

**DISERTASI**

**Pengaruh Pemberian Eritropoietin terhadap Ekspresi mRNA *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (mRNA BDNF), kadar *Stromal Cell-Derived Factor-1* (SDF-1), dan *Neuron Specific Enolase* (NSE) pada Model Cedera Otak *Sprague Dawley*.**

***Effect of Erythropoietin Administration on Expression of mRNA Brain-Derived Neurotrophic Factor (mRNA BDNF), Levels of Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1), and Neuron Specific Enolase (NSE) in Brain Injury Model Sprague Dawley.***



**MUHAMMAD FADLI SAID**  
C013182001

PROGRAM S-3 ILMU KEDOKTERAN  
PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021

**Pengaruh Pemberian Eritropoietin terhadap Ekspresi mRNA *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (mRNA BDNF), kadar *Stromal Cell-Derived Factor-1* (SDF-1), dan *Neuron Specific Enolase* (NSE) pada Model Cedera Otak *Sprague Dawley*.**

DISERTASI

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor  
Program Studi Ilmu Kedokteran

Diajukan oleh:

**Muhammad Fadli Said**  
C013182001

Kepada

PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2021

**DISERTASI**

**PENGARUH PEMBERIAN ERITROPOIETIN TERHADAP EKSPRESI mRNA  
BRAIN-DERIVED NEUTROPHIC FACTOR (mRNA BDNF), KADAR STROMAL  
CELL-DERIVED FACTOR-1 (SDF-1), DAN NEURON SPECIFIC ENOLASE  
(NSE) PADA MODEL CEDERA OTAK SPRAGUE DAWLEY.**


**EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ADMINISTRATION ON EXPRESSION OF mRNA  
BRAIN-DERIVED NEUTROPHIC FACTOR (mRNA BDNF), LEVELS OF  
STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1 (SDF-1), AND NEURON SPECIFIC  
ENOLASE (NSE) IN BRAIN INJURY MODEL SPRAGUE DAWLEY.**

Disusun dan diajukan oleh

**Muhammad Fadli Said**  
**C013182001**

*Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran  
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin  
pada tanggal, 24 September 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

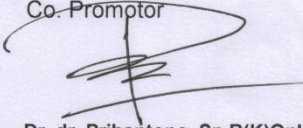
Menyetujui  
Promotor,

  
**Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS-FICS**  
Nip. 19551019198203 1 001

Co. Promotor

  
**Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK**  
Nip. 19670910199603 1 001

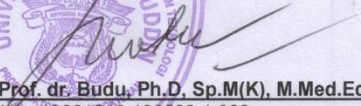
Co. Promotor

  
**Dr. dr. Prihantono, Sp.B(K)Onk**  
Nip. 197406292008121001

Ketua Program Studi S3  
Ilmu Kedokteran,

  
**dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)**  
Nip. 19700821 199903 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin,

  
**Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed**  
Nip. 19661213 199503 1 009



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
FAKULTAS KEDOKTERAN

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN**

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297

EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

**PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI**

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Muhammad Fadli Said

NIM : C013182001

Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran

Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

**Pengaruh Pemberian Eritropoietin terhadap Ekspresi mRNA *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (mRNA BDNF), kadar *Stromal Cell-Derived Factor-1* (SDF-1), dan *Neuron Specific Enolase* (NSE) pada Model Cedera Otak *Sprague Dawley*.**

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 12 Oktober 2021

Yang menyatakan,



Muhammad Fadli Said

## ABSTRAK

**MUHAMMAD FADLI SAID.** *Pengaruh Pemberian Eritropoietin terhadap Ekspresi mRNA Brain-Derived Neurotrophic Factor (mRNA BDNF), Kadar Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1), dan Neuron Specific Enolase (NSE) pada Model Cedera Otak Sprague Dawley (dibimbing oleh Andi Asadul Islam, Muh. Nasrun Massi, dan Prihantono).*

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian EPO terhadap ekspresi mRNA BDNF, kadar serum SDF-1 dan NSE pada hewan coba dengan TBI. Cedera otak traumatis (TBI) adalah gangguan multifaset yang merupakan penyebab utama kematian dan kecacatan pada anak-anak dan dewasa muda di negara-negara industri. Berbagai macam terapi telah dilakukan dalam pengelolaan cedera otak, salah satunya adalah pemberian eritropoietin (EPO). Belum banyak penelitian di Indonesia yang membuktikan bahwa pemberian EPO efektif pada parameter seperti brain-derived neurotrophic factor (BDNF mRNA), stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) dan neuron-specific enolase (NSE) pada cedera otak, pasien.

