

Impaired Bone Fracture Healing in Type 2 Diabetes Is Caused by Defective Functions of Skeletal Progenitor Cells

I. Pendahuluan

1. Latar Belakang

Penyakit diabetes tipe 2 (*type 2 diabetes* (T2D)) disertai obesitas memberikan resiko gangguan terhadap penyembuhan fraktur tulang berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Figeac *et al.*, 2022). Penyakit ini dikatakan dapat mengganggu penyembuhan fraktur tulang akibat diferensiasi sel induk tulang menjadi osteoblast berkurang. Selain itu juga dikatakan bahwa penyakit ini mempercepat penuaan sel tulang serta dapat meningkatkan pertumbuhan lemak pada jaringan tulang yang rusak (Figeac *et al.*, 2022). Berdasarkan hal tersebut, dilakukan analisis diferensial ekspresi gen (DEG) menggunakan dataset GEO (GSE180504) melalui GEO2R yang memungkinkan identifikasi gen yang berbeda ekspresinya antara individu non-diabetes dan diabetes.

2. Tujuan

Tujuan dari analisis ini adalah sebagai berikut,

- 1) Menemukan gen yang signifikan berbeda ekspresinya antara kedua grup yang telah ditentukan
- 2) Memahami arah perubahan ekspresi gen (*upregulated* atau *downregulated*) yang mungkin berperan terhadap penyembuhan fraktur tulang pada penderita diabetes tipe 2 dan yang bukan penderita.

II. Metode

1. Dataset

Dataset yang digunakan dalam analisis ini diambil dari GEO (Gene Expression Omnibus) dengan *GEO assession* GSE180504. GSE180504 sendiri merupakan data yang diperoleh dari metode penelitian ekspresi gen dengan *sequencing* berkapasitas tinggi. Dalam data ini dibahas gangguan penyembuhan fraktur tulang antara penderita diabetes tipe 2 (sebanyak 2 subjek), subjek dengan berat badan obesitas (sebanyak 2 subjek), dan subjek dengan berat badan ideal (sebanyak 2 subjek). Data ini kemudian dianalisis menggunakan GEO2R. Bentuk dataset ini dapat dilihat pada gambar di bawah ini.

GEO accession Set Impaired bone fracture healing in type 2 diabetes is caused by defective functions of skeletal progenitor cells RNA-seq Series analysis BETA

▼ Samples Define groups Selected 0 out of 6 samples

Group	Accession	Title	Source name	Cell type	Treatment
-	GSM5464029	RNA primary BM-MSC serum lean rep 1	BM-MSC	plastic adherent bone marrow stromal progenitor	10 days osteogenic differentiation + serum from lean subjects
-	GSM5464030	RNA primary BM-MSC serum lean rep 2	BM-MSC	plastic adherent bone marrow stromal progenitor	10 days osteogenic differentiation + serum from lean subjects
-	GSM5464031	RNA primary BM-MSC serum obese rep 1	BM-MSC	plastic adherent bone marrow stromal progenitor	10 days osteogenic differentiation + serum from obese subjects
-	GSM5464032	RNA primary BM-MSC serum obese rep 2	BM-MSC	plastic adherent bone marrow stromal progenitor	10 days osteogenic differentiation + serum from obese subjects
-	GSM5464033	RNA primary BM-MSC serum type 2 diabetes rep 1	BM-MSC	plastic adherent bone marrow stromal progenitor	10 days osteogenic differentiation + serum from type 2 diabetes subject
-	GSM5464034	RNA primary BM-MSC serum type 2 diabetes rep 2	BM-MSC	plastic adherent bone marrow stromal progenitor	10 days osteogenic differentiation + serum from type 2 diabetes subject

2. Pembagian Grup

Pembagian grup yang digunakan pada analisis ini terdapat dua jenis, yakni Grup 1 sebagai kelompok *Non-Diabetic* yang terdiri atas subjek dengan berat badan ideal (2 subjek) dan subjek dengan berat badan obesitas (2 subjek) yang masuk ke dalam baris warna ungu pada gambar di bawah. Sedangkan Grup 2 sebagai kelompok *Diabetic* yang ditandai dengan baris berwarna hijau yang dapat dilihat pada gambar di bawah ini menggunakan GEO2R.

