in Subjects With Heart Failure; MI SIZE, myocardial infarction size/scar size; MLHFQ, Minnesota Living With Heart Failure Questionnaire MSC-HF, Mesenchymal Stromal Cells in chronic ischemic Heart Failure; POSEIDON, The Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects on Neomyogenesis Pilot Study; SCIPIO, Cardiac Stem Cell Infusion in Patients With Ischemic CardiOmyopathy; and TAC-HFT, The Transendocardial Autologous Cells (hMSC or hBMC) in Ischemic Heart Failure Trial.

*Tidak signifikan vs kontrol

†Tidak signifikan dalam kelompok.

‡Data tidak dipublikasi.

§25 juta kelompok sel precursor mesenchymal.

Dikutip dari Sanina C, Hare JM. Mesenchymal stem cells as a biological drug for heart disease. Where are we with cardiac cell-based therapy? *Circ Res.* 2015;117:229-233.

Gambar 22. Jumlah uji klinis MSC (Mesenchymal Stem Cell) (n=34) didapati pada clinicaltrials.gov penyakit jantung. Grafik bar menunjukkan jumlah uji klinis sesuai dengan fase klinis (A). Jumlah total pasien yang terdaftar sesuai dengan fase uji klinis (B). Jumlah rata-rata pasien yang terdaftar per uji (C). Diagram menunjukkan persentase rute pemberian sel dalam 34 uji klinis (intravena (IV), introkoronarier (IC), intramiokard (IM), dan transendokardial TE), D).

Dikutip dari Sanina C, Hare JM. Mesenchymal stem cells as a biological drug for heart disease. Where are we with cardiac cell-based therapy? *Circ Res.* 2015;117:229-233.

Saat ini tercatat pada *clinicaltrials.gov* sebanyak 34 uji klinis menggunakan MSC untuk berbagai gangguan jantung pada dewasa (infark miokard akut, gagal jantung iskemik, dan noniskemik). Kebanyakan studi masih dalam fase I dan II (Gambar 22A),⁹⁴ dan ada beberapa studi fase yang sedang berlangsung atau *ongoing* dan sudah selesai. Terdapat beragam uji klinis MSC. Ada 7 uji klinis bersifat *multicentered* dan 1 *double-centered*. Kebanyakan (27) adalah uji klinis skala kecil, dengan jumlah pasien < 100 per uji (Gambar 22 B dan C) dan hanya beberapa bersifat *placebo-controlled*. Rute MSC (intravena, intrakoronaria, intramiokard, transendokard; Gambar 22 D), dosis dan asal sel (fetal-umbilical vs dewasa, autologus vs allogenik, dan sumsum tulang vs adiposa). Hal ini mendasari beragam rancang studi, asal sel, dosis dan cara pemberian. Tahun 2009, uji klinis dengan MSC alogenik diberikan secara intravena menunjukkan pengurangan kejadian aritmia dan nyeri dada.⁹⁵ Uji ini merupakan awal penggunaan MSC alogenik pada penyakit jantung. Saat ini product MSC digunakan untuk uji klinis skala besar melibatkan ribuan pasien dan jika berhasil produk ini disetujui FDA.⁹⁵

MSC JARINGAN ADIPOSA

Jaringan adiposa mengandung sejumlah stem cell multipoten dikenal sebagai MSC jaringan adiposa, mampu bereplikasi menjadi sel tidak terdiferensiasi, adiposit dan berdiferensiasi menjadi sel lain sepanjang turunan mesenchymal. MSC jaringan adiposa dilaporkan dapat berdiferensiasi menjadi kardiomyosit⁹⁶ dan sel endotel,⁹⁷ memotivasi studi model gagal jantung pada hewan coba. Miyahara et al., mendapatkan bahwa transplantasi MSC lapisan tunggal ke dalam infark miokard dengan jaringan parut dapat memperbaiki dinding jaringan parut menipis dan memperbaiki fungsi jantung.⁹⁸ Studi lain membandingkan MSC jaringan adiposa dengan BMMNC (bone marrow mononuclear cell) pada model tikus dengan infark miokard kronik.⁹⁹ Satu bulan setelah transplantasi, MSC adiposa dapat menginduksi perbaikan fraksi ejeksi ventrikel kiri, meningkatkan

angiogenesis dan mengurangi fibrosis secara signifikan dibandingkan dengan sel kardiomiogenik adiposa atau BMMNC. Studi A Randomized Clinical Trial of Adipose-derived Stem Cells in Treatment of Non Revascularizable Ischemic Myocardium (PRECISE) oleh Perin et al., merekrut 27 pasien mendapatkan bahwa penggunaan sel adiposa dapat menstabilkan besarnya infark dan meningkatkan konsumsi oksigen maksimal.¹⁰⁰

UNFRACTIONIZED BONE MARROW-DERIVED STEM CELL

Hasil meta-analisis yang dilakukan Afzal et al., dimuat di *Circulation Research*, jurnal ranking No 1 di dunia dalam penelitian kardiovaskuler, melibatkan 48 studi acak tersamar mendapatkan bahwa transplantasi sel sumsum tulang (bone marrow cell) pada pasien penyakit jantung iskemik meningkatkan fraksi ejeksi ventrikel kiri (left ventricular ejection fraction, LVEF) sebesar 2.92% (95% confidence interval, 1.91–3.92; $p < 0.00001$) (Gambar 23)¹⁰¹, mengurangi besarnya infark (infarct size) sebesar –2.25% (95% confidence interval, –3.55 s/d –0.95; $p = 0.0007$), mengurangi volume sistolik akhir (left ventricular end-systolic volume, LVESV) sebesar –6.37 mL (95% confidence interval, –8.95 s/d –3.80; $p < 0.00001$), dan cenderung mengurangi volume diastolik akhir ventrikel kiri (left ventricular end-diastolic volume, LVEDV) sebesar –2.26 mL (95% confidence interval, –4.59 s/d 0.07; $p = 0.06$) (Tabel 2).¹⁰¹ Terapi sel sumsum tulang aman dilakukan dan meningkatkan outcome klinis, termasuk menurunkan angka mortalitas, infark miokard rekuren, aritmia ventrikel dan kejadian serebrovaskuler selama follow-up. Efek ini dianalisis menggunakan *magnetic resonance imaging* (MRI), merupakan pencitraan canggih dalam menganalisis perbaikan struktur dan fungsi jantung. Kesimpulan meta-analisis ini memberikan petunjuk bahwa terapi stem cell merupakan modalitas pengobatan dalam meningkatkan fungsi jantung melalui proses regenerasi jaringan jantung dan efek parakrin yang merangsang *cardiac stem cell* dan faktor parakrin yang menyebabkan perbaikan fungsi jantung.

1. Sel, Stem Cell dan Epigenetik

Gambar 23. Efek transplantasi BMC terhadap LVEF (left ventricular ejection fraction). Transplantasi BMC memberikan peningkatan LVEF sebesar 2,92% (95% CI, 1,91–3,92; $P < 0.00001$) dibandingkan kontrol. IN inverse variance.

Dikutip dari Afzal MR, Samanta A, Shah ZI, Jeevanantham V, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy for ischemic heart disease. Evidence and insights from randomized controlled trials. *Circ Res.* 2015;117:558-575.

