

THE EFFECT OF BONE MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS OF THE FIBROTIC TISSUE SPACE OF THE HEALING GASTROCNEMIUS MUSCLE OF A RABBIT

Jeffry Andrianus*, Tri Wahyu Martanto**

**Resident of Orthopaedic and Traumatology Department ,
**Senior Consultant of Orthopaedic and Traumatology Department,
Medical Faculty of Airlangga University/ Dr Soetomo General Hospital
SURABAYA-INDONESIA*

ABSTRACT

Background : Tissue engineering techniques have shown promise in the treatment of muscle injury. The present study tested the hypothesis that bone marrow derived mesenchymal stem cells can accelerate and modulate muscle healing process after primary repair of muscle injury in rabbit models.

Materials and Methods : In this study we use a post-test only control group design study. Fifteen New Zealand White rabbits were used as experimental animals. The injury model was sharp complete transected through midsubstance of gastrocnemius muscle. The transected muscle immediately repaired with running suture of the epimysium using prolene 4.0 and a primary suture of the fascia using prolene 5.0. Both lower limb were used, the left gastrocnemius muscle receive bone marrow derived stem cells and the counter part limb with no mesenchymal stem cells. Specimens were harvested at fourth weeks. The purpose of this work was to evaluate the fibrotic tissue space in the repair site of a given stem cells of a rabbit's gastrocnemius muscle.

Results : Analyzed with Kolmogorov-Smirnov and Shapiro Wilk test, all groups have a normal distribution ($p > 0,05$). Analyzed with Independent t-test, there were significant differences between the two groups in the histological evaluation on fibrotic tissue space at repair site of transected gastrocnemius muscle compared to control muscle ($p = 0,008$).

Conclusions : Intramuscular cell therapy with bone marrow derived mesenchymal stem cells following primary muscle repair, minimized the fibrotic tissue space within repair site of the rabbit's gastrocnemius muscle.

Keyword : Mesenchymal stem cells, gastrocnemius muscle healing, fibrotic tissue space.

PENDAHULUAN

Trauma pada otot sangat sering terjadi, insiden kejadiannya bervariasi dari 10 % sampai 55 % dari semua trauma, baik trauma akibat kecelakaan maupun cedera pada olah raga. Trauma pada otot ini dibagi menjadi dua yaitu trauma yang mengakibatkan kerusakan pada myofiber dan kerangka jaringan penyambung (*connective tissue*) dan *trauma insitu* dimana hanya myofiber yang mengalami kerusakan ^(1,2).

Jaringan otot bergaris mengisi 40% hingga 50% dari berat seluruh tubuh merupakan jaringan yang terbesar di dalam tubuh. Jaringan ini terdiri dari sejumlah otot dengan jaringan saraf dan pembuluh darah serta matriks jaringan ikat seluler di sekitarnya. Otot berfungsi sebagai organ yang berkontraksi menghasilkan gerakan sendi dan gaya penggerak tubuh. Trauma pada otot membutuhkan proses penyembuhan dengan immobilisasi yang cukup lama. Hal ini sering menyebabkan gangguan berupa kekakuan akibat berkurangnya elastisitas dan pengecilan massa otot yang akan menyebabkan ketidakmampuan dan kecacatan di kemudian hari⁽³⁾.

Proses penyembuhan cedera otot pada dasarnya dibagi menjadi tiga fase yang saling tumpang tindih. Fase inflamasi yang ditandai dengan nekrosis, pembentukan hematoma dan reaksi inflamasi. Fase reparasi yang ditandai dengan regenerasi sel otot, pembentukan jaringan ikat dan penyembuhan sel otot. Fase remodeling yang ditandai dengan maturasi sel sel otot dan reorganisasi jaringan fibrotik. Proses penyembuhan otot adalah proses yang seimbang antara regenerasi otot dan pembentukan jaringan fibrotik^(2,4).

Penyembuhan cedera otot yang terjadi seringkali belum memuaskan para klinisi, terutama karena seringnya terjadi jaringan fibrosis. Jaringan fibrosis pada proses penyembuhan luka ini akan mengurangi elastisitas dan kekuatan otot untuk

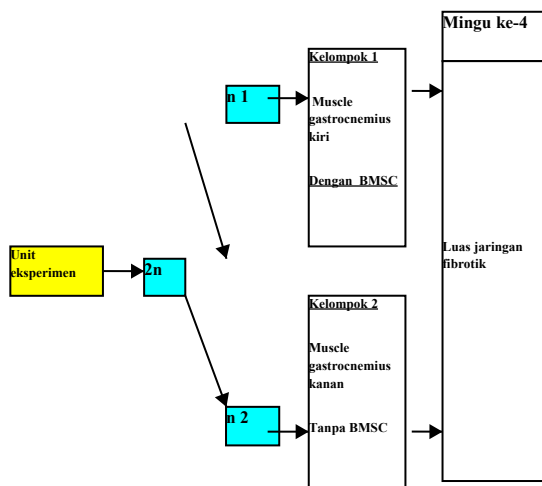
berkontraksi. Hal ini akan mengakibatkan otot lebih mudah mengalami robekan apabila terjadi trauma^(1,2).