GEO accession Set Impaired bone fracture healing in type 2 diabetes is caused by defective functions of skeletal progenitor cells RNA-seq Series analysis BETA

▼ Samples Define groups Selected 6 out of 6 samples

Group	Accession	Title	Source name	Cell type	Treatment
Non-Diabetic	GSM5464029	RNA primary BM-MSC serum lean rep 1	BM-MSC	plastic adherent bone marrow stromal progenitor	10 days osteogenic differentiation + serum from lean subjects
Non-Diabetic	GSM5464030	RNA primary BM-MSC serum lean rep 2	BM-MSC	plastic adherent bone marrow stromal progenitor	10 days osteogenic differentiation + serum from lean subjects
Non-Diabetic	GSM5464031	RNA primary BM-MSC serum obese rep 1	BM-MSC	plastic adherent bone marrow stromal progenitor	10 days osteogenic differentiation + serum from obese subjects
Non-Diabetic	GSM5464032	RNA primary BM-MSC serum obese rep 2	BM-MSC	plastic adherent bone marrow stromal progenitor	10 days osteogenic differentiation + serum from obese subjects
Diabetic	GSM5464033	RNA primary BM-MSC serum type 2 diabetes rep 1	BM-MSC	plastic adherent bone marrow stromal progenitor	10 days osteogenic differentiation + serum from type 2 diabetes subject
Diabetic	GSM5464034	RNA primary BM-MSC serum type 2 diabetes rep 2	BM-MSC	plastic adherent bone marrow stromal progenitor	10 days osteogenic differentiation + serum from type 2 diabetes subject

3. Parameter Utama GEO2R

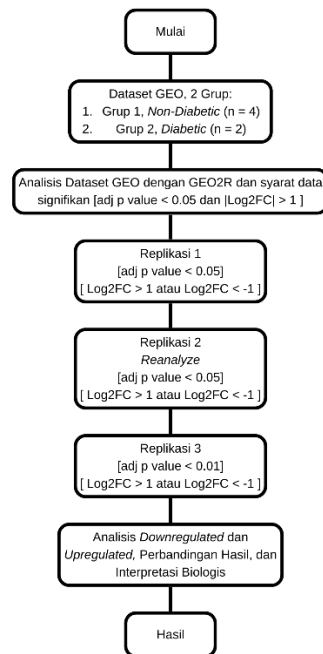
Parameter utama dan gambaran sederhana analisis yang digunakan dalam analisis ini dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Replikasi	Adjusted P Value	Log2FC
1	<0.05	FC >1
2	<0.05 (<i>Reanalyze</i>)	FC >1 (<i>Reanalyze</i>)
3	<0.01	FC > 0.5

Untuk analisis terhadap *adjusted P value* dan |Log2FC| menggunakan aplikasi Microsoft Excell, baik pada replikasi 1, replikasi 2, maupun replikasi 3.

4. Skema Analisis

Berikut adalah skema analisis yang dapat dilihat pada *flowchart* di bawah ini:



III. Hasil dan Interpretasi

1. Output DEG

Berdasarkan analisis yang sudah dilakukan, didapat total 17.088 data dengan analisis GEO2R yang kemudian dipilih menjadi data yang lebih signifikan dengan syarat adjusted P value < 0.05 dan $|\text{Log2FC}| > 1$ yang dapat dilihat detailnya pada file di bawah ini bagian *sheet* “GSE180504 replikasi 1”.

URL:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1y-5hBBTaxlPy0L2he1riJDY4PvVG05rW/edit?usp=sharing&ouid=107836601457298846181&rtpof=true&sd=true>

a. Replikasi 1

Pada replikasi satu ini dari 17.088 data tersisa 169 data, dengan 37 gen *upregulated* dan 132 gen *downregulated* pada replikasi 1 menggunakan syarat *adjusted P value* < 0.05 dan $\text{Log2FC} > 1$ atau $\text{Log2FC} < -1$. Hasil replikasi satu ini dapat dilihat detailnya pada file di bawah ini bagian *sheet* “GSE180504 replikasi 1 U,D”.

URL:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1y-5hBBTaxlPy0L2he1riJDY4PvVG05rW/edit?usp=sharing&ouid=107836601457298846181&rtpof=true&sd=true>

b. Replikasi 2 (Reanalyze)

Pada replikasi dua (*reanalyze*) juga diperoleh hal yang serupa, yakni dari 17.088 data tersisa 169 data dengan 37 gen *upregulated* dan 132 gen *downregulated* menggunakan syarat *adjusted P value* < 0.05 dan Log2FC > 1 atau Log2FC < -1. Hasil replikasi dua ini dapat dilihat detailnya pada file di bawah ini. Untuk data *reanalyze* pada sheet “GSE180504 *reanalyze*” dan untuk hasil analisis *upregulated* dan *downregulated* pada sheet “GSE180504 replikasi 2 U,D”.