Tabel 2. Perbedaan hasil akhir terapi sel sumsum tulang (BMC) dengan kontrol selama follow up pada pasien penyakit jantung iskemik

Durasi Follow-Up	BMC Therapy (n)	Control (n)	Perbedaan rerata (95% CI)	Nilai P
LVEF				
0–3 bln	499	385	3.53 (2.05 to 5.00)	<0.00001
4–6 bln	1196	958	2.92 (1.88 to 3.96)	<0.00001
7–12 bln	591	446	4.43 (0.48 to 3.89)	<0.00001
>12 bln	330	298	2.19 (0.48 to 3.89)	0.01
Infarct size				
0–3 bln	123	88	–6.02 (–11.37 to –0.67)	<0.03
4–6 bln	443	373	–2.25 (–3.77 to –0.72)	<0.004
7–12 bln	167	93	–4.39 (–7.20 to –1.57)	0.002
>12 bln	99	87	–2.25 (–3.14 to –1.36)	<0.00001
LVESV				
0–3 bln	322	244	–7.26 (–11.11 to –3.41)	0.0002
4–6 bln	907	751	–5.50 (–7.78 to –3.22)	<0.00001
7–12 bln	424	353	–10.58 (–14.90 to –6.27)	<0.00001
>12 bln	285	271	–4.76 (–7.46 to –2.06)	0.0006
LVEDV				
0–3 bln	322	244	–2.34 (–7.03 to 2.34)	0.33
4–6 bln	877	725	–2.57 (–4.98 to –0.16)	<0.04
7–12 bln	432	358	–5.84 (–11.03 to –0.64)	<0.00001
>12 bln	262	266	–2.08 (–4.98 to 0.82)	0.16

BMC, bone marrow cell; CI, confidence interval; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVESV, left ventricular end-systolic volume; and n, jumlah poin pada setiap kelompok.

Dikutip dari Afzal MR, Samanta A, Shah ZI, Jeevanantham V, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy for ischemic heart disease. Evidence and insights from randomized controlled trials. *Circ Res.* 2015;117:558-575.

Timbul pertanyaan : Apa yang mendasari perbaikan fungsi dan struktur jantung menggunakan terapi sel sumsum tulang ? Mengapa kenaikan fraksi ejeksi hanya sebesar 2.92%, dapat menyebabkan penurunan angka mortalitas ? Hasil analisis secara detail dilakukan peneliti Cogle et al., yang mendapatkan bahwa *CD34+ stem cell* yang berada di dalam sumsum tulang berhubungan dengan perbaikan LVEF (+9.9% versus +2.3%; $p = 0.03$) pada pasien dengan infark miokard akut (*acute myocardial infarction, AMI*) dan +6.6% versus –0.02%; $p = 0.021$ pada pasien dengan penyakit jantung iskemik konik (Gambar 24).¹⁰² Hasil analisis ini diperoleh dari stem cell sumsum tulang dan darah perifer pasien yang direkrut dalam studi Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN) meliputi 3 studi utama yaitu uji klinis

acak tersamar Transplantation in Myocardial Infarction Evaluation (TIME), LateTIME, and First Mononuclear Cells injected in the United States (FOCUS) yang dilaksanakan oleh CCTRN dengan jumlah sampel sebanyak 291 dari total 299 pasien yang direkrut dalam ke 3 studi.

Dalam penelitian terhadap 2 studi kohort penelitian melibatkan masing-masing $n=502$ dan $n=403$ pada pasien dengan penyakit jantung koroner, Patel et al., mendapatkan bahwa pasien dengan jumlah *CD34+ stem cell* dan *CD34+/CD133+* yang rendah masing-masing mendapatkan risiko kematian sebesar 3,54 (1.67–7.50) dan 2.46 (1.18–5.13) daripada orang normal (Gambar 25).¹⁰³ Hal ini terjadi karena gangguan kapasitas regenerasi endogen akibat berkurangnya stem cell *CD34+*.

Dari hasil penelitian Cogle et al., and Patel et al., dapat ditarik suatu kesimpulan bahwa reaksi sumsum tulang terhadap kondisi penyakit jantung koroner dalam hal hematopoietic stem cell yang bisa diperiksa dengan marker CD34+ stem cell berbeda-beda. Meskipun kadar CD34+ mencapai kadar terendah pada hari ke 7 setelah infark miokard (Gambar 26),¹⁰² pasien yang mempunyai kadar CD34+ yang tinggi dalam 6 bulan setelah infark akan mempunyai LVEF yang lebih tinggi daripada pasien dengan LVEF yang rendah (Gambar 24).¹⁰² Hal ini berimplikasi bahwa pemberian terapi stem cell dapat meningkatkan fungsi jantung pasien ketika CD34+ mencapai titik terendah, karena hanya CD34+ di dalam sumsum tulang yang mengalami perubahan ketika terjadi infark miokard.¹⁰²

Apa yang terjadi di dalam sumsum tulang pasien ketika timbul penyakit jantung iskemik berupa infark miokard? Di dalam sumsum tulang didapati adanya *niche* (microenvironment) yang mengatur hematopoietic stem cell (HSC). Ketika tidak ada injuri atau infark, HSC berada dalam kondisi *quiescent* berarti sel dalam keadaan *dormant* (G0). Sebaliknya jika ada injury, HSC keluar dari kondisi *dormant* dan menjadi aktif berproliferasi.¹⁰⁴ Menurut Kunisaki et al., HSC dalam kondisi *quiescent* karena dipertahankan oleh *endosteal niche*, yaitu rongga dinding osteoblast, sedangkan HSC dalam kondisi aktif untuk daya regenerasi akibat *vascular sinusoidal niche*.¹⁰⁵

Komponen sel di dalam *niche* sumsum tulang ada 2 jenis: sel endotel (endothelial cell), mesenchymal stromal cell yaitu nonhematopoietic stem cell, dan megakaryocyte yang memberikan signal ke HSC.¹⁰⁵ Arteriolar stromal niche cells yang mempertahankan HSC dalam keadaan *quiescent* adalah Nestin-GFP^{bright}, NG2⁺, LepR⁻ pericytes, sedangkan sinusoidal stromal niche cells yang mengatur HSC dalam keadaan aktif adalah as Nestin-GFP^{dim}, NG2⁻ (Gambar 27)¹⁰⁶ HSC

yang *quiescent* memberi suplai 1 triliun sel setiap hari, sedangkan sel yang aktif sebagai “backup” akan menggantikan stem cell yang hilang dalam kondisi homeostasis dan terutama sebagai respon terhadap injuri atau perubahan patologik.¹⁰⁵

Gambar 24. Persentase sel CD34+ dan perubahan LVEF pada 6 bulan. Aspirasi sumsum dilakukan pasien dengan infark miokard akut dan disfungsi ventrikel kiri. Persentase CD34+ diukur sesuai dengan kriteria ISHAGE dan LVEF diukur pada baseline dan bulan ke 6. A. Pasien dengan infark miokard akut (Acute Myocardial Infarction, AMI). A, Pasien dengan persentase CD34+ dalam sumsum tulang tinggi (>2 SD dari dengan rerata) menunjukkan peningkatan LVEF secara signifikan pada 6 bulan follow up. B. Pasien dengan disfungsi ventrikel kiri, (left ventricular dysfunction, LVD) dan CD34+ sumsum tulang tinggi (>2 SD dari rerata) menunjukkan peningkatan LVEF lebih tinggi pada 6 bulan follow up.