Stem cells adalah sel yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai macam jaringan, salah satunya adalah sel otot. Stem cells berperan penting dalam proses regenerasi jaringan bila mengalami kerusakan. Penelitian tentang terapi rekayasa jaringan, yaitu suatu bentuk terapi dengan menggunakan sel (*cell based therapy*) dan pemberian growth factors membuktikan bahwa hal ini dapat meningkatkan proses penyembuhan pada cedera otot.

Penelitian-penelitian eksperimental menunjukkan gambaran histologis dan fungsi biomekanik yang lebih baik pada cedera otot dengan pemberian growth factors dibandingkan dengan yang tidak diberikan growth factors ^(1,5).

MATERI DAN METODE

Rancangan penelitian ini adalah eksperimental murni dengan rancangan penelitian *Post-test only Control Group Design*. Objek penelitian ini adalah hewan kelinci putih *New Zealand* jantan. Dilakukan pengukuran variabel pada hewan coba hanya setelah diberikan perlakuan. Hewan coba ini dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama kelompok perlakuan, muskulus gastrocnemius kanan dipotong secara tajam pada pertengahan, dijahit secara *running suture* pada epimysium dengan menggunakan *prolene 4.0* dan diperkuat dengan jahitan primer pada lapisan fascia menggunakan *prolene 5.0*. Kemudian sisi penyambungan disuntikkan *mesenchymal stem cells*. Sementara kelompok kedua sebagai kelompok kontrol, dilakukan prosedur yang sama dengan kelompok perlakuan tetapi tidak diaplikasikan *mesenchymal stem cells*. Terminasi dan pemeriksaan dilakukan pada minggu ke empat.



Pada penelitian yang dilakukan oleh Peterson et al. didapatkan bahwa transplantasi muscle derived stem cells (MDSCs) terbukti dapat menginduksi terjadinya regenerasi otot pada tikus. Penelitian ini juga didukung oleh penelitian yang lain seperti yang dilakukan oleh Huang YC et al. injeksi fibrin yang kaya akan myoblast dan matrix ekstraseluler terbukti bahwa myoblast dapat berintegrasi dengan regenerasi otot donor. Penelitian oleh Beier et al. juga membuktikan bahwa injeksi fibrin yang kaya dengan myoblast dapat menstimulasi regenerasi sel dan mengurangi terjadinya area fibrosis^{18,19,20,21}.

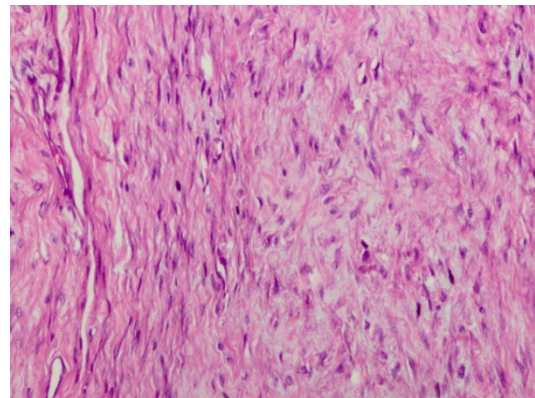
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembahasan diuraikan berdasarkan hasil analisis penelitian dan dihubungkan dengan konsep dan teori yang sudah ada. Pendekatan pembahasan dibawah ini dilakukan dengan merujuk rumusan masalah dan hipotesis yang telah dibuat pada bab sebelumnya.

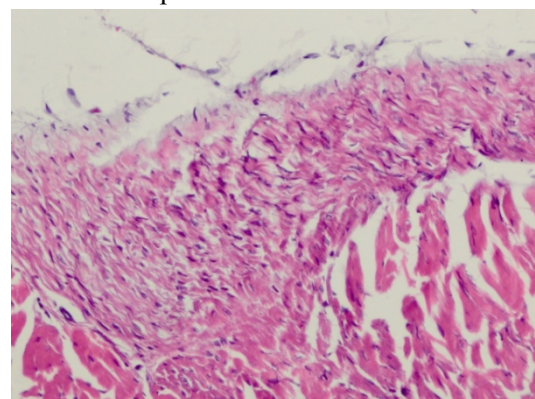
Perbandingan luas jaringan fibrotik pada sisi penyambungan otot gastrocnemius

Hasil penelitian ini menunjukkan rata-rata luas jaringan fibrotik pada kelompok perlakuan adalah **5,43 mm²** per-lapangan pandang dan pada kelompok kontrol **8,14 mm²** per-lapangan pandang. Hasil penghitungan dengan menggunakan **Independent t-test** didapatkan nilai **p=0,008 (p<0.05)**. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna luas jaringan fibrotik antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Ini artinya bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok luas jaringan fibrotik otot gastrocnemius yang diberikan *mesenchymal stem cells* dengan kelompok tendon yang tidak diberikan *mesenchymal stem cells*.

