

Kesan β -gliserofosfat Terhadap Ampaian Sel Mononukleus daripada Darah Periferi Manusia

(Effect of β -glycerophosphate on Suspension Mononucleus Cell from Human Peripheral Blood)

NURUL ATIKAH AHMAD, SHAHRUL HISHAM ZAINAL ARIFFIN*, ROHAYA MEGAT ABDUL WAHAB, MUHAMAD ABDUL RAZAK & SAHIDAN SENAFI

ABSTRAK

*Sel osteoblas merupakan sel mononukleus yang bertanggungjawab untuk pembentukan tulang. Sel mononukleus telah terbukti mampu membezakan kepada sel osteoblas setelah diaruh oleh kombinasi asid askorbik dan β -gliserofosfat sebagai faktor pembezaan. Tujuan kajian ini adalah bagi melihat kesan aruhan β -gliserofosfat terhadap ampaian sel mononukleus daripada darah periferi manusia secara *in vitro*. Sel mononukleus dipencilkan daripada darah periferi manusia dengan menggunakan larutan Ficoll-Paque™ Plus melalui kaedah pengemparan kecerunan ketumpatan. Sel mononukleus kemudian dikultur selama 7 hari di dalam medium proliferasi sebelum diaruh dengan β -gliserofosfat pada kepekatan 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, dan 100 mM. Pada hari 0, 1, 3, 7, dan 14, penentuan profil aktiviti enzim alkalin fosfatase (ALP) dan analisis morfologi bagi sel osteoblas dilakukan dalam medium masing-masing. Aktiviti enzim ALP dan analisis morfologi menunjukkan peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) antara sel yang diaruh dengan sel kawalan negatif melalui statistik ujian-t berpasangan. Kesimpulannya, kehadiran β -gliserofosfat sahaja mampu untuk mengaruh pembezaan sel mononukleus kepada sel osteoblas. Kesan β -gliserofosfat terhadap pembezaan sel mononukleus kepada sel osteoblas menunjukkan profil enzimologi (aktiviti enzim ALP) dan morfologi yang hampir sama dengan kawalan positif (asid askorbik dan β -gliserofosfat). Berdasarkan kepada analisis enzimologi dan morfologi 1 mM β -gliserofosfat adalah kepekatan yang paling sesuai untuk pembezaan sel osteoblas secara *in vitro*.*

Kata kunci: β -gliserofosfat; ampaian sel mononukleus

ABSTRACT

*Osteoblast cell is a mononucleus cell that is responsible for bone formation. Mononucleus cell have been proven to differentiate into osteoblast cell after being induced with combinations of ascorbic acid and β -glycerophosphate as differentiation factors. This study aimed to observe the *in vitro* effect of a single β -glycerophosphate induction towards primary mononucleated cells suspension that have been isolated from human peripheral blood. Mononucleus cells were isolated from human peripheral blood using density gradient centrifugation method in the present of Ficoll-Paque™ Plus. Mononucleus cells were cultured for 7 days in proliferation medium before being induced by 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, and 100 mM of β -glycerophosphate. Alkaline phosphatase (ALP) activity profile and morphological analysis were done at day 0, 1, 3, 7 and 14 in their respective medium. The activity of ALP enzyme and morphology analysis showed a significant increase ($p < 0.05$) between cells that have been induced with the negative control cells by using paired *t*-test statistical analysis. In conclusion, the presence of only β -glycerophosphate is able to induce mononucleated cell differentiation into osteoblast cells. The effect of β -glycerophosphate towards mononucleated cells differentiation showed similar enzymological (ALP activities) and morphological profile as positif control (ascorbic acid and β -glycerophosphate). Based on enzymological and morphological analyses, 1 mM of β -glycerophosphate is the best concentration for *in vitro* osteoblast differentiation.*

Keywords: β -glycerophosphate; suspension mononucleus cell

PENGENALAN

Sel stem dikenali sebagai sel induk yang berupaya untuk menjalani kedua-dua proses pembahagian dan pembezaan sel (Shahrul Hisham et al. 2005). Kajian oleh Clyton (2003) menunjukkan bahawa sel stem hematopoietik bukan hanya boleh membentuk sel hematopoietik sahaja malah juga mampu membahagi dan membezakan untuk membentuk sel bukan hematopoietik di bawah mikrosekitaran yang sesuai.

Kajian oleh Intan Zarina et al. (2008, 2010) mendapati wujudnya pemineralan ke atas sel mononukleus daripada darah periferi mencit yang dikultur di dalam medium *Alpha Minimal Essential Medium* (AMEM) yang mengandungi kombinasi faktor pembezaan, iaitu, 50 μ g/mL asid askorbik (AA) dan 10 mM β -gliserofosfat (β GFP). Keadaan yang hampir sama turut diperoleh dalam kajian ke atas sel stem embrio mencit yang diaruh secara *in vitro* dengan

kehadiran kombinasi faktor pembezaan, iaitu, AA, β GF, dan vitamin D₃ (zur Niedan et al. 2003).

Kajian oleh Coelho dan Fernandes (1999) menunjukkan sel primitif yang komited iaitu sel progenitor osteoblas daripada sumsum tulang manusia yang dikultur tanpa kehadiran β GF memperlihatkan kadar proliferasi yang tinggi namun kadar pembezaan sel osteoblas melalui analisis enzimologi dan morfologi adalah rendah. Ini dibanding dengan kehadiran kombinasi faktor pembezaan, iaitu, β GF bersama AA atau vitamin D₃. Bagi kultur yang diaruh dengan β GF sahaja, pembezaan sel osteoblas yang lengkap juga diperoleh berdasarkan kedua-dua analisis tersebut. Namun begitu, pembentukan matriks bermineral membawa kepada penurunan kadar proliferasi. Hal ini menjelaskan bahawa kehadiran β GF menjadikan kadar proliferasi menurun tetapi lebih banyak sel membeza kepada sel osteoblas berbanding kepada kultur tanpa aruhan β GF. Kajian oleh Fratzl-Zelman et al. (1998) pula dijalankan ke atas kultur titisan sel mencit pra-osteoblas, MC3T3-E1 bagi melihat kadar pemineralan matriks kultur sel ini apabila diaruh dengan β GF. Didapati hasil pemineralan adalah sama bagi kesemua kepekatan β GF yang diuji (2-10 mM). Ini menunjukkan pemineralan matriks berlaku tanpa bergantung kepada kepekatan ion fosfat.