Dikutip dari Cogle CR, Wise E, Meacham AM, Zierold C, Traverse JH, Henry TD, Perin EC, Willerson JT, Ellis SG, Carlson M, Zhao DXM, Bolli R, Cooke JP, Anwaruddin S, Bhatnagar A, Cabreira-Hansen MDG, Grant MB, Lai D, Moy L, Ebert RF, Olson RE, Sayre SL, Schulman IH, Bosse RC, Scott EW, Simari RD, Pepine CJ, Taylor DA; for the Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTR) Detailed analysis of bone marrow from patients with heart disease and left ventricular dysfunction BM CD34, CD11b, and clonogenic capacity as biomarkers for clinical outcomes. *Circ Res.* 2014;115:867-874

Gambar 25. Survival disesuaikan dengan usia dan jenis kelamin dengan end point primer jumlah CD34+ (atas) dan CD34+/133+ (bawah). Hasil ditunjukkan dari kohort 1 dan 2 dan kombinasi. Garis berwarna menunjukkan tertil jumlah progenitor cell (biru = tertil atas; hijau = tertil tengah; merah= tertil bawah). Nilai P adalah perkiraan efek dalam model regresi Cox.

Dikutip dari Patel RS, Li Q, a Ghasemzadeh N, Eapen DJ, Moss LD, Janjua AM, Manocha P, Kassem HA, Veledar E, Samady H, Taylor WR, A. Maziar Zafari AM, Sperling L, Vaccarino V, Waller EK, Quyyumi AA. Circulating CD34+ progenitor cells and risk of mortality in a population with coronary artery disease. *Circ Res.* 2015;116:289-297

Gambar 26. Subset sel di dalam sumsum tulang pada pasien Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN). BMMNCs (bone marrow mononuclear cells) dari subjek dilakukan imunostaining dan dihitung dengan flow cytometry. Dalam uji TIME, pasien dilakukan secara acak 1:1 dengan aspirasi sumsum tulang (A) 3 hari atau (B) 7 hari setelah infark miokard akut (AMI, acute myocardial infarction). C. pada uji LateTIME, semua subjek mengalami aspirasi sumsum tulang 2-3 minggu setelah AMI. D. dalam uji FOCUS, aspirasi sumsum tulang dilakukan pada pasien dengan iskemia miokard kronik dan disfungsi ventrikel kiri > 30 hari setelah AMI. VEGFR2 : vascular endothelial growth factor receptor 2.

Dikutip dari Cogle CR, Wise E, Meacham AM, Zierold C, Traverse JH, Henry TD, Perin EC, Willerson JT, Ellis SG, Carlson M, Zhao DXM, Bolli R, Cooke JP, Anwaruddin S, Bhatnagar A, Cabreira-Hansen MDG, Grant MB, Lai D, Moy L, Ebert RF, Olson RE, Sayre SL, Schulman IH, Bosse RC, Scott EW, Simari RD, Pepine CJ, Taylor DA; for the Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRN) Detailed nalysis of bone marrow from patients with heart disease and left ventricular dysfunction BM CD34, CD11b, and clonogenic capacity as biomarkers for clinical outcomes. *Circ Res.* 2014;115:867-874

Leri et al., mengungkapkan adanya satu populasi stem cell di dalam jantung atau resident stem cell yang mempunyai kemampuan berdiferensiasi menjadi kardiomyosit, sel otot polos dan sel endotel, yang disebut *cardiac*

stem cell.¹⁰⁷ Penemuan ini tidak hanya memutarbalikan doktrin bahwa jantung adalah organ pascamitotik melainkan bersifat *self-renewal*, sekaligus membuka peluang terapeutik (Gambar 11).²⁴ Apa yang disampaikan dalam tinjauan pustaka Leri et al., adalah berdasarkan hasil studi dari kelompok mereka yaitu

Beltrami et al., yang melaporkan adanya satu populasi sel diisolasi dari jantung tikus yang mengekspresi tyrosine kinase receptor c-kit (marker stemness) yang kurang mengekspresikan hematopoietik.¹⁰⁸ Penyuntikan CSC manusia ke dalam miokardium rodent dengan infark miokard dapat memperbaiki struktur dan fungsi ventrikel kiri dan terbentuk kimera jantung berisikan miokardium manusia yang tersusun atas miosit dan pembuluh darah koroner.¹⁰⁹

Bukti bahwa kardiomiopati iskemik berhubungan dengan hilangnya fungsi CSC,¹¹⁰ memotivasi penelitian CSC pada gagal jantung kronik. Suntikan c-kit+ CSC secara intramiokard ke zona batas infark 20 hari setelah oklusi koronaria permanen pada tikus menunjukkan daya regenerasi pada jaringan parut (scar) sebesar kurang lebih 42% dengan pertumbuhan miokard baru, berkurangnya dilatasi ventrikel kiri dan perbaikan fungsi jantung.¹¹¹

Penelitian oleh Tang et al.,¹¹² mendapatkan bahwa CSC yang disuntikkan secara introkoronaria dapat meregenerasikan jaringan jantung dan mengurangi remodeling ventrikel kiri pascainfark pada infark miokard lama setelah satu bulan pada tikus, menghantarkan Bolli et al., melakukan verifikasi hasil penelitian.¹¹³ Dengan menggunakan hewan coba babi, kelompok peneliti ini melakukan oklusi arteri koronaria dan reperfusi. Setelah oklusi dilakukan, dilakukan isolasi dan kultur memperbanyak c-kit+ CSC pada atrium kanan. Dengan menggunakan kateter, hasil kultur sebanyak 1 juta CSC disuntikkan secara introkoronaria, dan mendapatkan peningkatan LVEF (*left ventricular ejection fraction*), dan peningkatan penebalan sistolik dinding ventrikel di tempat infark, penurunan tekanan diastolik akhir, dan peningkatan dP/dtmax ventrikel.¹¹² Hasil yang meyakinkan ini meletakkan dasar bagi penelitian SCIPIO (Cardiac Stem cell Infusion in Patients with Ischemic Cardiomyopathy), uji klinis pertama menggunakan CSC.²⁴

SCIPIO adalah suatu studi acak tersamar menggunakan CSC autologus untuk pengobatan gagal jantung iskemik kronik, dengan target populasi LVEF $\leq 40\%$ yang telah menjalani *coronary bypass*. Kurang lebih 4 bulan setelah bypass, CSC yang diperoleh sebanyak 1 juta yang diperoleh dari hasil ekspansi kultur, disuntikkan secara intrakoromasi, dengan kelompok kontrol tidak diberi CSC. Hasil sementara sangat menjanjikan.^{114,115} Pada kelompok terapi CSC, LVEF yang diukur dengan eko 3 dimensi mengalami peningkatan dari $29.0 \pm 1.7\%$ menjadi $36 \pm 2.5\%$ setelah 4 bulan. Pada kelompok kontrol sebanyak 13 orang tidak mengalami perubahan. Efek CSC meningkat pada penilaian 1 tahun (LVEF $+8.1\%$ versus baseline; $n=17$) dan 2 tahun (LVEF $+12.9\%$; $n=8$). Dengan pemeriksaan MRI, besar infark berkurang pada 4 bulan dari 34.9 ± 2.3 menjadi 21.6 ± 2.7 gr (reduksi 38.1%) dan pada 1 tahun dari 33.9 ± 3.0 menjadi 18.7 ± 3.6 gr (reduksi 44.8%). Efek ini menyebabkan perbaikan kelas fungsional NYHA dan kualitas hidup.¹¹⁴

