

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rekonstruksi defek mandibula pasca reseksi tumor rahang telah menjadi tantangan tersendiri di bidang bedah mulut dan maksilofasial selama 50 tahun terakhir. Reseksi tumor rahang seringkali menimbulkan critical size defects pada mandibula yang harus diperbaiki dengan prosedur rekonstruksi untuk mempertahankan fungsi pengunyahan, bicara dan kosmetik wajah penderita (Randall, 2004).

Tandur tulang otogenous (autogenous bone graft) sampai saat ini merupakan gold standard untuk rekonstruksi critical size di mandibula dengan tingkat penyatuan tulang (bony union) mencapai 96% (Foster et al., 1999). Meskipun demikian prosedur autogenous bone graft memiliki kelemahan yaitu ukuran (size), bentuk (shape), dan ketersediaannya terbatas, serta terjadinya komplikasi akibat pengambilan graf dari tubuh penderita. Komplikasi akibat pengambilan graf crista iliaca meliputi infeksi luka operasi, rasa nyeri menetap, paraestesia, fraktur, dan herniasi organ abdominal dengan nilai tingkat komplikasi keseluruhan sebesar 49% (Arrington et al., 1996). Autogenous bone graft juga tidak diindikasikan pada kasus di mana telah terjadi kerusakan periosteum dan pada pasien usia lanjut, hal ini dikaitkan dengan menurunnya jumlah stem cell yang diperlukan untuk penyembuhan tulang (Pramono, 2011). Oleh karena itu, rekayasa jaringan merupakan alternatif perawatan yang menjanjikan untuk mengatasi problema rekonstruksi critical size defect di bidang bedah mulut dan maksilofasial saat ini.

Perkembangan ilmu dan teknologi rekayasa jaringan yang pesat belakangan ini telah memungkinkan dilakukannya penggantian jaringan yang rusak dengan jaringan baru yang sama struktur maupun fungsinya. Konsep rekayasa jaringan pada dasarnya adalah menggabungkan tiga komponen yaitu: sel, matriks ekstraseluler dan sinyal morfogenetik yang disebut dengan konsep Triad of Tissue Engineering (Reddi, 2007). Salah satu aplikasi rekayasa jaringan di bidang kedokteran adalah rekayasa jaringan tulang.

Suatu critical size defect pada mandibula berdasarkan konsep rekayasa jaringan tulang dapat dilakukan rekonstruksi dengan menggunakan pendekatan berbasis stem cell (cell-based therapy) atau berbasis faktor pertumbuhan (factor-based therapy). Strategi cell-based therapy menggunakan adult stem cell yang dibiakkan pada scaffold berfungsi sebagai matriks ekstraseluler untuk tempat pertumbuhan stem cell. Scaffold yang telah dibiakkan stem cell tersebut kemudian ditanam pada defek in vivo untuk melakukan regenerasi jaringan tulang.

Penelitian cell-based therapy untuk melakukan rekonstruksi critical size defect tulang panjang telah dimulai sejak lebih dari satu dekade yang lalu (Bruder et al., 1998; Kon et al., 2000; Petite et al., 2000; Mastrogiacomo et al., 2006; Krucy et al., 2006). Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa rekayasa jaringan tulang, menggunakan scaffold mineral dan mesenchymal stem cell, untuk prosedur rekonstruksi defek segmental pada mandibula hewan coba menunjukkan hasil yang baik (Yue et al., 2007; Yuan et al., 2008). Hal yang menarik adalah proses penyembuhan tulang ternyata tidak hanya terjadi pada tepi defek, tetapi juga diperlihatkan pada daerah sentral scaffold. Berbeda dengan mekanisme penyembuhan pasca tandur tulang otogenus yang telah cukup lama diketahui, penyembuhan pasca rekayasa jaringan tulang masih belum banyak dipelajari sampai dengan saat ini. Bagaimana mesenchymal stem cell yang dibiakkan pada scaffold berperan di dalam proses penyembuhan defek tulang masih belum dapat dijelaskan dengan pasti.