Penelitian ini dilakukan pada model cedera kepala tikus. Lima belas ekor tikus diacak dan dikelompokkan menjadi 3 kelompok, A, B, dan C. EPO diberikan s.c dengan dosis 30.000 U/kg. Sampel darah diambil setelah cedera otak (HO), 12 jam (H12), dan 24 jam (H24) setelah cedera otak. Kadar serum SDF-1 dan NSE diukur menggunakan ELISA, dan ekspresi gen mRNA BDNF diukur dengan Real-Time-PCR.

Hasil penelitian ini menemukan bahwa EPO meningkatkan ekspresi mRNA BDNF pada kelompok C pada H-12 ( $7,92 \pm 0,51$  vs  $6,45 \pm 0,33$ ) dibandingkan dengan kelompok B, dan pada H-24 ( $9,20 \pm 0,56$  vs  $7,22 \pm 0,19$ ); peningkatan kadar SDF-1 pada kelompok C pada H-12 ( $7,56 \pm 0,54$ ) vs  $4,62 \pm 0,58$ ) dibandingkan kelompok B, dan pada H-24 ( $11,32 \pm 4,55$  vs  $2,55 \pm 0,70$ ); penurunan kadar NSE serum pada kelompok C pada H-12 ( $17,25 \pm 2,02$  vs  $29,65 \pm 2,33$ ) dibandingkan dengan kelompok B dan pada H-24 ( $12,14 \pm 2,61$  vs  $37,31 \pm 2,76$ ); nilai tersebut berbeda nyata dengan  $p < 0,05$ . Erythropoietin mungkin memiliki sifat neuroprotektif dan anti-inflamasi pada cedera otak traumatis dengan meningkatkan ekspresi mRNA BDNF dan kadar SDF-1 serum, dan menurunkan kadar NSE serum.

Kata kunci: mRNA-BDNF, SDF-1, NSE, Traumatic Brain Injury.



## ABSTRACT

**MUHAMMAD FADLI SAID.** *Effect of Erythropoietin Administration on Expression of mRNA Brain-Derived Neurotrophic Factor (mRNA BDNF), Levels of Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1), and Neuron Specific Enolase (NSE) in Brain Injury Model Sprague Dawley (Supervised by Andi Asadul Islam, Muh. Nasrum Massi, and Prihantono)*

The aims of this study is to determine the effect of EPO administration on BDNF mRNA expression, serum levels of SDF-1 and NSE in experimental animals with TBI. Traumatic brain injury (TBI) is a multifaceted disorder that is the leading cause of death and disability in children and young adults in industrialized countries. Various kinds of therapy have been carried out in the management of brain injury, one of which is the administration of erythropoietin (EPO). There are not many studies in Indonesia have proven that EPO administration is effective on parameters such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF mRNA), stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and neuron-specific enolase (NSE) in brain injury patients.

This study was done in the rat's head injury model. Fifteen rats were randomized and grouped into 3 groups. A, B, and C. EPO was administered s.c with a dose of 30.000 U/kg. Blood samples were taken after brain injury (H0), 12 h (H12), and 24 h (H24) after brain injury. Serum level of SDF-1 and NSF were measured using ELISA, and mRNA BDNF gene expression was measured with Real-Time-PCR.