CARDIOSPHERE DAN CARDIOSPHERE-DERIVED CELL

Messina et al., pertama kali melakukan isolasi satu populasi sel yang melekat secara kluster pada piring petri dari hasil biopsi atrium and ventrikel manusia dan mencit.¹¹⁶ Populasi sel ini mampu berdiferensiasi menjadi kardiomiosit, sel endotel dan sel otot polos maka kelompok studi ini menamakan *cardiosphere*.¹¹⁶ Smith et al., mendapatkan *cardiosphere* yang diperoleh dari spesimen hasil biopsi endomiokardium dan ditanamkan dalam kultur sehingga memperoleh *cardiosphere-derived cells* (CDC). CDC dilaporkan juga mampu berdiferensiasi menjadi kardiomiosit stabil berdenyut secara *in vitro* dan menyebabkan regenerasi kardiomiosit, meningkatkan fungsi jantung ketika disuntikkan pada model mencit dengan infark miokard.¹¹⁷ Penelitian eksperimental dilakukan Johnston et al., tahun 2009 dengan menyuntikkan CDC

manusia secara intrakoronaria ke babi dengan infark miokard lama mengakibatkan regenerasi jantung, reduksi besarnya infark, dan mengurangi proses remodeling ventrikel kiri serta memperbaiki fungsi jantung.¹¹⁸ Secara fenotipe, CDC adalah campuran berbagai tipe sel, termasuk sel yang mengekspresi endotel (kinase inserta domain reseptor (KDR) atau CD31, stem cell (CD34+, c-kit, Sca-1) dan marker antigen mesenkimal (CD105, CD90) (Gambar 11).²⁴

Studi klinis fase I secara acak tersamar (CADUCEUS) oleh Makkar et al., pada pasien dengan infark miokard akut dan gangguan fungsi ventrikel LVEF≤45% mendapatkan bahwa dari 17 pasien yang disuntikan CDC dosis 12,5, 17,3 atau 25 juta sel secara autologous dari hasil biopsi endomiokard, setelah 1,5-3 bulan dengan infark, dengan 8 pasien sebagai kontrol, mendapatkan bahwa CDC dapat mereduksi besaran infark sebesar 42% (dari 24% menjadi 12% pada ventrikel kiri) pada 12 bulan follow-up, dan peningkatan jaringan yang hidup dan penebalan dinding sistolik regional pada regio infark,¹¹⁹ namun terapi CDC tidak dapat meningkatkan LVEF, mengurangi volume LV dan meningkatkan kelas fungsional NYHA atau kualitas hidup diukur dengan Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire.¹¹⁹

INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL

Takahashi dan Yamanaka menggunakan 4 faktor transkripsi (octamer-binding transcription factor $\frac{3}{4}$ (OCT3/4), sex determining region Y-box2 (Sox-2), c-Myc, Kruppel-like factor 4 (Klf-4), dikenal sebagai faktor Yamanaka, pada fibroblast mencit dewasa dan mengubahnya menjadi satu populasi *induced pluripotent stem cells* (iPSC).¹²⁰ Sel ini dapat mengekspresi marker permukaan *embryonic stem cell* (ESC), dan memiliki morfologi dan pertumbuhan seperti pada ESC. Potensi iPSC terhadap kardiogenik sangat menyerupai potensi dari ESC, dengan kardiomyosit yang dihasilkan berupa denyutan spontan, kontraktilitas dan ekspresi ion kanal.

¹²¹ Namun, sampai saat ini, belum ada studi yang spesifik menilai potensi iPSC pada model hewan dengan gagal jantung.

Faktor transkripsi yang digunakan memiliki sifat onkogenik seperti c-Myc dan Kruppel-like factor-4 sehingga berpotensi menghasilkan teratoma. Metode lebih baru tidak lagi menggunakan faktor ini sehingga dapat menyingkirkan kemungkinan pembentukan teratoma,^{122,123} tetapi sifat alamiah yang terkandung di dalam sel ini dapat menyebabkan tumorigenesis.¹²⁴ Efisiensi yang rendah dari iPSC dan variasi antar *cell line* juga menimbulkan masalah terhadap *reprogramming*.¹²⁵ Namun, dengan perkembangan teknologi yang pesat, teknik ini akan dapat diatasi.

Dengan sifat yang dimiliki menyerupai *embryonic stem cell* (ESC) sehingga memungkinkan tumorigenesis, maka timbul pertanyaan apa yang membuat iPSC dapat menyerupai ESC? Para ahli mengungkapkan bahwa di dalam iPSC terdapat “epigenetic memory”, suatu pola *chemical mark* (penanda kimia) pada metilasi DNA yang menggambarkan asal tipe sel,¹²⁶ dengan sekelompok gen spesifik yang resisten terhadap proses *reprogramming*.¹²⁷ Karena itu, retensi *epigenetic memory* mempunyai pengaruh lebih signifikan terhadap karakteristik sel.¹²⁷ Dengan melakukan *reprogramming* berulang atau subkultur iPSC secara kontinu atau obat *demethylating agent* dapat dilakukan perubahan ulang untuk mencapai pluripotensi yang paling mendasar.¹²⁸

EPIGENETIK

Kata epi- dalam bahasa Yunani berarti di atas, dekat, pada, sebelum atau sesudah. Namun konotasi sebelum atau sesudah mungkin lebih sering digunakan. Epigenetik dapat diartikan sebagai perubahan dalam regulasi ekspresi gen yang dapat diturunkan kepada sel progeni tanpa perubahan pada urutan nukleotida gen.¹²⁹ Definisi epigenetik pertama kali dikemukakan oleh Conrad

Waddington sebagai perubahan ekspresi gen yang diturunkan dan fenotipe sel yang tidak bergantung pada perubahan sekuensi DNA.¹³⁰ Hal ini berarti bahwa melalui perubahan pada

ekspresi gen yang diturunkan, epigenetik dapat mengubah proses pada DNA melalui serangkaian proses seperti metilasi DNA, modifikasi kromatin dan non-coding RNA.¹³¹

Gambar 28. Nukleosom. Unit dasar fungsional kromatin adalah nukleosom (Panel A), tersusun atas oktaimer histon dikelilingi DNA. Oktamer dipisahkan oleh DNA linker. Oktamer histon dibentuk oleh histon tetramer H3:H4 dan dua dimer H2A: H2B. Ekor histon terdiri dari empat histon inti yang dipengaruhi oleh modifikasi post-translasi (Panel B). Hal ini meliputi metilasi (Me), asetilasi (Ac), fosforilasi (Ph), ubiquilasi (Ub) dan isomerisasi prolin (Iso), yang terjadi pada tempat asam amino yang spesifik, seperti K4 dan K9 pada ekor histon H3. Asam amino histon yang sama juga mengalami modifikasi post translasi yang berbeda.

Dikutip dari Dawson MA, Tony Kouzarides T, Huntly BJP. Targeting epigenetic readers in cancer. *N Engl J Med* 2012;367:647-57.

Gambar 29. Metilasi DNA dan modifikasi kimia terhadap histon dapat mempengaruhi kecepatan transkripsi DNA menjadi molekul RNA (histon adalah protein tempat lilitan DNA membentuk kromatin). Aktivitas faktor transkripsi dan struktur elemen DNA (lokasi dan sekuensi) dari elemen DNA pengaturan gen termasuk promotor, yang berada *upstream* dari tempat dimulainya transkripsi RNA.

Dikutip dari Ecker JR. *Serving up a genome feast*. *Nature* 2012; 489: 52-53.