Dalam kajian ini, ampaian sel mononukleus dipencilkan daripada darah primari manusia dan diaruh dengan kepekatan β GF yang berlainan (1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM dan 100 mM) tanpa kehadiran AA. Kajian ini berbeza dengan kajian-kajian lampau (Coelho & Fernandes 1999; Fratzl-Zelman et al. 1998; Intan Zarina et al. 2008, 2010) kerana kajian ini menggunakan sel mononukleus yang dipencilkan daripada darah periferi manusia yang merupakan sel ampaian yang berpotensi untuk dihasilkan dengan banyak menggunakan teknologi bioreaktor. Sel primer jenis ini daripada darah periferi mencit telah dikenalpasti berupaya untuk membeza kepada sel osteoblas matang (Intan Zarina et al. 2008, 2010).

Mengkaji kesan sesuatu bahan kimia ke atas pembezaan sel stem atau sel progenitor kepada sel osteoblas merupakan suatu kajian yang boleh menyumbang kepada pemahaman yang mendalam terhadap proses biologi yang mengawal pembentukan dan penyerapan tulang serta cara pengekalan keseimbangannya (Kassem et al. 2008). Kajian sebelum ini yang melibatkan mencit menunjukkan bahawa sel mononukleus daripada darah periferi boleh membeza kepada sel osteoblas apabila ditambah dengan kombinasi dua faktor pembezaan iaitu β GF dan AA (Intan Zarina et al. 2008, 2010). Dalam kajian ini sel mononukleus yang dipencilkan daripada darah periferi manusia digunakan untuk melihat kesan aruhan β GF pada julat kepekatan 1-100 mM. Hasil kajian ini seterusnya dapat mengenalpasti keupayaan β GF untuk mengaruh pembezaan ampaian sel mononukleus daripada darah periferi manusia kepada sel osteoblas matang tanpa kehadiran AA dan faktor pembezaan yang lain.

BAHAN DAN KAEDAH

PENGKULTURAN SEL

Sampel darah periferi diambil setelah mendapat kebenaran bertulis daripada individu yang memenuhi kriteria seperti berikut: mempunyai tahap kesihatan umum yang baik, tidak mengambil sebarang dadah anti-keradangan, wanita tidak mengandung dan mendapat kebenaran pesakit atau penjaga untuk menyertai kajian ini. Sampel darah periferi dicampur dengan HBSS pada nisbah 1:3. Campuran ini dilapiskan dengan berhati-hati di atas lapisan Ficoll-Paque™ (Stemcells Technologies) di dalam tiup falcon 1.5 mL (BD Biosciences) supaya tidak bercampur dengan larutan Ficoll-Paque™ dan diempar dengan menggunakan kaedah pengemparan pembezaan ketumpatan pada kelajuan 400 g selama 20 minit pada suhu bilik. Nisbah campuran darah dan HBSS kepada Ficoll-Paque™ adalah 1:1.5. Sel mononukleus berada di lapisan yang ke-2 di antara lapisan plasma (di atas) dan Ficoll-Paque™ (di bawah). Sel mononukleus tersebut seterusnya dicuci dengan menggunakan salin berpenimbal fosfat (PBS) melalui pengemparan pada kelajuan 400 g selama 5 minit pada suhu bilik. Supernatan dibuang sementara pelet akan dicuci sekali lagi dengan cara yang sama menggunakan PBS. Pelet kemudiannya dilarutkan dengan 1 mL medium proliferasi. Seterusnya, bilangan sel mononukleus viabel dikira bagi menentukan isipadu yang perlu diambil untuk pengkulturan sel sebanyak 1.0×10^5 sel/mL bagi setiap telaga pada mikroplat 24 telaga (SPL Life Science). Kaedah tripan biru digunakan bagi pengiraan bilangan sel dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Bil. sel (sel/mL)} = \frac{\text{Jum. sel pada 4 segi empat}}{4 \text{ segi empat}} \times 10^4 \times \text{Faktor pencairan}$$

Campuran sel dan medium pertumbuhan lengkap diambil sebanyak 10 μ L untuk diwarnakan dengan pewarna tripan biru 0.4% (v/v) daripada Cellgro, Mediatech Inc. pada nisbah 1:1 dan pengiraan dilakukan di atas slaid haemositometer di bawah mikroskop medan songsang (Olympus CKX31).

PROLIFERASI SEL SEMASA PEMBEZAAN

Selepas 7 hari sel mononukleus dipencil dan dikultur secara *in vitro*, bilangan sel-sel viabel dikira bagi menentukan isipadu yang perlu diambil daripada campuran sel dan medium pembezaan untuk melakukan pengkulturan sel sebanyak 1.0×10^5 sel/mL. Sel-sel viabel dikira pada hari 1, 3, 7 dan 14 iaitu selepas ditambah faktor pembezaan dengan menggunakan kaedah tripan biru bagi melihat kadar proliferasi sel tersebut. Pengiraan dilakukan di atas slaid haemositometer dan sebanyak tiga kali pengiraan dilakukan pada setiap uji kaji. Setiap data merupakan purata bagi tiga uji kaji yang dijalankan secara berasingan.

Setelah mengetahui isipadu campuran sel dan medium pertumbuhan lengkap yang diperlukan, medium proliferasi kemudiannya ditambah bagi mencukupkan isipadu akhir yang telah ditentukan. Medium proliferasi ditukar setiap tiga hari dan pensubkulturan dilakukan apabila sel-sel telah memenuhi ruang telaga. Sel dikultur secara *in vitro* pada suhu 37°C dengan kehadiran 5% CO₂.

AKTIVITI ALKALIN FOSFATASE (ALP) SEBAGAI PENANDA BIODIAGNOSTIK OSTEOBLAS

Pengasaan alkalin fosfatase (ALP) dijalankan pada hari 0, 1, 3, 7, dan 14 dalam medium pembezaan dan medium proliferasi (medium kawalan). Sebanyak 40 µL sampel sel diambil untuk pengasaan enzim ALP; sebanyak 30 µL diambil bagi penentuan aktiviti ALP dan jumlah protein menggunakan kaedah Bradford (Bradford 1976) manakala 10 µL untuk penentuan kadar proliferasi sel menggunakan kaedah pewarnaan tripan biru. Sel kemudiannya dicuci dengan menggunakan 100 µL PBS sebanyak dua kali dan diempar pada kelajuan 800 g selama 5 min.