This study finds that EPO increases BDNF mRNA expression in group C at H-12 ( $7.92 \pm 0.51$  vs  $6.45 \pm 0.33$ ) compared to group B, and at H-24 ( $9.20 \pm 0.56$  vs  $7.22 \pm 0.19$ ); increases SDF-1 levels in group C at H-12 ( $7.56 \pm 0.54$ ) vs  $4.62 \pm 0.58$ ) compared to group B, and at H-24 ( $11.32 \pm 4.55$  vs  $2.5 \pm 0.70$ ); decreases serum NSE levels in group C at H-12 ( $17.25 \pm 2.02$  vs  $29.65 \pm 2.33$ ) compared to group B and at H-24 ( $12.14 \pm 2.61$  vs  $37.31 \pm 2.76$ ); the values are significantly different with  $p < 0.05$ . Erythropoietin may have neuroprotective and anti-inflammatory properties in traumatic brain injury by increasing mRNA BDNF expression and serum SDF-1 levels, and decreases serum NSE levels.

Keywords: mRNA-BDNF, SDF-1, NSE, Traumatic Brain Injury



## TIM PENILAI UJIAN

Promotor : Prof.Dr.dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS(K), FICS

Ko-Promotor : Prof.dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK

: Dr.dr. Prihantono, Sp.B(K)Onk

Penilai : Dr.dr. Asra Al Fauzi, Sp.BS(K), SE

Dr.dr. Ilhamjaya Patellongi, MSi.

Dr.dr. Nasrullah, Sp.BS(K)

Dr.dr. Willy Adhimarta, Sp.BS(K)

dr. Husni Cangara, Ph.D, Sp.PA

Dr.dr. Riza Anshori Nasution, Sp.BS

## PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhammad Fadli Said

Nomor Pokok : C013182001

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar,

Yang Menyatakan

**Muhammad Fadli Said**



## KATA PENGANTAR

Assalamu'alaykum warahmatullahi wabarakatuh

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga saya dapat melaksanakan Pendidikan S-3 Ilmu Kedokteran dan menyelesaikan disertasi ini dengan judul “Pengaruh Pemberian Eritropoietin terhadap Ekspresi mRNA *Brain-Derived Neutrophic Factor* (mRNA BDNF), kadar *Stromal Cell-Derived Factor-1* (SDF-1), dan *Neuron Specific Enolase* (NSE) pada Model Cedera Otak *Sprague Dawley*”.

Penelitian dan penulisan disertasi ini mendapatkan dukungan dan masukan dari berbagai pihak, dengan hati yang tulus penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan kepada yang terhormat.

Rektor Universitas Hasanuddin, **Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA**, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Pendidikan Program Studi Doktor (S-3) Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, **Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M (K), M.Med.Ed** atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Pendidikan Program Studi Doktor (S-3) Ilmu Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Ketua Program Studi Doktor (S-3) Ilmu Kedokteran **dr. Agussalim Bukhari, Ph.D, Sp.GK (K), M.Clin.Med** dan sekretaris Program Studi Doktor (S-3) Ilmu Kedokteran **Dr.dr. Khairuddin Djawad, Sp.KK (K)**, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Pendidikan Program Studi Doktor (S-3).

**Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS (K)**, Guru Besar Ilmu Bedah Saraf Universitas Hasanuddin, atas kesediaannya dengan tulus dan ikhlas menjadi Promotor serta meluangkan waktunya untuk membimbing, mendorong, dan memberi masukan dengan penuh kesabaran dan ketelitian yang sangat bermanfaat dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan disertasi ini.

**Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK**, yang telah bersedia menjadi Ko-Promotor, serta memberikan dukungan, mengarahkan, dan memperluas wawasan keilmuan saya yang sangat bermanfaat selama pendidikan dan penulisan disertasi ini.

**Dr. dr. Prihantono, Sp.B (K)Onk**, yang telah bersedia menjadi Ko-Promotor, serta memberikan dukungan, mengarahkan, dan memperluas wawasan keilmuan saya yang sangat bermanfaat selama pendidikan dan penulisan disertasi ini.

**Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK** beserta staf yang telah membantu dalam penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. **Dr.dr. Ilhamjaya Patellongi, MS**, yang telah banyak membantu dalam analisis statistik penelitian dan penyusunan disertasi ini.