Kromatin adalah makromolekul DNA dan protein histon, yang menyokong seluruh genom yang mengandung materi genetik di dalam sel eukariot. Unit dasar kromatin adalah nukleosom, terdiri dari oktamer berisikan dua histon H2A, H2B, H3 dan H4, tempat terbungkusnya 147 bp DNA (Gambar 28).¹³² Nukleosom dipisahkan oleh DNA linker dengan panjang 20-50 bp.¹³³ DNA

nukleosom yang terbungkus lebih sulit dipengaruhi daripada DNA linker (Gambar 29).¹³⁴ Karena itu, posisi genom dan perubahan nukleosom dapat mempengaruhi kemampuan protein berikatan dengan sekuensi target di dalam DNA. Kromatin dapat dibagi atas : heterokromatin, dengan kromatin yang terbungkus ketat, terutama mengandung gen tidak aktif, sedangkan

eukromatin mengandung konformasi yang lebih relaks yang memungkinkan terjadinya transkripsi aktif. Berbagai kondisi dapat berpengaruh terhadap proses ini yaitu modifikasi pada DNA atau histon (Gambar 28 B).¹³²

Perubahan epigenetik dan susunan kromatin dalam aktivasi dan represi gen penting dalam mempertahankan pluripotensi stem cell, seperti pada *embryonic stem cell* dan sel germinal primordial.¹³⁵ Kedua jenis sel dapat menghasilkan semua jenis sel dari suatu organisme, sedangkan multipoten dan unipoten stem cell mempunyai keterbatasan kapasitas diferensiasi dalam menghasilkan sel progeni. Progresivitas dalam kondisi stem menjadi sel yang lebih terdiferensiasi memerlukan perubahan fungsi sel, pola ekspresi gen dan morfologi.¹³⁵ Karena itu, sifat khusus sel tidak hanya ditentukan oleh sekuensi DNA, tetapi juga kombinasi gen aktif dan *silent* dalam suatu waktu ketika mengalami proses perkembangan.

Meskipun semua sel di dalam tubuh mempunyai sekuensi DNA yang identik, namun setiap sel mempunyai fenotipe dan pola ekspresi gen berbeda. Misalnya, perubahan kromatin di otak dapat mempengaruhi ekspresi gen yang berupa 'epigenetik' dan menetap walaupun terjadi pembelahan sel. Teori "kode epigenetik" menjelaskan bahwa dua kondisi kromatin diperlukan dalam memodifikasi kompleks kromatin. Regio dengan aktivitas transkripsi diperrankan oleh asetilasi lisin oleh enzim histone acetyltransferase (HATs) dengan merelaksasikan struktur kromatin dengan melemahkan interaksi muatan positif pada ekor histon dengan muatan negatif fosfat yang menopang DNA, sehingga memungkinkan aktivator transkripsi masuk dan menginduksi gen.¹³⁶ Sedangkan histone deacetylase (HDACs) memperantarai deasetilasi lisin dengan merubah sifat elektrostatis kromatin yang menyebabkan represi gen.^{135,136} Karena itu, histone

acetyltransferases (HATs) dan HDACs bekerja saling berlawanan dalam mengatur kondisi asetilasi protein.

Untuk mendapat gambaran secara umum tentang peran epigenetik terhadap ekspresi gen, maka di sini akan dipaparkan salah satu contoh pengaruh histone deacetylase terhadap ekspresi pada penyakit jantung dan ginjal dan upaya intervensi terhadap peran kromatin dengan melakukan modifikasi kromatin.

Sebagian besar studi HDAC terfokus pada peranan dalam pengaturan hipertrofi jantung. Hipertrofi jantung terjadi sebagai respon patologik dalam upaya untuk menormalkan regangan dinding jantung untuk meningkatkan performan jantung. Untuk jangka panjang, respon ini bersifat maladaptif,¹³⁷ sehingga supresi terhadap hipertrofi jantung akan menurunkan angka morbiditas dan mortalitas pada pasien dengan hipertensi. Jika hipertensi tidak ditanggulangi dengan baik, dapat menyebabkan gagal jantung dengan preservasi fraksi ejeksi (HFpEF).¹³⁶ Hal yang sama dapat terjadi pada ginjal jika pengontrolan hipertensi tidak diatasi dengan baik. Upaya menurunkan tekanan darah menggunakan angiotensin converting enzyme inhibitor atau obat β -blocker, melalui modulasi terhadap sistem renin angiotensin, hanya mempertahankan pengontrolan tekanan darah dan sedikit memperlambat proses injuri glomerulus dan mekanisme fibrotik sehingga berakhir pada HFrEF dan penyakit ginjal tahap akhir.¹³⁶ Histone deacetylases (HDACs) memegang peranan penting dalam patogenesis penyakit ini, sehingga inhibitor HDAC berpotensi terhadap pengobatan pada sumbu kardiorrenal ini.¹³⁶

Studi Zhang et al, mendapatkan bahwa HDAC kelas IIa berfungsi sebagai represor terhadap signal hipertrofi jantung. Ketika terjadi signal stres, HDAC kelas IIa keluar dari nukleus kardiomyosit sehingga tidak mampu merepresi gen yang meningkatkan pertumbuhan miokard.¹³⁸ Hal ini berarti HDAC

bersifat represi terhadap gen. Penelitian menggunakan mencit transgenik dengan overekspresi HDAC2 dependent yang menyebabkan hipertrofi dapat dihambat oleh HDAC inhibitor TSA (trichostatin A) atau *valproic acid* selama 2 minggu.¹³⁹

Bagaimana mekanisme HDAC inhibitor dalam memberikan efek terapeutik terhadap penyakit jantung, dalam hal hipertrofi dan gagal jantung ? Tentu salah satu penjelasan adalah efek protektif terhadap ekspresi gen jantung dengan melepaskan represi, misalnya meningkatkan ekspresi gen Kruppel-like factor (Klf)4 *transcription factor*, karena gen ini dapat menekan ekspresi gen yang berhubungan dengan hipertrofi jantung.

Studi Gardner et al., mendapatkan bahwa ekspresi BNP (brain natriuretic peptide) yang memperantarai regangan ventrikel jantung, dan meningkat pada gagal jantung pada waktu hipertrofi jantung, bergantung pada HDAC2 dengan faktor transkripsi yin-yang (YY1) terhadap promotor gen BNP.¹⁴⁰ YY1 mengalami asetilasi pada miosit jantung sehingga deasetilasi terhadap faktor transkripsi ini oleh HDAC akan menyebabkan stimulus terhadap transkripsi gen BNP. Dengan menggunakan TSA, dapat menghambat kompleks YY1: HDAC2 dan menekan ekspresi BNP yang diinduksi endotelin.¹⁴⁰

Penelitian Menick et al., menunjukkan bahwa aktivitas HDAC1 merangsang ekspresi gen sodium/calcium exchanger (NCX1) selama terjadi hipertrofi jantung.¹⁴¹ Setelah asetilasi, Nkx2.5 tidak mampu berasosiasi dengan p300 HAT sehingga tidak mampu merangsang ekspresi NCX1. Deasetilasi gen Nkx2.5 oleh HDAC1 meningkatkan hubungan dengan p300 dan menyebabkan ekspresi NCX1, dan proses ini dapat dihambat oleh TSA. Dengan demikian, dapat dikemukakan bahwa studi gen BNP dan NCX1 menjelaskan mekanisme HDAC menekan ekspresi gen dengan merubah kondisi asetilasi pada protein nonhiston (Gambar 30).¹³⁶

Penyakit ginjal kronik (CKD, chronic kidney disease) dapat disebabkan hipertensi dan diabetes. Penyakit ini sebagai respon terhadap stres dan injuri kronik, menyebabkan pelepasan sitokin dan inflamasi.¹³⁶ Peningkatan kadar transformisng growth factor- β (TGF- β) mengaktivasi sel mesangial dan fibroblast mengakibatkan produksi protein extracellular matrix (ECM) sehingga menyebabkan fibrosis organ baik terhadap ginjal dan jantung.¹⁴² TGF- β juga meningkatkan dediferensiasii sel epitel ginjal menjadi sel mesenkimal yang memproduksi matrix melalui proses *epithelial-to-mesenchymal transition* (EMT).¹⁴³