Pelet dilarutkan dengan 1 M penimbal karbonat (pH 10), 1% (v/v) triton X-100, MgSO₄ (20 mM), 1 × PBS, dan p-nitrofenil fosfat (600 mM). Isipadu akhir campuran ialah 500 µL. Campuran seterusnya divortek sebelum dieram pada suhu 37°C selama 30 min. Sebanyak 1.0 mL 1.5 M natrium hidroksida dicampurkan untuk menghentikan tindakbalas enzim-substrat. Nilai ketumpatan optik penghasilan produk p-nitrofenol dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 405 nm. Bacaan OD yang diperolehi ditukarkan kepada unit bagi aktiviti enzim iaitu 1 Unit (1U) yang bersamaan dengan 1 µmol pembebasan p-nitrofenol per minit pada 37°C dan dinyatakan sebagai jumlah unit aktiviti alkalin fosfatase/mL (U/mL). Jumlah aktiviti spesifik enzim ALP (U/mg) didapati dengan membahagikan jumlah aktiviti ALP dengan jumlah kandungan protein (mg/mL) yang terdapat dalam satu populasi sel pada kepekatan 1 × 10⁴ sel/mL hasil daripada pengasaan Bradford.

PEMBENTUKAN MENDAPAN MINERAL KALSIMUM FOSFAT

Pewarnaan von Kossa dijalankan pada hari 0, 1, 3, 7, dan 14 dalam medium pembezaan bagi melihat sama ada proses pemineralan berlaku ataupun tidak. Sampel sel diambil dan dicuci dengan menggunakan 100 µL PBS sebanyak dua kali sebelum diempar menggunakan pengempar (Beckman Coulter™ microfuge® 18 Centrifuge; rotor F241.5P) pada kelajuan 400 g selama 5 min. Pelet kemudian dilarutkan dengan 100 µL PBS. Kaedah pengemparan-sito (Hettich Zentrifugen micro 22 R; rotor 1048) digunakan bagi memastikan sel melekat pada slaid. Kaedah pengemparan-sito dijalankan pada 900 g selama 5 min pada suhu bilik.

Setelah kering, slaid direndam dalam 10% (v/v) larutan formalin di dalam 1 × PBS selama 30 min. Slaid kemudian dibilas sebanyak tiga kali dengan menggunakan air suling ternyahion. Selepas itu, slaid direndam pula di dalam 5%

(w/v) larutan nitrat perak selama 30 min dan dibilas dengan air suling ternyahion sebanyak tiga kali lagi. Kemudian, slaid direndam dalam 5% (w/v) natrium karbonat dalam 25% (v/v) formalin selama 5 min diikuti dengan bilasan air suling ternyahion sebanyak tiga kali. Akhirnya, slaid direndam dalam 5% (w/v) natrium tiosulfat selama 2 minit sebelum bilasan sebanyak tiga kali menggunakan air suling ternyahion. Slaid kemudian dibiarkan kering dan pewarnaan sel dicerap menggunakan mikroskop cahaya (pembesaran sebenar × 400).

Analisis morfologi dijalankan pada slaid dengan mencerap bilangan sel mononukleus yang membeza kepada sel osteoblas dan sel yang tidak membeza. Setelah diwarnakan dengan pewarnaan von Kossa, sel osteoblas kelihatan seperti nodul-nodul yang berwarna coklat kehitaman atau hitam hasil daripada pempadapan matriks berkalsium (Cerovic et al. 2007) manakala sel yang tidak membeza berwarna cerah. Bilangan sel osteoblas ini kemudiannya dibahagikan dengan bilangan keseluruhan sel di atas slaid bagi mendapatkan nilai peratusan sel yang berjaya membeza pada hari 0, 1, 3, 7 dan 14. Hanya slaid yang mengandungi lebih 20 sel per slaid sahaja yang digunakan dalam analisis morfologi ini.

Analisis Statistik

Ujian-t berpasangan digunakan bagi mengira data signifikan dan ujian ini dijalankan dengan menggunakan program *Social Package for Social Sciences* (SPSS) versi 16.0. Nilai pembezaan yang signifikan ialah data yang memberikan nilai p<0.05.

HASIL DAN PERBINCANGAN

PROLIFERASI SEL MONONUKLEUS MELALUI PENGKULTURAN *IN VITRO*

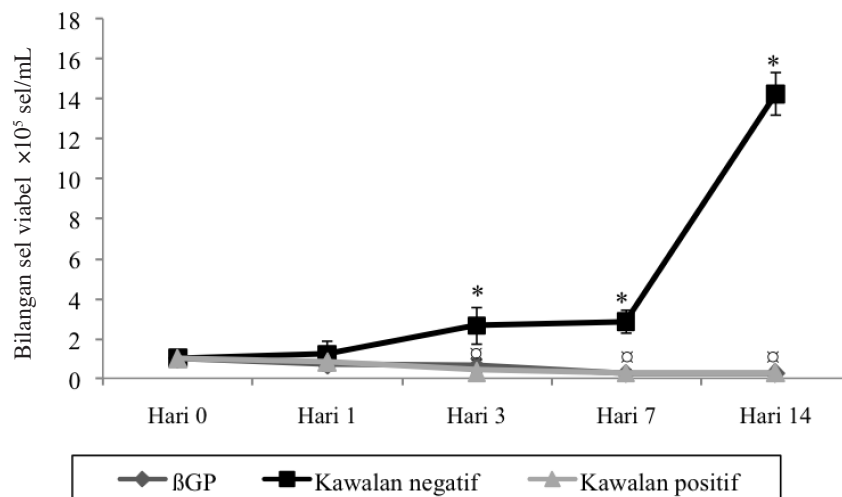
Selepas proliferasi sel selama 7 hari di dalam medium pertumbuhan lengkap (medium proliferasi) secara *in vitro*, sel mononukleus ditambah dengan faktor pembezaan. Di dalam kajian ini, faktor pembezaan AA (50 µg/mL) dan βGF (10 mM) digunakan sebagai kawalan positif kerana sudah dikenalpasti berupaya untuk mengaruh pembezaan sel mononukleus mencil kepada sel osteoblas (Intan Zarina et al. 2008, 2010). Kepekatan βGF yang pelbagai (1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, dan 100 mM) digunakan bagi melihat keupayaan βGF untuk mengaruh pembezaan tanpa kehadiran AA. Kajian oleh Fratzi-Zelman et al. (1998) terhadap sel titisan MC3T3-E1 menggunakan kepekatan 2 mM sebagai kepekatan terendah, mendapati kesannya sama dengan kepekatan yang tinggi iaitu 10 mM. Kajian ini pula menggunakan kepekatan yang lebih rendah iaitu 1 mM. Kepekatan 10 mM merupakan kepekatan yang digunakan dalam kombinasi faktor pembezaan iaitu kombinasi bersama AA dan βGF (Intan Zarina et al. 2008, 2010). 100 mM merupakan kepekatan βGF tertinggi yang dipilih kerana kekuatannya adalah sepuluh kali ganda daripada kepekatan asal iaitu kombinasi bersama AA. Kepekatan 5 mM dan 20 mM pula masing-masing dipilih kerana kekuatannya ini berada di antara julat kepekatan 1 mM