Salah satu syarat utama untuk terjadinya penyembuhan tulang adalah pertumbuhan jaringan vaskuler yang fungsional, yang disebut dengan angiogenesis, untuk mengangkut oksigen, nutrisi, faktor pertumbuhan dan berbagai jenis sel yang diperlukan di dalam proses penyembuhan (Kanczler & Oreffo, 2008). Berkaitan dengan cell-based therapy, angiogenesis di dalam scaffold sangat penting untuk viabilitas mesenchymal stem cell (MSC) yang ditenkukan pada scaffold karena difusi melalui cairan jaringan hanya efektif maksimal dalam jarak 150-200 μm dari sumber pembuluh darah (Sutherland et al., 1986; Colton, 1995).

Peningkatan angiogenesis ke dalam scaffold memerlukan induksi faktor angiogenik, terutama vascular endothelial growth factors (VEGF), yang memicu kaskade aktifitas molekuler dan seluler yang berujung pada pertumbuhan jaringan vaskuler (Rossant dan Howard, 2002; Tammela et al., 2005). Penelitian eksperimental membuktikan bahwa pada defek fraktur tulang terdapat peningkatan ekspresi VEGF oleh berbagai macam sel pada jaringan di sekitar defek seperti angioblas, sel osteoprogenitor, dan osteoblas (Tatsuyama et al., 2000; Uchida et al., 2003). Mekanisme angiogenesis tersebut di atas dapat diekstrapolasikan untuk menjelaskan pola penyembuhan di bagian tepi scaffold akan tetapi bagaimana dengan proses angiogenesis pada daerah sentral scaffold yang relatif avaskuler? Penelitian membuktikan bahwa lingkungan yang hipoksik dapat meningkatkan ekspresi VEGF pada kultur sel endotelium (Shweiki et al., 1992; Liu et al., 1995) dan kultur mesenchymal stem cell (Potier et al., 2007). Berdasarkan hal tersebut di atas, daerah sentral scaffold yang avaskuler dan hipoksik diduga merupakan kondisi yang menginduksi peningkatan ekspresi VEGF oleh MSC di dalam scaffold sehingga memicu angiogenesis sebagai tahap awal penyembuhan tulang di dalam scaffold.

Proses penyembuhan yang penting selanjutnya adalah diferensiasi MSC ke arah osteoblas yang berujung pada pembentukan matriks tulang. Faktor apa yang menginduksi diferensiasi osteogenik MSC di dalam scaffold masih belum dapat diketahui dengan pasti

sampai dengan saat ini. Penelitian membuktikan bahwa diferensiasi osteogenik MSC diinduksi oleh transforming growth factors beta (TGF- β) dan bone morphogenetic proteins (BMPs) utamanya BMP2. Pada proses penyembuhan fraktur tulang, BMP2 dihasilkan lewat degradasi matriks tulang dan dari sirkulasi darah, di mana BMP2 tersebut berperan di dalam proses recruitment MSC menuju daerah defek (van Baardewijk et al., 2012). Mengingat daerah sentral scaffold jauh dari tepi defek maka BMP2 yang berperan di daerah tersebut mungkin berasal dari MSC yang telah dibiakkan pada scaffold tersebut. Penelitian in vitro membuktikan bahwa MSC dan osteoblas mengekspresikan BMP2 (Gazit et al., 1993; Hanada et al., 2001). Dengan demikian, BMP2 yang diekspresikan oleh MSC di dalam scaffold tersebut berarti memiliki 2 peran yaitu sebagai osteoinduktor otokrin, yaitu kemampuan menginduksi osteo-diferensiasi MSC itu sendiri, dan bersifat parakrin, yang berperan di dalam menginduksi recruitment dan diferensiasi osteogenik circulating MSC.

Diferensiasi MSC menjadi osteoblas melibatkan faktor transkripsi spesifik yaitu Runx-related transcription factor-2 (Runx2) sehingga ekspresi Runx2 oleh MSC dapat digunakan sebagai indikator bahwa sel tersebut telah mengalami proses diferensiasi osteogenik menjadi osteoblas (Kern et al., 2001). Osteoblas menghasilkan serabut kolagen tipe-I membentuk matriks osteoid. Osteoblas, pada tahap selanjutnya akan mengalami maturasi, yang ditandai dengan ekspresi osteocalcin, mendeposisikan mineral hidroksiapatit pada matriks osteoid sehingga membentuk trabekula tulang (Nakamura, 2007; Tanaka et al., 2007).