Gambar 1. Luas area fibrosis tanpa pemberian stem sel



Gambar 2. Luas area fibrosis dengan pemberian stem sel



KESIMPULAN

Terdapat perbedaan secara bermakna luas jaringan fibrotik perlapangan pandang antara otot gastrocnemius kelinci yang diaplikasi *mesenchymal stem cells* dengan otot gastrocnemius kelinci tanpa *mesenchymal stem cell* pada sisi penyambungan pada minggu keempat.

DAFTAR PUSTAKA

1. J. Menetrey, C. Kasemkijwattana, C. S. Day, P. Bosch, M. Vogt, F. H. Fu, M. S. Moreland, J. Huard." Growth factors improve muscle healing in vivo". JBJS VOL. 82-B, NO. 1 (p:131-136), JANUARY 2000.
2. Lidiane Isabel Filippin, Andrea Janz Moreira, Norma Possa Marroni, Ricardo Machado Xavier. "Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury". Elsevier, 2009.
3. William E. Garrett, Jr, Thomas M. Best."Anatomy, Physiology, and Mechanics of Skeletal Muscle". Chapter 26, Orthopaedic Basic Science, Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System 2nd Edition. AAOS 1998.
4. Stefano Ciciliot, and Stefano Schiaffino." Regeneration of Mammalian Skeletal Muscle: Basic Mechanisms and Clinical Implications". Current Pharmaceutical Design, 2010, 16, 906-914.
5. Mauro Krampera, Giovanni Pizzolo, Giuseppe Aprili, Massimo Franchini." Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair". j.bone.2006 Vol 04 (p:678-684).
6. Wikipedia, the free encyclopedia. http://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell. July 2009.
7. Gardner RL (2002). "Stem cells: potency, plasticity and public perception". *Journal of Anatomy* **200** (3): 277–82.
8. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC (2006). "Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells". *Tissue Eng* **12** (11): 3007–19
9. Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M (2007). "A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues". *Leukemia* **21** (5): 860–7.
10. History of Stem Cell Research. <http://www.cord-blood-cells.com/history-of-stem-cell-research.html>
11. Zheng Jun et al. Skeletal myogenesis by human embryonic stem cells. 2006. *Cell Research*; 16: 713-722
12. Zammit Peter et al. The skeletal muscle satellite cell: The stem cell that came in from the cold. *J Histochem-Cytochem*. 2006; 54: 1177-91

13. Tidball JG Schiaffino S, Partridge T, Eds. "Inflammation in skeletal muscle regeneration. In: Skeletal muscle repair and regeneration" Springer 2008 (p:243-268).
14. Jerzy Kawia¹, Edyta Brzóska¹, Iwona Grabowska, Grazyna Hoser, Władysława Streminska, Danuta Wasilewska, Eugeniusz Krzysztof Machaj, Zygmunt Pojda and Jerzy Moraczewski. "Contribution of stem cells to skeletal muscle regeneration". FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA. Vol. 44, No. 2, 2006(p:75-79).
15. Sandra G. Velleman. "Role of the Extracellular Matrix in Muscle Growth and Development" Department of Animal Sciences, Ohio Agricultural Research and Development Center, The Ohio State University, Wooster, Ohio. 2002.
16. Sander Grefte, Anne Marie Kuijpers-Jagtman, Ruurd Torensma, and Johannes W. Von Den Hoff. "Skeletal Muscle Development and Regeneration" STEM CELLS AND DEVELOPMENT 2007, Vol 16 (p:857-868).
17. Lee JY, Z Qu-Petersen, B Cao, S Kimura, R Jankowski, J Cummins, A Usas, C Gates, P Robbins, A Wernig and J Huard. "Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing." J Cell Biol 150 (p:1085-1100).
18. Qu-Petersen Z, B Deasy, R Jankowski, M Ikezawa, J Cummins, R Pruchnic, J Mytinger, B Cao, C Gates, A Wernig and J Huard. "Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration." J Cell Biol 157 (p: 851-864).
19. Huang YC, RG Dennis, L Larkin and K Baar. "Rapid formation of functional muscle in vitro using fibrin gels." J Appl Physiol 98 (p: 706-713.)
20. Beier JP, J Stern-Straeter, VT Foerster, U Kneser, GB Stark and AD Bach. "Tissue engineering of injectable muscle: three-dimensional myoblast-fibrin injection in the syngeneic rat animal model." Plast Reconstr Surg 118 (p: 1113-1121).