Studi Yoshikawa et al., menunjukkan bahwa TSA dapat memblok TGF- β yang memperantarai EMT, mengurangi ekspresi profibrotik ECM dan mempertahankan ekspresi E-cadherin, marker fungsional epitel.¹⁴⁴ TSA juga meningkatkan ekspresi faktor renoprotektif, bone morphogenetic protein (BMP)-7, suatu inhibitor TGF- β signaling yang dikenal menekan EMT dan mengembalikan fibrosis ginjal.^{145,146} Pada model nefritis nefrotoksik pada mencit dengan injuri renal autoimun selama 3 minggu, pemberian TSA dapat mengurangi fibrosis dan mengembalikan fungsi ginjal secara signifikan.¹⁴⁷ Pemberian pan-HDAC dapat mengembalikan fungsi ginjal pada model ini. Mekanisme yang mendasari efikasi HDAC inhibitor sebagian disebabkan oleh rangsangan ekspresi BMP-7 oleh stem cell di dalam ginjal.¹³⁶

Restorasi asetilasi protein oleh HDAC inhibitor merupakan suatu pendekatan terapi yang menjanjikan pada penyakit kardiorrenal. Kemampuan HDAC inhibitor dapat disebabkan kemampuan senyawa ini mempengaruhi berbagai tipe sel seperti miosit, fibroblast, sel epitel, sel inflamatori dan mekanisme patologik, misalnya hipertrofi miosit, produksi sitokin inflamatori, EMT, deposisi ECM, dan apoptosis yang menyebabkan gagal organ (Gambar 31).¹³⁶

Gambar 30. Regulasi gen jantung oleh HDAC inhibitor. Stimuli stres memicu pengeluaran antihipertrofi HDAC class IIa melalui nukleus. HDAC kelas IIa memiliki aktivitas intrinsik katalitik minimal sehingga resisten terhadap HDAC inhibitor. Pada kondisi patologik, faktor transkripsi YY1 terikat pada HDAC kelas 1, HDAC 2 mendeasetilasi YY1, meningkatkan ekspresi gen BNP. HDAC kelas 1 mendeasetilasi faktor transkripsi Nkx2.5, sehingga meningkatkan hubungan terhadap p300 HAT dan merangsang ekspresi gen NCX1. Karena itu, penggunaan inhibitor HDAC dapat menghambat ekspresi gen tersebut. Inhibitor HDAC merangsang gen Klf4 dan Egr1 di dalam jantung, sehingga dapat menghambat hipertrofi (Klf4) dan meningkatkan gen kontraktilitas (Egr1).

Dikutip dari Bush EW, McKinsey TA. Protein acetylation in the cardiorenal axis. The promise of histone deacetylase inhibitors. *Circ Res.* 2010;106:272-284.

Gambar 31. Target HDAC inhibitor terhadap mekanisme patologi pada penyakit jantung dan ginjal kronik. Stres kronik hipertensi dan diabetes menyebabkan hipertrofi kardiomyosit dan inflamasi yang menyebabkan fibrosis kardiorrenal, mengurangi fungsi organ, kematian sel dan akhirnya menyebabkan gagal organ. HDAC inhibitor dapat menargetkan berbagai tipe sel dalam progresivitas penyakit. HDAC inhibitor bersifat kardioprotektif dan renoprotektif, memblok hipertrofi jantung dan mencegah kematian sel ginjal pada model gagal jantung dan gagal ginjal.

Dikutip dari Bush EW, McKinsey TA. Protein acetylation in the cardiorenal axis. The promise of histone deacetylase inhibitors. *Circ Res.* 2010;106:272-284.

DAFTAR PUSTAKA

- Hardin J and Bertoni G. Becker's world of the cell. The cell cycle and mitosis. 9 ed. Pearson Education, Inc. , USA 2016; p. 714-745.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5 ed Garland Science, USA, 2008; p. 1053-1114.
- Beigi F, Schmeckpeper J, Pow-anpongkul P, Payne JA, Zhang L, Zhang Z, Huang J, Mirotso M, Dzau VJ. C3orf58, a novel paracrine protein, stimulates cardiomyocyte cell-cycle progression through the PI3K-AKT-CDK7 pathway.

- Circ Res. 2013;113:372-380.
4. McCoy, Jr JP. Basic principles in clinical flow cytometry. In : Carey JL, McCoy Jr. JP, Keren DF. Eds. Flow cytometry in clinical diagnosis. 4th ed. ASCP. Singapore 2007, p. 15-34.
 5. Watt FM, Hogan BLM. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287: 1427-1430.
 6. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 2014; 505: 327-334.
 7. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414: 98-104.
 8. Konstantinov IE. In search of Alexander A. Maximow: The man behind the unitarian theory of hematopoiesis. *Perspect Biol Med* 2000; 43: 269-276.
 9. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-147.
 10. Gearhart J. New human embryonic stem-cell lines -more is better. *N Engl J Med* 2004; 350: 1275-1276.
 11. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156.
 12. Bubak AN, Elsworth JD, Sladek JR. Animal models in regenerative medicine. In : Vertes AA, Qureshi N, Caplan AI, Babiss LE eds. Stem cells in regenerative medicine : science, regulation and business strategies. Ed 1, John Wiley & Sons, Ltd, 2015, p. 303- 316.
 13. Rossant J. Embryonic stem cells in perspective. In : Lanza R & Atala A eds. Essential of stem cell biology. 3rd ed. Academic Press. 2014, p. 35-38.
 14. Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I, Lanza R. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 2012; 379: 713-20.
 15. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, Hubschman JP, Davis JL, Heilwell G, Spirn M, Maguire J, Gay R, Bateman J, Ostrick RM, Morris D, Vincent M, Anglade E, Del Priore LV, Lanza R. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 2015; 385: 509-16.
 16. Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T et al. Serum free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeder. *Fertility and Sterility* 2005; 83: 1517-1529.
 17. Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elefanty AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res.* 2012;111:344-358.
 18. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2002;91:501-508.
 19. He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res.* 2003;93:32-39.
 20. Sartiani L, Bettiol E, Stillitano F, Mugelli A, Cerbai E, Jaconi ME. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach. *Stem Cells.* 2007;25:1136-1144.
 21. Menard C, Haggge AA, Agbulut O, Barro M, Morichetti MC, Brasselet C, Bel A, Messas E, Bissery A, Bruneval P, Desnos M, Puc.at M, Menasch. P. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet.* 2005;366:1005-1012.
 22. Cai J, Yi FF, Yang XC, Lin GS, Jiang H, Wang T, Xia Z. Transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves cardiac function in infarcted rat hearts. *Cytherapy.*