dan 10 mM serta 10 mM dan 100 mM. Kawalan negatif dalam kajian ini merupakan kultur sel mononukleus dalam medium proliferasi yang tidak ditambah dengan sebarang faktor pembezaan manakala kawalan positif merupakan pengkulturan dengan penambahan kombinasi kedua-dua faktor pembezaan iaitu β GF dan AA. Hari di mana faktor pembezaan ini ditambah dalam kultur dikenali sebagai hari 0 pengkulturan dalam medium yang mengandungi faktor pembezaan. Proliferasi sel semasa pembezaan dikira bermula dari hari 0 sehingga 14 dalam medium pembezaan. Graf proliferasi sel mononukleus (Rajah 1) menunjukkan jumlah bilangan sel mononukleus yang hidup di dalam medium kawalan negatif, kawalan positif serta purata bilangan sel mononukleus viabel bagi medium yang ditambah dengan β GF pada julat kepekatan 1 mM hingga 100 mM. Didapati bahawa bilangan sel mononukleus viabel dalam medium kawalan negatif meningkat secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding bilangan sel pada medium pembezaan iaitu medium kawalan positif dan juga apabila dibandingkan dengan medium yang ditambah dengan β GF sahaja pada kepekatan 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM dan 100 mM. Sel dalam medium kawalan positif dan medium yang mengandungi β GF didapati menurun secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kawalan negatif (Rajah 1).

Pada hari ke-3, bilangan sel mononukleus viabel di dalam medium kawalan positif dan kultur yang ditambah dengan β GF menurun berbanding kawalan negatif. Ini menunjukkan sel mononukleus tidak menjalani proliferasi dan berkemungkinan mengalami fasa pembezaan kepada sel yang lebih komited. Garisan malar pada lengkung proliferasi dari hari ke-3 hingga ke-14 bagi kesemua medium pembezaan memperlihatkan bahawa sel mononukleus mampu hidup selama 14 hari tanpa menjalani proses proliferasi (Rajah 1).

Analisis statistik ujian-t berpasangan menunjukkan penurunan yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding hari 0 pada hari ke-7 hingga ke-14 (Rajah 1). Hasil analisis ini menunjukkan bahawa lengkung proliferasi kawalan negatif adalah berbeza dengan lengkung-lengkung proliferasi kultur yang ditambah faktor pembezaan. Mengikut kajian Bellantuono (2004), hanya sel yang berada dalam proses pembezaan sahaja yang tidak boleh mengalami proliferasi apabila diaruh dengan faktor pembezaan. Ini kerana sel normal dan sel mamalia tidak dapat melakukan proses pembahagian dan pembezaan sel secara serentak. Peningkatan sintesis dan pematangan matriks ekstraselular tulang yang perlu ada semasa proses pemineralan osteoblas membawa kepada penamatan proses proliferasi. Dengan kehadiran ion fosfat, pemineralan akan berlaku apabila hubungan yang sesuai ke atas jumlah antara matrik ekstraselular dan pematangan dicapai. Sebagai hasilnya pada akhir proses pembentukan tisu tulang, proliferasi sel berhenti apabila osteoblas terperangkap di dalam matriks bermineral.

Profil proliferasi bagi sel dalam medium kawalan positif di dalam kehadiran kombinasi kedua-dua faktor pembezaan (β GF dan AA) dan medium yang hanya diaruh oleh β GF sahaja pada kepekatan yang digunakan adalah hampir sama (Rajah 1). Ini juga dapat diperhatikan melalui nilai sisihan piawai yang hampir sama antara nilai sisihan piawai sel dalam medium kawalan positif dengan nilai sisihan piawai bagi purata sel viabel dalam medium yang ditambah dengan β GF pada kesemua kepekatan yang dikaji (Rajah 1). Hasil keputusan menunjukkan bahawa proliferasi sel tidak berlaku semasa sel mononukleus yang dikulturkan di dalam kesemua kepekatan β GF yang diuji seperti juga pada sel di dalam kawalan positif.



RAJAH 1. Kesan β -gliserofosfat pada kepekatan yang berbeza terhadap proliferasi sel mononukleus. Analisis statistik menggunakan ujian t berpasangan (paired t-test) dengan hasil proliferasi dibandingkan dengan hari 0 iaitu hari di mana faktor pembezaan ditambah ke dalam medium kultur. (*) dan (o) menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan bilangan sel viabel pada medium proliferasi pada hari 0. (*) merupakan peningkatan yang signifikan dan (o) pula adalah merupakan penurunan yang signifikan. Data yang diperolehi merupakan purata \pm sisihan piawai (bar pada graf) daripada 3 ujikaji yang berlainan