Para penguji disertasi **Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS (K)**, **Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK**, **Dr. dr. Prihantono, Sp.B (K)Onk**, **Dr. dr. Asra Al Fauzi, Sp.BS(K), SE**, **Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, MS**, **Dr. dr. Nasrullah, Sp.BS(K)**, **Dr. dr. Willy Adimarta, Sp.BS(K)**, **dr. Husni Cangara, Ph.D, Sp.PA**, **Dr. dr. Riza Anshori Nasution, Sp.BS**, saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bimbingan dan diskusi selama saya mengikuti Program Studi Doktor (S-3).

Direktur Utama RSUD Sawerigading Kota Palopo, **dr. Nasaruddin Nawir, Sp.OG (K), MARS**, yang telah memberikan izin kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Studi Doktor (S-3) di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

**Akmal, S.Sos, MAP, Abdul Muin, Amd.FT dan Rahmat** di Sekretariat Program Studi Doktor (S-3) di Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, para sejawat teman **dr.Hilmiyah Syam, Sp.THT-KL, Iqra Alghifarih Y, MBBS**, serta rekan-rekan seangkatan yang selalu membantu dan memberikan motivasi kepada saya.

Terima kasih yang tidak terhingga serta doa saya untuk orang tua tercinta Ayahanda **Dr. H. Muhazzab Said, M.Si**, Ibunda **Hj. Harisah** yang telah melahirkan, membesarkan, mendidik, serta membimbing dan memberikan tauladan yang baik kepada saya. Terima kasih kepada mertua saya **Dr. H. Harifuddin Cawidu, M.Si** dan **Hj. Asmara S.Si**, isteri tercinta **dr. Adliah Purnawaty Harifuddin, Sp.B, M.Kes** dan juga kepada kelima anak-anak saya yang telah mendampingi dan memberikan motivasi kepada saya dengan penuh kesabaran.

Semua pihak yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung, yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, semoga Allah SWT membalas kebaikannya berlipat ganda.

Semoga disertasi ini dapat memberikan sumbangan berharga bagi perkembangan ilmu Kedokteran serta peningkatan pelayanan Kesehatan kepada masyarakat khususnya dalam bidang bedah saraf, dan Allah SWT senantiasa memberikan rahmat dan hidayahNya kepada kita semua. Aaminn Yaa Robbal 'Alamiin.

Makassar, September 2021

Peneliti

**Muhammad Fadli Said**

**Lembar Pengesahan Disertasi**

**Pengaruh Pemberian Eritropoietin terhadap Ekspresi mRNA *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (mRNA BDNF), kadar *Stromal Cell-Derived Factor-1* (SDF-1), dan *Neuron Specific Enolase* (NSE) pada Model Cedera Otak *Sprague Dawley*.**

Diajukan oleh:

**Muhammad Fadli Said**  
C013182001

Telah diperiksa dan dinyatakan memenuhi syarat untuk melakukan  
Ujian Promosi Doktor  
Pada tanggal 23 September 2021

Menyetujui  
Tim Promotor

**Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS**  
Promotor

**Prof. dr. Muhammad Nasrum Massi, Ph.D, Sp.MK**  
Co-Promotor

**Dr. dr. Prihantono, Sp.B(K)Onk**  
Co-Promotor

Ketua Program Studi S3  
Ilmu Kedokteran

**dr. Agussalim Bukhari, M.Clin, Ph.D, Sp.GK(K)**

## DAFTAR ISI

Lembar Sampul .....	i
Lembar Pengesahan .....	ii
Tim Penilai Ujian .....	iii
Pernyataan Keaslian Disertasi .....	iv
Kata Pengantar .....	v
Lembar Pengesahan .....	viii
Daftar Isi .....	ix
Daftar Singkatan .....	xii
Daftar Gambar dan Tabel .....	xiv