- 2007;9:283–291.
23. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, Muskheli V, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J*. 2007;21:1345–1357.
24. Sanganalath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure. A comprehensive overview of experimental and clinical studies. Current challenges, and future directions. *Circ Res*. 2013;113:810-834.
25. Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N. Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a “suicide” gene. *Stem Cells*. 2003;21:257–265.
26. Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X, Drukker M, Dylla SJ, Connolly AJ, Chen X, Weissman IL, Gambhir SS, Wu JC. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation*. 2006;113:1005–1014.
27. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010; 2: 640-653.
28. Maximow, A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematol. (Frankf.)* 1909; 8: 125-134.
29. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood* 2015; 125 :2605-2613.
30. Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 2008;112:3543-3553.
31. Jacobson LO, Simmons EL, Marks EK, Robson MJ, Bethard WF, Gaston EO. The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J Lab Clin Med*. 1950;35:746-770.
32. Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 1951;12:197-201.
33. Jacobson LO, Simmons EL, Marks E, Eldredge JH. Recovery from radiation injury. *Science*. 1951;113:510-511.
34. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961;14:213-222.
35. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452-454.
36. Wolpe SD, Koh L. Hematopoietic stem cell. In : Vertes AA eds. *Stem cells in regenerative medicine. : science, regulation and business strategies*. Ed 1, John Wiley & Sons, Ltd, 2015, p. 397-413.
37. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988; 241:58-62.
38. Osawa M, et al. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996; 273:242-245.
39. Civin CI, et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984; 133: 157-165.
40. DiGiusto D, et al. Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood*. 1994; 84 :421-432.
41. Krause DS, et al. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996; 87:1-13.
42. Goodell MA. CD341 or CD342: Does it Really Matter? *Blood* 1999; 8: 2545-2547.
43. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011;146:873-887.
44. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial

- progenitor cells. characterization and role in vascular biology. *Circ Res.* 2004;95:343-353.
45. Prof. Hadyanto Lim. Stem cell kardiovaskuler. Ed 2. Vol 1. PT Sofmedia 2012, p.127-144.
 46. Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC Jr, Kormos R, Benetti F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;130:1631-1638.
 47. Vrtovec B, Poglajen G, Sever M, Lezaic L, Domanovic D, Cernelc P, Haddad F, Torre-Amione G. Effects of intracoronary stem cell transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail.* 2011;17:272-281.
 48. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Domanovic D, Cernelc P, Socan A, Schrepfer S, Torre-Amione G, Haddad F, Wu JC. Effects of intracoronary CD34+ stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up. *Circ Res.* 2013;112:165-173.
 49. Manginas A, Goussetis E, Koutelou M, Karatasakis G, Peristeri I, Theodorakos A, Leontiadis E, Plessas N, Theodosaki M, Graphakos S, Cokkinos DV. Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133(-) CD34(+) cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2007;69:773-781.
 50. Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Lee JS, Costa MA, Bass T, Mendelsohn F, Fortuin FD, Pepine CJ, Traverse JH, Amrani D, Ewenstein BM, Riedel N, Story K, Barker K, Povsic TJ, Harrington RA, Schatz RA, the ACT34-CMI Investigators. Intramyocardial, autologous CD34+ cell therapy for refractory angina. *Circ Res.* 2011;109: 428-436.
 51. Lim H, Lindarto D, Zein U, Hariaji I. Intravenous mobilized autologous peripheral blood CD34+ stem cell transplantation for angina (in press).
 52. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-147.
 53. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105:93-98.
 54. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 2002;109:337-346.
 55. Reinecke H, Minami E, Zhu WZ, Laflamme MA. Cardiogenic differentiation and transdifferentiation of progenitor cells. *Circ Res.* 2008;103:1058-1071.
 56. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:568-584.
 57. Prof. Hadyanto Lim. Stem Cell Kardiovaskuler ed 2, vol 2. PT Sofmedia, 2015, p. 174-192.
 58. Wang Z, Shuch G, Williams K, Soker S. In Lanza R eds. *Essentials of stem cell biology.* 3rd ed Elsevier 2014. p. 227-244.
 59. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2:477- 488.
 60. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000;109:235-242.
 61. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211-228.
 62. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1928

- 1942.
63. Sabatini F, Petecchia L, Tavian M, Jodon de Villeroche V, Rossi GA, Brouty-Boye D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest.* 2005;85:962–971.
64. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells.* 2007;25:1384–1392.
65. Crisan M, Yao S, Casteiolla L et al., A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 301-313.
66. Caplan AI. All MSCs are pericytes ? *Cell Stem Cell* 2008; 3: 229-230.
67. Caplan AI. MSCs: the new medicine. In : Vertes AA eds. *Stem cells in regenerative medicine. : science, regulation and business strategies.* Ed 1, John Wiley & Sons, Ltd, 2015, p. 415-421.
68. Caplan AI. What's in a name ? *Tissue Engineering Part A* 2010; 16: 2415-2417.
69. Schuleri KH, Feigenbaum GS, Centola M, Weiss ES, Zimmet JM, Turney J, Kellner J, Zviman MM, Hatzistergos KE, Detrick B, Conte JV, McNiece I, Steenbergen C, Lardo AC, Hare JM. Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 2009;30:2722–2732.
70. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation.* 2005;111:150–156.
71. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:11474–11479.
72. Amado LC, Schuleri KH, Saliaris AP, Boyle AJ, Helm R, Oskouei B, Centola M, Eneboe V, Young R, Lima JA, Lardo AC, Heldman AW, Hare JM. Multimodality noninvasive imaging demonstrates in vivo cardiac regeneration after mesenchymal stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:2116–2124.
73. Gneccchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2005;11:367–368
74. Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, Furlani D, Piechaczek C, Moebius JM, Lu□tzow K, Lendlein A, Stamm C, Li RK, Steinhoff G. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells.* 2007;25:2118–2127.
75. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res.* 2015;116:1413-1430.
76. Molina EJ, Palma J, Gupta D, Torres D, Gaughan JP, Houser S, Macha M. Reverse remodeling is associated with changes in extracellular matrix proteases and tissue inhibitors after mesenchymal stem cell (MSC) treatment of pressure overload hypertrophy. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009;3:85–91.
77. Psaltis PJ, Zannettino AC, Worthley SG, Gronthos S. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells.* 2008;26:2201-2210.
78. McCall FC, Telukuntla KS, Karantalis V, Suncion VY, Heldman AW, Mushtaq M, Williams AR, Hare JM. Myocardial infarction and intramyocardial injection models in swine. *Nat Protoc.* 2012;7:1479–1496.
79. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, Pattany PM, Zambrano JP, Hu Q, McNiece I, Heldman AW, Hare JM.

- Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106: 14022–14027.
80. Williams AR, Hare JM. Stem cells biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*. 2011;109:923–940.
 81. Gneocchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103:1204–1219.
 82. Gneocchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*. 2006;20:661–669.
 83. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 2004; 109:1543–1549.
 84. Mirosou M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gneocchi M, Noiseux N, Mu H, Pachori A, Dzau V. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104: 1643–1648.
 85. Li H, Zuo S, He Z, Yang Y, Pasha Z, Wang Y, Xu M. Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 299:H1772–H1781.
 86. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98:1076–1084.
 87. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol*. 1996;166:585–592.
 88. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskoue BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, Mazhari R, Boyle AJ, Zambrano JP, Rodriguez JE, Dulce R, Pattany PM, Valdes D, Revilla C, Heldman AW, McNiece I, Hare JM. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010;107:913–922.
 89. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012;308:2369–2379.
 90. Heldman AW, DiFede DL, Fishman JE, et al. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA*. 2014;311:62–73.
 91. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012;379:895–904.
 92. Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, et al. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61:2329–2338.
 93. Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, Pappas P, Tatroles A, Stoddard MF, Lima JA, Slaughter MS, Anversa P, Bolli R. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation*. 2012;126:S54–S64.