AKTIVITI ALP SEBAGAI PENANDA BIOKIMIA OSTEOBLAS

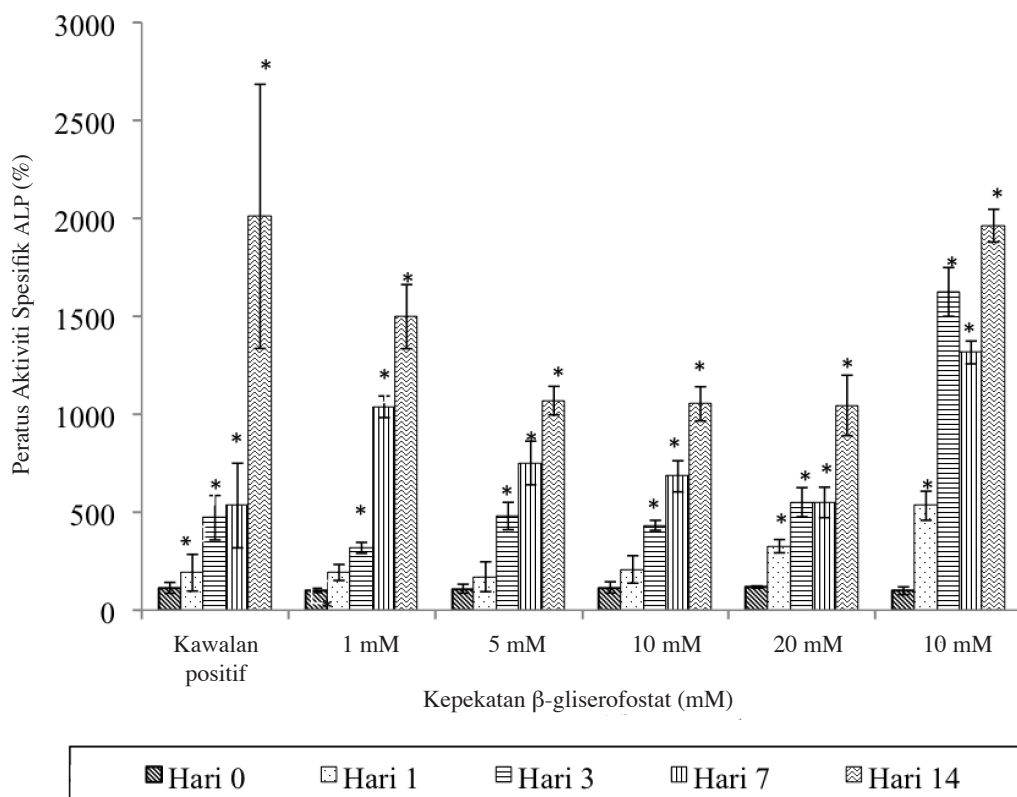
ALP merupakan penanda biokimia yang penting dalam metabolisme tulang. Keupayaan sel untuk meningkatkan kadar sintesis ALP merupakan salah satu ciri terpenting bagi fenotip osteoblas matang (Vali et al. 2007). Terdapat banyak kajian yang menggunakan ALP sebagai penanda biokimia bagi penentuan kehadiran sel osteoblas aktif. Antaranya adalah kajian oleh Coelho dan Fernandes (1999) yang menjadikan kenaikan ALP sebagai penanda biokimia bagi menentukan keupayaan sel pra-osteoblas daripada sumsum tulang membeza kepada sel osteoblas dengan kehadiran kedua-dua faktor pembezaan iaitu AA dan β GF.

Dalam kajian ini, ALP digunakan sebagai penanda biokimia bagi mengetahui kesan aruhan pada pelbagai kepekatan β GF (1 mM, 5mM, 10 mM, 20 mM dan 100 mM) terhadap pembezaan sel mononukleus kepada osteoblas. Pengasaan ALP dilakukan pada hari 0, 1, 3, 7, dan 14 bagi melihat kadar pengekspresan enzim ALP semasa pembezaan sel mononukleus kepada sel osteoblas. Rajah 2 menunjukkan kesan aruhan β GF pada kepekatan yang ditetapkan (1 mM, 5mM, 10 mM, 20 mM dan 100 mM) terhadap aktiviti spesifik ALP. Kawalan negatif dan hari 0 bagi setiap kepekatan β GF memberikan aktiviti ALP yang hampir sama dan seterusnya digunakan sebagai perbandingan dengan kepekatan β GF pada hari yang

lain (hari 1, 3, 7 dan 14). Aktiviti spesifik ALP diperolehi dengan membahagikan aktiviti ALP bagi sesuatu sampel kultur dengan jumlah protein yang terdapat dalam sampel kultur tersebut pada populasi sel sebanyak 1×10^4 sel/mL. Peratus spesifik ALP pada Rajah 2 adalah diperolehi melalui pembahagian aktiviti spesifik bagi kultur yang ditambah faktor pembezaan dengan aktiviti spesifik bagi kawalan negatif.

Terdapat peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) dari hari 1 hingga 14 bagi kawalan positif dan semua kepekatan β GF kecuali pada kepekatan 5 mM dan 10 mM yang tidak signifikan ($p > 0.05$) pada hari 1 berbanding kawalan negatif (Rajah 2). Peningkatan yang signifikan ini menunjukkan bahawa sel osteoblas sedang aktif menghasilkan enzim ALP yang merupakan penanda kepada permulaan proses pembentukan tulang (Kartsogiannis & Ng 2004).

Aktiviti spesifik ALP dilihat meningkat dengan mendadak pada hari ke-14 untuk kesemua kepekatan β GF termasuk kawalan positif. Kajian oleh Intan Zarina et al. (2008, 2010) menunjukkan bahawa peningkatan aktiviti spesifik ALP yang mendadak pada hari ke-14 adalah disebabkan oleh pada masa tersebut, sel telah membeza kepada sel osteoblas. Profil peningkatan peratusan aktiviti spesifik ALP antara β GF pada kepekatan yang ditetapkan dan kawalan positif adalah hampir sama iaitu semakin meningkat dari hari 0 hingga ke-14. Kajian oleh



RAJAH 2. Kesan β -gliserofosfat terhadap peratus aktiviti spesifik alkalin fosfatase (ALP). Analisis statistik menggunakan ujian-t berpasangan (paired t-test) dengan peratus aktiviti spesifik ALP dalam medium pembezaan dibandingkan dengan dalam medium kawalan negatif. (*) menunjukkan $p < 0.05$ berbanding dengan aktiviti spesifik medium kawalan negatif. Data yang diperolehi merupakan purata \pm sisihan piawai (bar pada graf) daripada 3 uji kaji yang berlainan

Coelho dan Fernandes (1999) mendapati bahawa sel pra-osteoblas daripada sumsum tulang manusia yang dikultur dengan kehadiran β GF atau kehadiran AA bersama β GF menunjukkan pengaruh aktiviti ALP yang hampir sama. Kajian mereka menunjukkan bahawa tiada perbezaan dalam peratusan aktiviti spesifik alkalin fosfatase antara kawalan positif (medium dengan kehadiran AA dan β GF) dan kehadiran β GF sahaja (Coelho & Fernandes 1999). Oleh itu, kajian ini menunjukkan kehadiran β GF sahaja juga sudah mampu untuk mengaruh peningkatan ALP yang seterusnya berupaya mengaruh pembezaan sel mononukleus kepada sel osteoblas seperti sel yang diasingkan daripada sumsum tulang.