URL:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1EshehS_v6yWKJNcfK876_SvWQwevooZi/edit?usp=sharing&ouid=107836601457298846181&rtpof=true&sd=true

c. Replikasi 3

Pada replikasi 3 dilakukan perubahan pada syarat, yang semula *adjusted P value* < 0.05 dan Log2FC > 1 atau Log2FC < -1 menjadi *adjusted P value* < 0.01 dan Log2FC > 0.5 atau Log2FC < -0.5 melalui data pada replikasi 1. Gen yang diperoleh menjadi 37 gen *upregulated*, 68 gen *downregulated*, dan 64 gen *FALSE* karena tidak memenuhi syarat *adjusted P value* < 0.01 dan Log2FC > 0.5 atau Log2FC < -0.5. Hasil replikasi tiga ini dapat dilihat detailnya pada file di bawah ini bagian sheet “GSE180504 replikasi 3 U,D”.

URL:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1y-5hBBTaxlPy0L2he1riJDY4PvVG05rW/edit?usp=sharing&ouid=107836601457298846181&rtpof=true&sd=true>

d. Tabel Ringkasan

Berikut adalah hasil analisis dalam bentuk tabel yang lebih ringkas dari replikasi 1, replikasi 2, dan replikasi 3.

Replikasi	<i>Upregulated</i>	<i>Downregulated</i>	<i>FALSE</i>
1	37	132	0
2	37	132	0
3	37	68	64

2. Interpretasi Biologis

Berdasarkan analisis Differential Gene Expression (DEG) menggunakan GEO2R dengan kriteria *adjusted P value* < 0.05 dan $|\log_2FC| > 1$, ditemukan sebanyak 169 gen signifikan pada perbandingan kelompok *Non-Diabetic* vs *Diabetic*. Dari total tersebut, sebanyak 37 gen mengalami *upregulated* dan 132 gen mengalami *downregulated* pada kelompok *diabetic* pada replikasi 1 dan 2. Sedangkan pada replikasi 3 terdapat 37 gen mengalami *upregulated* dan 68 gen mengalami *downregulated*, serta 64 mengalami *FALSE* atau tidak memenuhi syarat yang berlaku pada replikasi 3. Walaupun pada replikasi 3 terdapat perbedaan hasil,

perbandingannya tetap *upregulated* < *downregulated*, yang artinya gen *downregulated* ini mendominasi. Dominasi gen yang mengalami *downregulated* darimenunjukkan bahwa kondisi diabetes tipe 2 (*type 2 diabetes* (T2D)) menyebabkan penurunan ekspresi berbagai gen yang kemungkinan berperan dalam proses regenerasi jaringan dan penyembuhan tulang. Hal ini sesuai dengan kondisi biologis diabetes tipe 2 (*type 2 diabetes* (T2D)) yang diketahui dapat mengganggu proses penyembuhan tulang melalui perubahan lingkungan metabolik dan inflamasi kronis. Analisis ini dapat dikatakan sesuai dengan penelitian oleh (Figeac *et al.*, 2022) yang menyampaikan bahwa pasien diabetes tipe 2 dengan obesitas (T2D) dapat menghambat proses penyembuhan tulang. Pada kondisi hiperinulinemia (banyak insulin karena diet tinggi lemak), tulang baru yang terbentuk berkurang dan malah muncul banyak sel lemak di area luka, disertai tanda-tanda penuaan sel tulang lebih cepat. Pada kondisi insulinopenia (kekurangan insulin akibat kerusakan sel pankreas), gangguan penyembuhan tulang lebih parah lagi, dengan pembentukan tulang baru yang semakin menurun dan berhubungan langsung dengan kadar gula darah tinggi serta penumpukan lemak di jaringan penyembuhan. Uji pada sel manusia juga menunjukkan bahwa serum dari penderita obesitas/T2D menghambat pembentukan sel tulang dan mendorong sel lemak. Jadi, faktor utama yang merusak penyembuhan tulang bukan hanya insulin, tetapi juga hiperglikemia (gula darah tinggi) yang mempercepat penuaan sel dan menghambat diferensiasi osteoblas (Figeac *et al.*, 2022).

DAFTAR PUSTAKA

Figeac, F., Tencerova, M., Ali, D., Andersen, T. L., Appadoo, D. R. C., Kerckhofs, G., Ditzel, N., Kowal, J. M., Rauch, A., & Kassem, M. (2022). Impaired bone fracture healing in type 2 diabetes is caused by defective functions of skeletal progenitor cells. *Stem cells*, 40(2), 149-164.