94. Sanina C, Hare JM. Mesenchymal stem cells as a biological drug for heart disease. Where are we with cardiac cell-based therapy? *Circ Res.* 2015;117:229-233.
95. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, Gerstenblith G, DeMaria AN, Denktas AE, Gammon RS, Hermiller JB Jr, Reisman MA, Schaer GL, Sherman W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:2277–2286.
96. Planat-B.nard V, Menard C, Andr. M, Puceat M, Perez A, Garcia- Verdugo JM, P.nicaud L, Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res.* 2004;94:223–229.
97. Miranville A, Heeschen C, Sengen.s C, Curat CA, Busse R, Bouloumi. A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue- derived stem cells. *Circulation.* 2004;110:349–355.
98. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med.* 2006;12:459–465.
99. Mazo M, Planat-B.nard V, Abizanda G, et al. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail.* 2008;10:454–462.
100. Perin EC, Sanchez PL, Ruiz RS et al. First in man transendocardial injection of autologous adipose-derived stem cells in patients with non revascularizable ischemic myocardium (precise). *Circulation.* 2010;122:A17966.
101. Afzal MR, Samanta A, Shah ZI, Jeevanantham V, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy for ischemic heart disease. Evidence and insights from randomized controlled trials. *Circ Res.* 2015;117:558-575.
102. Cogle CR, Wise E, Meacham AM, Zierold C, Traverse JH, Henry TD, Perin EC, Willerson JT, Ellis SG, Carlson M, Zhao DXM, Bolli R, Cooke JP, Anwaruddin S, Bhatnagar A, Cabreira-Hansen MDG, Grant MB, Lai D, Moy L, Ebert RF, Olson RE, Sayre SL., Schulman IH, Bosse RC, Scott EW, Simari RD, Pepine CJ, Taylor DA; for the Cardiovascular Cell Therapy Research Network (CCTRn) Detailed analysis of bone marrow from patients with heart disease and left ventricular dysfunction BM CD34, CD11b, and clonogenic capacity as biomarkers for clinical outcomes. *Circ Res.* 2014;115:867-874.
103. Patel RS, Li Q, a Ghasemzadeh N, Eapen DJ, Moss LD, Janjua AM, Manocha P, Kassem HA, Veledar E, Samady H, Taylor WR, A. Maziar Zafari AM, Sperling L, Vaccarino V, Waller EK, Quyyumi AA. Circulating CD34+ progenitor cells and risk of mortality in a population with coronary artery disease. *Circ Res.* 2015;116:289-297
104. Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science* 327, 542–545
105. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, Mizoguchi T, Wei Q, Lucas D, Ito K, Mar JC, Bergman A, Frenette PS. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 2013; 502: 737-643.
106. Schepers K, Campbell TB, Passegue E. Normal and leukemic stem cell niches: Insights and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell* 2015;16:254-267.
107. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology:a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ Res.*

- 2011;109:941–961.
108. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114:763–776.
 109. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, et al. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:14068–14073.
 110. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, Beltrami CA, Bussani R, Beltrami AP, Quaini F, Bolli R, Leri A, Kajstura J, Anversa P. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:8692–8697.
 111. Rota M, Padin-Iruegas ME, Misao Y, et al. Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function. *Circ Res*. 2008;103:107–116.
 112. Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation*. 2010;121:293–305.
 113. Bolli R, Tang XL, Sanganalmath SK, Rimoldi O, Mosna F, Abdel-Latif A, Jneid H, Rota M, Leri A, Kajstura J. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2013;128:122–131.
 114. Bolli R, Chugh AR, D’Amario D, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011;378:1847–1857.
 115. Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, Pappas P, Tatroles A, Stoddard MF, Lima JA, Slaughter MS, Anversa P, Bolli R. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation*. 2012;126:S54–S64.
 116. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004;95:911–921.
 117. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, Giacomello A, Abraham MR, Marbán E. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 2007;115:896–908.
 118. Johnston PV, Sasano T, Mills K, Evers R, Lee ST, Smith RR, Lardo AC, Lai S, Steenbergen C, Gerstenblith G, Lange R, Marbán E. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2009;120:1075–1083.
 119. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012;379:895–904.
 120. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663–676.
 121. Pfannkuche K, Liang H, Hannes T, Xi J, Fatima A, Nguemo F, Matzkies M, Wernig M, Jaenisch R, Pillekamp F, Halbach M, Schunkert H, Sarić T, Hescheler J, Reppel M. Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: intact hormonal regulation, cardiac ion channel

- expression and development of contractility. *Cell Physiol Biochem*. 2009;24:73–86.
122. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009;136:964–977.
123. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 2009;458:771–775.
124. Riggs JW, Barrilleaux BL, Varlakhanova N, Bush KM, Chan V, Knoepfler PS. Induced pluripotency and oncogenic transformation are related processes. *Stem Cells Dev*. 2013;22:37–50.
125. Ma T, Xie M, Laurent T, Ding S. Progress in the reprogramming of somatic cells. *CRes*. 2013;112:562–574.
126. Scudellari M. A decade of iPS cells. *Nature* 2016; 310: 310-312.
127. Zwaka TP. Stem cells : troublesome memory. *Nature* 2010; 467: 280-281.
128. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji M, Ehrlich LIR, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010; 467 285-292.
129. Editorial. Beyond the genome. *Nature* 2015; 518: 273.
130. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 2009;23:781–783.
131. Tellefsbol TO. Epigenetics of human disease. In : Tellefsbol ed. *Epigenetic in human disease*. Elsevier Inc 2012; p. 106.
132. Dawson MA, Tony Kouzarides T, Huntly BJP. Targeting epigenetic readers in cancer. *N Engl J Med* 2012;367:647-57.
133. Segal E, Widom J. What controls nucleosome positions? *Trends Genet* 2009; 25:335-43.
134. Ecker JR. Serving up a genome feast. *Nature* 2012; 489: 52-53.
135. Shafa M, Rancourt DE. Stem cell epigenetics and human disease. In : *Epigenetics of human disease*. In : Tellefsbol ed. *Epigenetic in human disease*. Elsevier Inc 2012; p. 481-501.
136. Bush EW, McKinsey TA. Protein acetylation in the cardiorenal axis. The promise of histone deacetylase inhibitors. *Circ Res*. 2010;106:272-284.
137. Gardin JM, Lauer MS. Left ventricular hypertrophy: the next treatable, silent killer? *JAMA*. 2004;292:2396–2398.
138. Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell*. 2002;110:479–488.
139. Kook H, Lepore JJ, Gitler AD, Lu MM, Wing-Man YW, Mackay J, Zhou R, Ferrari V, Gruber P, Epstein JA. Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop. *J Clin Invest*. 2003;112: 863–871.
140. Glenn DJ, Wang F, Chen S, Nishimoto M, Gardner DG. Endothelin stimulated human B-type natriuretic peptide gene expression is mediated by Yin Yang 1 in association with histone deacetylase 2. *Hypertension*. 2009;53:549–555.
141. Chandrasekaran S, Peterson RE, Mani SK, Addy B, Buchholz AL, Xu L, Thiyagarajan T, Kasiganesan H, Kern CB, Menick DR. Histone deacetylases facilitate sodium/calcium exchanger up-regulation in adult cardiomyocytes. *FASEB J*. 2009;23:3851–3864.
142. Lim H, Zhu YZ. Role of transforming growth factor- β in the progression of heart failure. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 2584-2596.
143. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of

- epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119:1420–1428.
144. Yoshikawa M, Hishikawa K, Marumo T, Fujita T. Inhibition of histone deacetylase activity suppresses epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 in human renal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:58–65.
 145. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med*. 2003;9:964–968.
 146. Zeisberg M, Kalluri R. Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights into novel therapeutic strategies for chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2008;23:1395–1398.
 147. Imai N, Hishikawa K, Marumo T, Hirahashi J, Inowa T, Matsuzaki Y, Okano H, Kitamura T, Salant D, Fujita T. Inhibition of histone deacetylase activates side population cells in kidney and partially reverses chronic renal injury. *Stem Cells*. 2007;25:2469–2475.