PEMBENTUKAN MENDAPAN MINERAL KALKSIUM FOSFAT

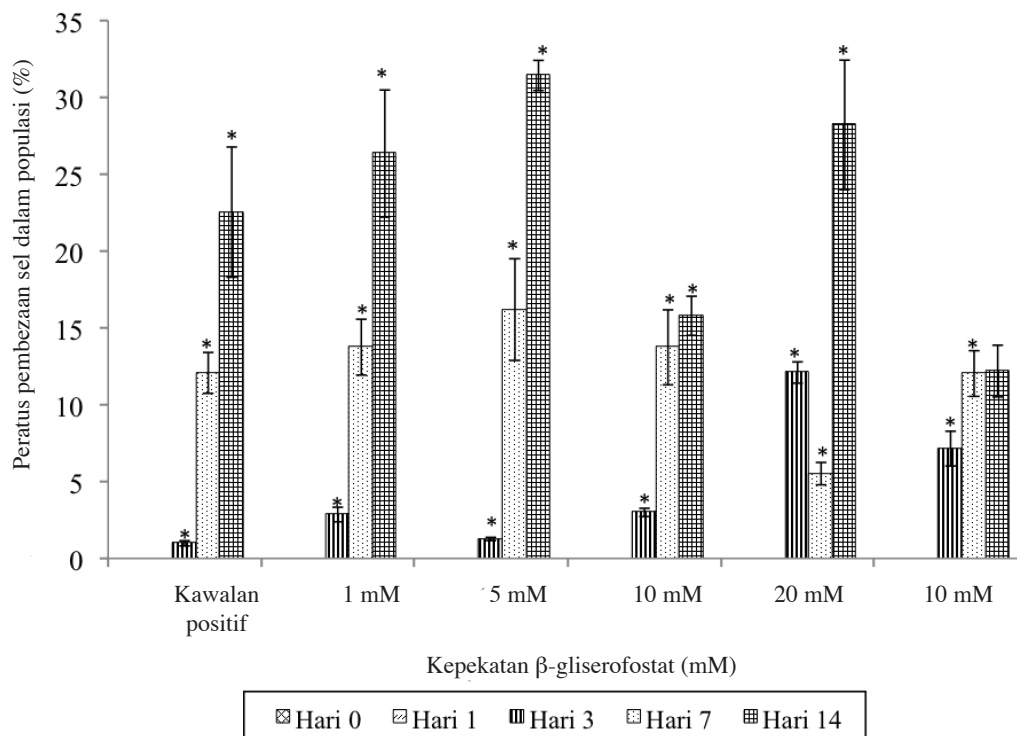
Pewarnaan von Kossa merupakan satu teknik pewarnaan untuk menunjukkan kehadiran matriks berkalsium pada sel. Terdapat banyak kajian sebelum ini yang menggunakan pewarnaan von Kossa bagi mengenalpasti kehadiran matriks berkalsium terutama dalam kajian yang melibatkan sel osteoblas. (Coelho & Fernandes 1999; Fratzl-Zelman et al. 1998; Intan Zarina et al. 2008, 2010).

Medium bagi kawalan negatif pada kesemua hari, kawalan positif dan β GF pada hari 0 dan 1 tidak menceraup sebarang sel yang mempunyai pemendapan matriks berkalsium setelah diwarnakan dengan pewarnaan von

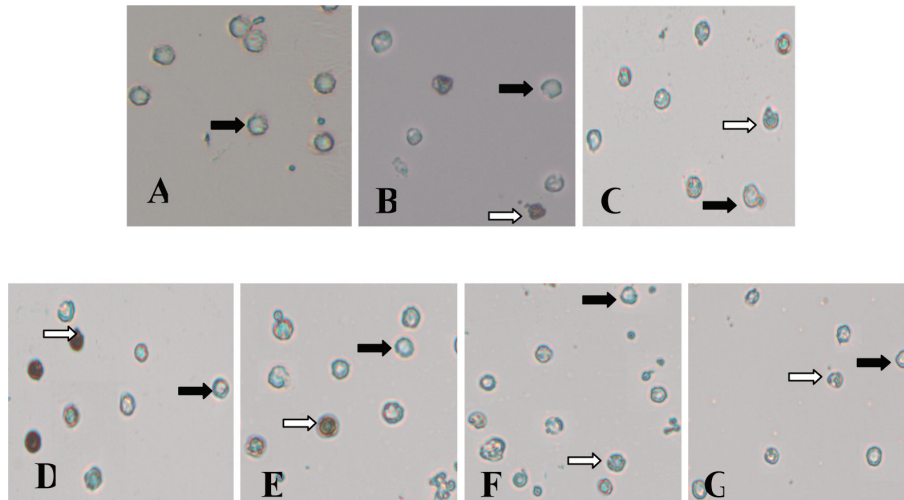
Kossa. Ini bermakna tiada aktiviti osteoblastik dapat dicerap pada hari 0 dan 1 di bawah aruhan β GF dan juga kombinasi β GF bersama AA. Oleh yang demikian, peratus pembezaan sel adalah 0% bagi setiap medium kultur. Terdapat peningkatan peratus pembezaan sel yang signifikan ($p < 0.05$) antara kawalan positif dan aruhan β GF sahaja pada kesemua kepekatan (1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, dan 100 mM) berbanding dengan kawalan negatif dari hari ke-3 hingga ke-14 (Rajah 3). Peningkatan peratus pembezaan sel ini menunjukkan populasi ampai sel mononukleus yang diasingkan daripada darah periferi manusia berjaya membeza kepada sel osteoblas dan bilangan sel mononukleus yang membeza kepada sel osteoblas semakin meningkat dari hari ke-3 hingga ke-14.