Berdasarkan uraian teoritis tersebut di atas diduga bahwa MSC di dalam scaffold berperan di dalam proses penyembuhan tulang melalui signalling yang menginduksi angiogenesis dan diferensiasi osteogenik di dalam scaffold. Untuk membuktikan mekanisme tersebut di atas dan apakah terdapat perbedaan dengan proses penyembuhan pada autogenous bone graft diperlukan pembuktian secara ilmiah melalui penelitian eksperimental in vivo dengan menggunakan hewan coba.

Rekayasa jaringan tulang menggunakan MSC karena MSC memiliki sifat multipoten yakni dapat mengalami diferensiasi menjadi berbagai jenis sel mesenkimal seperti tulang, kartilago, tendon, lemak dan otot (Caplan, 2007). Mesenchymal stem cell dapat diisolasi dari berbagai macam jaringan dewasa, antara lain sumsum tulang, lemak, periosteum, otot, kulit, darah tepi, dan cord blood (Baksh et al., 2004). Mesenchymal stem cell dari sumsum tulang atau bone marrow-derived mesenchymal stem cell, disingkat dengan BM-MSC, adalah stem cell yang paling banyak diteliti karena memiliki kapasitas osteogenik yang paling tinggi dibandingkan dengan stem cell dari sumber yang lain (Sakaguchi et al., 2005). Meskipun demikian BM-MSC mempunyai kelemahan karena untuk melakukan isolasi BM-MSC diperlukan prosedur aspirasi sumsum tulang yang invasif dan kualitas stem cell yang didapat dipengaruhi oleh kondisi fisik dan usia penderita. Oleh karena itu, tantangan rekayasa jaringan tulang saat ini adalah menemukan sumber MSC lain yang memiliki potensi osteogenik yang baik sekaligus meminimalkan morbiditas pada penderita.

Membran amnion plasenta manusia belakangan mulai diteliti potensinya di dalam terapi sel dan rekayasa jaringan. Membran amnion telah lama digunakan secara klinis sebagai bahan penutup luka bakar kulit, rekonstruksi lapisan kornea dan konjungtiva, dan transplantasi kulit (Parolini et al., 2009; Rennie et al., 2012) karena memiliki sifat anti-inflamasi (Tseng et al., 1999; Solomon et al., 2001) dan bersifat imunogenik dan antigenik rendah (Kubo et al., 2001; Wang et al., 2006). Di samping itu, membran amnion diketahui mengandung beberapa jenis stem cell, salah satunya adalah human amniotic membrane stem cell atau disingkat dengan hAMSC. Meskipun demikian, dari penelusuran literatur yang ada ternyata hAMSC sampai saat ini masih belum banyak diteliti manfaat klinisnya.

Dari beberapa penelitian *in vitro* diketahui bahwa hAMSC mempunyai sifat pluripoten yakni dapat berdiferensiasi menjadi tiga jenis germ layers (Miki et al. 2005; Kim et al., 2007), dan berdiferensiasi ke arah sel osteoprogenitor (Chen et al., 2011). Hal ini

menunjukkan potensi hAMSC sebagai sumber stem cell untuk regenerasi jaringan tulang. Akan tetapi, sampai dengan saat ini belum ada penelitian tentang potensi hAMSC dalam proses penyembuhan defek tulang rahang. Oleh karena itu peneliti ingin mengetahui apakah aplikasi hAMSC pada cell-based therapy memiliki peran dalam proses penyembuhan critical size defect di mandibula. Pembenuhan hAMSC di dalam scaffold secara teoritik akan membuat cell-based therapy ini bersifat osteogenik, osteokonduktif dan osteoinduktif sehingga secara logika memiliki efektifitas penyembuhan tulang setara dengan autogenous bone graft.

Salah satu jenis scaffold yang sering digunakan untuk rekayasa jaringan tulang adalah tulang sapi yang telah dihilangkan kandungan proteinnya sehingga hanya mengandung unsur inorganik saja, disebut juga dengan deproteinized bovine bone mineral (BBM) atau bovine hydroxylapatite (BHA). Telah dibuktikan bahwa struktur macro dan microporous BBM adalah yang paling menyerupai struktur tulang manusia (Fassina et al., 2010). Kandungan hidroksiapatit di dalam BBM mengalami biodegradasi dalam waktu relatif lama sehingga memberikan kekuatan mekanis yang tinggi. Hal ini dianggap menguntungkan karena pada critical size defect tulang kekuatan mekanik yang tinggi menjamin terjadinya pertumbuhan dan diferensiasi stem cell secara sempurna di dalam porositas scaffold (Muschler et al., 2004). Meskipun demikian, potensi BBM sebagai konstruk scaffold rekayasa jaringan untuk merekonstruksi critical size defect pada mandibula belum banyak diteliti.