Analisis morfologi menggunakan pewarnaan von Kossa mendapati tiada sel osteoblas dapat dicerap pada kultur kawalan negatif yang tidak diaruh dengan sebarang faktor pembezaan. Berlainan pula dengan kultur sel lain yang diaruh dengan faktor pembezaan. Kesemuanya memperlihatkan terdapatnya sel osteoblas berdasarkan kepada pewarnaan von Kossa yang menunjukkan kehadiran matriks berkalsium bermula dari hari ke-7 dan ke-14 (Rajah 4; Rajah 5).

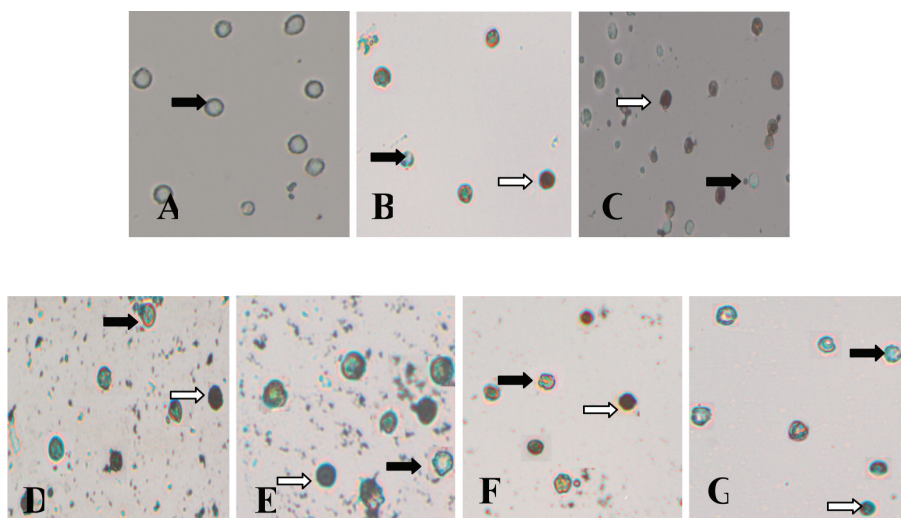
Kepekatan β GF yang berbeza-beza (1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, dan 100 mM) menunjukkan peratus pembezaan yang berbeza-beza (Rajah 3). Ini kerana terdapatnya corak pemineralan heterogenous antara kultur



RAJAH 3. Kesan β -gliserofostat terhadap morfologi sel yang berupaya mengenapkan matrik berkalsium melalui pewarnaan von Kossa. Analisis statistik menggunakan ujian-t berpasangan (paired t-test) terhadap hasil peratus pembezaan sel (%) medium pembezaan dibandingkan dengan medium kawalan negatif. (*) menunjukkan perbezaan yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan aktiviti spesifik medium kawalan negatif. Data yang diperolehi merupakan purata \pm sisihan piawai (bar pada graf) daripada 3 ujikaji yang berlainan



RAJAH 4. Morfologi sel pada hari ke-7. Hasil merupakan cerapan sel mononukleus selepas pewarnaan von Kossa dalam kawalan negatif (A), kawalan positif (B), β GP pada kepekatan; 1 mM (C), 5 mM (D), 10 mM (E), 20 mM (F), dan 100 mM (G) yang dicerap pada hari ke-7. Cerapan diperhatikan di bawah mikroskop cahaya pada pembesaran sebenar $\times 400$ ($n=3$). \blackrightarrow ; menunjukkan sel mononukleus yang tidak membeza kepada sel osteoblas.
 \Rightarrow ; menunjukkan sel mononukleus yang membeza kepada sel osteoblas



RAJAH 5. Morfologi sel pada hari ke-14. Hasil merupakan cerapan sel mononukleus selepas pewarnaan von Kossa dalam kawalan negatif (A), kawalan positif (B), β GP pada kepekatan; 1 mM (C), 5 mM (D), 10 mM (E), 20 mM (F), dan 100 mM (G) yang dicerap pada hari ke-14. Cerapan diperhatikan di bawah mikroskop cahaya pada pembesaran sebenar $\times 400$ ($n=3$). \blackrightarrow ; menunjukkan sel mononukleus yang tidak membeza kepada sel osteoblas.
 \Rightarrow ; menunjukkan sel mononukleus yang membeza kepada sel osteoblas

sel yang ditambah dengan kepekatan β GF yang berlainan. Pemineralan heterogenous ini mempengaruhi tempoh pembezaan dan pematangan kultur (Fratzl-Zelman et al. 1997).

β GF pada kepekatan 10 mM, 20 mM dan 100 mM menunjukkan profil peningkatan yang tidak konsisten berbanding kawalan positif. Walaupun begitu, peningkatannya pada hari 3 hingga 14 adalah signifikan ($p < 0.05$) berbanding kawalan negatif pada hari yang sama (Rajah 3). Kepekatan β GF yang tinggi dilaporkan mengaruh kepada pegenapan kurang baik yang membawa maksud terdapat pempendapan mineral tidak berkolagen.

Ektopik (*ectopic*) iaitu pemineralan diluar kawasan yang sepatutnya juga dilaporkan berlaku pada kepekatan β GF yang tinggi. Sebab utama perkara ini berlaku ialah β GF pada kepekatan yang tinggi dihidrolisis dalam masa 24 jam menyebabkan peningkatan kepekatan fosfat dalam medium lebih daripada paras yang sepatutnya (Fratzl-Zelman et al. 1998). Ini menyebabkan kadar pembezaan sel mononukleus kepada sel osteoblas tidak berlaku sepenuhnya.

β GF pada kepekatan rendah iaitu 1 mM dan 5 mM masing-masing menunjukkan profil peningkatan peratus pembezaan sel yang konsisten seiring dengan kawalan

positif (Rajah 3). Melalui ujian-t berpasangan, didapati kedua-dua kepekatan ini menunjukkan peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding kawalan negatif pada hari yang sama.