Berdasarkan uraian tersebut di atas, timbul dua permasalahan, yaitu apakah terdapat perbedaan mekanisme penyembuhan critical size defect mandibula antara kombinasi hAMSC - scaffold bovine bone mineral dan metode autogenous bone graft, dan apakah kombinasi hAMSC - scaffold bovine bone mineral memiliki efektifitas penyembuhan tulang menyamai autogenous bone graft pada rekonstruksi critical size defect mandibula.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas maka permasalahan yang timbul adalah “Apakah terdapat perbedaan **mekanisme tahap awal** dan **tahap lanjut** penyembuhan critical size defect di mandibula dan apakah terdapat perbedaan **efektifitas** penyembuhan critical size defect di mandibula antara scaffold BBM-hAMSC dan autogenous bone graft?”

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum:

Menjelaskan apakah terdapat perbedaan **mekanisme tahap awal** dan **tahap lanjut** penyembuhan critical size defect di mandibula dan apakah terdapat perbedaan **efektifitas** penyembuhan critical size defect di mandibula antara scaffold BBM-hAMSC dan autogenous bone graft

1.3.2. Tujuan Khusus:

1. Menganalisis perbedaan jumlah sel yang mengekspresikan **VEGF** pada tahap awal penyembuhan critical size defect mandibula pasca implantasi dengan scaffold BBM-hAMSC, scaffold BBM saja dan autogenous bone graft
2. Menganalisis perbedaan **angiogenesis** (jumlah jaringan vaskuler) pada tahap awal penyembuhan critical size defect mandibula pasca implantasi dengan scaffold BBM-hAMSC, scaffold BBM saja dan autogenous bone graft
3. Menganalisis perbedaan jumlah sel yang mengekspresikan **BMP-2** pada tahap awal penyembuhan critical size defect mandibula pasca implantasi dengan scaffold BBM-hAMSC, scaffold BBM saja dan autogenous bone graft
4. Menganalisis perbedaan jumlah sel yang mengekspresikan **Runx-2** pada tahap awal dan tahap lanjut penyembuhan critical size defect mandibula pasca implantasi dengan scaffold BBM-hAMSC, scaffold BBM saja dan autogenous bone graft

5. Menganalisis perbedaan jumlah sel yang mengekspresikan **osteocalcin** pada tahap lanjut penyembuhan critical size defect mandibula pasca implantasi dengan scaffold BBM-hAMSC, scaffold BBM saja dan autogenous bone graft
6. Menganalisis perbedaan ketebalan serabut **kolagen tipe-I** pada tahap lanjut penyembuhan critical size defect mandibula pasca implantasi dengan scaffold BBM-hAMSC, scaffold BBM saja dan autogenous bone graft
7. Menganalisis perbedaan luas **matriks (trabekula) tulang** pada tahap lanjut penyembuhan critical size defect mandibula pasca implantasi dengan scaffold BBM-hAMSC, scaffold BBM saja dan autogenous bone graft
8. Menganalisis perbedaan tingkat **inkorporasi** antara matriks tulang baru dan tulang resipien pada tahap lanjut penyembuhan critical size defect mandibula pasca implantasi dengan scaffold BBM-hAMSC, scaffold BBM saja dan autogenous bone graft

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat akademik

Memberikan informasi ilmiah tentang mekanisme penyembuhan critical size defect di mandibula pasca implantasi dengan autogenous bone graft dan komposit scaffold bovine bone mineral (BBM) - human amniotic mesenchymal stem cell (hAMSC).

1.4.2. Manfaat praktis

Hasil penelitian ini dapat digunakan untuk mengembangkan potensi membran amnion plasenta manusia dalam strategi rekayasa jaringan untuk memperbaiki struktur dan fungsi mandibula. Kombinasi hAMSC-scaffold BBM diharapkan dapat digunakan sebagai alternatif autogenous bone graft dalam melakukan rekonstruksi critical size defect pada mandibula.