Melalui analisis biokimia (Rajah 2) dan morfologi (Rajah 3), dapat dikenalpasti bahawa kepekatan yang paling sesuai bagi β GF untuk mengaruh pembezaan sel mononukleus kepada sel osteoblas ialah pada kepekatan 1 mM berdasarkan peningkatan yang signifikan dan konsisten. Melalui analisis enzimologi, β GF pada kepekatan 1 mM menunjukkan peningkatan ALP yang kedua tertinggi selepas 100 mM (Rajah 2) manakala ketiga tertinggi selepas 5 mM dan 20 mM (Rajah 3) bagi peratusan bilangan sel osteoblas melalui analisis morfologi berbanding kepekatan β GF yang lain.

Secara keseluruhannya, kultur yang hanya mengandungi β GF sahaja juga berkeupayaan untuk membentuk pemendapan mineral. Ini adalah kerana β GF mengaruh osteogenesis dan pemendapan kalsium fosfat. Mekanisma ini adalah berkait rapat dengan peningkatan aktiviti spesifik ALP dalam kultur sel. β GF dihidrolisis oleh ALP untuk menghasilkan paras ion fosfat yang tinggi, seterusnya membawa kepada keadaan yang sesuai untuk pemendapan mineral. Walau bagaimanapun, sebilangan kajian menunjukkan bahawa penambahan β GF bukan sahaja mengaruh osteogenesis tetapi juga mempengaruhi parameter pertumbuhan sel (Kim et al. 2004). Ini berdasarkan kepada bilangan sel viable pada medium pembezaan yang menunjukkan sel berhenti berproliferasi pada hari ke-3 selepas faktor pembezaan ditambah.

KESIMPULAN

Analisis enzimologi dan morfologi menunjukkan kesan aruhan β GF sahaja telah berjaya mengaruhkan sel mononukleus yang diasingkan daripada darah periferi untuk membeza kepada sel osteoblas secara *in-vitro* sama seperti kajian yang dijalankan pada sel yang diasing daripada sumsum tulang (Coelho & Fernandes 1999). β GF juga telah didapati merencatkan proliferasi sel primari mononukleus dengan menunjukkan penurunan bilangan sel viabel sepanjang pengkulturan. β GF pada kesemua kepekatan menunjukkan profil yang hampir sama dalam mengaruh pembezaan sel mononukleus kepada sel osteoblas melalui analisis enzimologi dan morfologi dengan kepekatan 1 mM merupakan kepekatan yang paling sesuai.

PENGHARGAAN

Segulung penghargaan dirakamkan atas dana penyelidikan UKM-OUP-KPB-33-170/2010, 09-05-MGI-GMB002 dan UKM-DD-03-FRGS0030-2010 serta pelajar sarjana iaitu Ruzanna Ab Kadir dan Siti Afeefah Mohamad Yusof yang terlibat secara tidak langsung dalam kajian ini.

RUJUKAN

- Bellantuono, I. 2004. Haematopoietic stem cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36(4): 607-620.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Cerovic, A., Miletic, I., Sobajic, S., Blagojevic, D. Radusinovic, M. & El-Soheemy, A. 2007. Effect of zinc on the mineralization of bone nodules from human osteoblast-like cells. *Biological Trace Element Research* 116(1): 61-71.
- Clyton, S.M.D. 2003. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis: cancer control. *Journal of the Moffit Cancer Centre* 10(1): 9-16.
- Coelho, M.J. & Fernandes, M.H. 1999. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 21(11): 1095-1102.
- Fratzl-Zelman, N., Fratzl, P., Hörandner, H., Grabner, B., Ellinger, A. & Klaushofer, K. 1998. Matrix mineralization in MC3T3-E1 cell cultures initiate by β -glycerophosphate pulse. *Bone* 23(6): 511-520.
- Fratzl-Zelman, N., Fratzl, P., Hörandner, H., Leugmayr, E., Varga, F., Ellinger, A., Erlee, M.P.M. & Klaushofer, K. 1997. Effects of thiodothyronine on the morphology of cells and matrix, the location of alkaline phosphatase and the the location of alkaline phosphatase and the frequency of apoptosis in long-term cultures of MC3T3-E1 cells. *Bone* 20(3): 225-236.
- Intan Zarina, Z. A., Shahrul Hisham, Z.A., Rohaya, M.A.W., Sahidan, S. & Zaidah Z.A. 2008. Osteoclast and Osteoblast Development of Mus musculus Haemopoietic Mononucleated Cells. *Journal of Biological Sciences* 8(3): 506-516.
- Intan Zarina, Z.A., Shahrul Hisham, Z.A., Zaidah Z.A. & Rohaya, M.A.W. 2010. Keupayaan pembezaan tiga jenis sel primitif daripada hasil perbezaan tempoh proliferasi darah mencit. *Sains Malaysiana* 39(2): 305-313.
- Kassem, M., Abdullah, B.M. & Saeed, H. 2008. Osteoblastic cells: Differentiation and trans-differentiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473(2): 183-187.
- Kartsogiannis, V. & Ng, K.W. 2004. Cell lines and primary cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology* 228(1-2): 79-102.
- Kim, Y.J., Lee, M.H., Wozney, J.M., Cho, J.Y. & Ryoo, H.M. 2004. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2. *The Journal of Biological Chemistry* 279(49): 50773-50780.
- Shahrul Hisham, Z.A., Rohaya, M.A.W., Intan Zarina, Z.A., Sahidan, S., Nor Muhamad, M. & Zaidah, Z.A. 2005. Sel stem dalam perkembangan darah. *Sains Malaysiana* 34(1): 21-26.
- Vali, B., Rao, L.G. & El-Soheemy, A. 2007. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18(5): 341-347.
- zur Niedan, N.I., Kempka, G. & Ahr, H.J. 2003. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation* 71(1): 18-27.

Nurul Atikah Ahmad, Shahrul Hisham Zainal Ariffin*
& Sahidan Senafi
Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM, Bangi, Selangor D.E.
Malaysia

Rohaya Megat Abdul Wahab
Jabatan Ortodontik, Fakulti Pergigian
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
53000 Kuala Lumpur, Malaysia

Mohamad Abdul Razak
Jabatan Ortopedik
Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak
56000, Cheras
Kuala Lumpur, Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: hisham@ukm.my

Diserahkan: 15 Julai 2010
Diterima: 11 Ogos 2010