### **BAB I Pendahuluan**

1. Latar Belakang .....	1
2. Rumusan Masalah .....	5
3. Tujuan Penelitian .....	5
4. Manfaat Penelitian .....	6

### **BAB II Tinjauan Pustaka**

1. Cedera Otak Traumatik .....	7
1.1 Defenisi .....	7
1.2 Epidemiologi .....	8
1.3 Etiologi .....	8
1.4 Klasifikasi .....	9
1.5 Patofisiologi .....	10
2. Eritropoietin .....	13
2.1 Struktur Kimia .....	13
2.2 Reseptor .....	14
2.3 Regulasi Ekspresi Gen Eritropoietin .....	16
2.4 Jalur Pensinyalan Intraseluler yang Diinduksi Eritropoietin .....	17

2.5 Fungsi Eritropoietin .....	19
2.6 Peran Eritropoietin pada Cedera Otak .....	20
2.7 Perbaikan Fungsi Neurologis dalam Perawatan dengan Eritropoietin .....	23
2.8 Penatalaksanaan dan Dosis Terapi Eritropoietin .....	24
3. <i>Brain Derived Neurotropic Factor</i> (BDNF) .....	27
3.1 Eritropoietin dan BDNF .....	31
4. <i>Stromal Derived Factor-1</i> (SDF-1) .....	36
4.1 Eritropoietin dan SDF-1 .....	37
5. <i>Neuron Spesific Enolase</i> (NSE) .....	41
5.1 Eritropoietin dan NSE .....	46
6. Pemeriksaan Histopatologi dengan Hematoxylin and Eosin (H&E) .....	47
<b>BAB III. Kerangka Teori dan Konsep</b>	
1. Kerangka Teori .....	52
2. Kerangka Konsep .....	53
3. Hipotesis Penelitian .....	54
4. Defenisi Operasional Penelitian .....	54
<b>BAB IV Metodologi Penelitian</b>	
1. Rancangan Penelitian .....	56
2. Lokasi dan Waktu Penelitian .....	57
3. Kriteria Inklusi .....	57
4. Kriteria Eksklusi .....	57
5. Kriteria Drop Out .....	57
6. Besar Sampel .....	57
7. Cara Kerja .....	58
8. Analisis Data .....	69
9. Alur Penelitian .....	70

## **BAB V Hasil Penelitian**

1. Deskripsi Umum .....	71
2. Pengaruh EPO terhadap Ekspresi mRNA BDNF pada Kelompok Tikus .....	74
3. Pengaruh pemberian EPO terhadap SDF-1 serum pada kelompok Tikus .....	76
4. Pengaruh pemberian EPO terhadap NSE serum pada kelompok Tikus .....	78
5. Pengaruh pemberian EPO terhadap Jumlah Sel neutrofil Jaringan pada kelompok Tikus .	80
6. Pengaruh pemberian EPO terhadap Jumlah Sel Limfosit Jaringan pada kelompok Tikus ..	80
7. Gambaran histopatologis jaringan otak kelompok tikus .....	82
8. Pengaruh EPO terhadap Interaksi mRNA BDNF, SDF-1, NSE pada Kelompok Tikus .....	83
9. Pengaruh Pemberian EPO terhadap Interaksi mRNA BDNF, SDF-1, NSE dengan jumlah Neutrofil (PMN) dan Limfosit pada Kelompok Tikus .....	85

## **BAB VI Pembahasan**

1. mRNA BDNF .....	87
2. SDF-1 .....	89
3. NSE .....	92
4. Histopatologi Jaringan Otak .....	93

## **BAB VII Kesimpulan dan Saran**

1. Kesimpulan .....	97
2. Saran .....	97

<b>Daftar Pustaka</b> .....	99
-----------------------------	----

<b>Lampiran</b> .....	113
-----------------------	-----

## DAFTAR SINGKATAN

BBB	: Blood Brain Barrier
BDNF	: Brain Derived Neutrophil Factor
BFU-E	: Burst Forming Unit-Erythroid
BMSC	: Bone Marrow Stromal Cell
CBF	: Cerebral Blood Flow
CCI	: Control Cortical Impact
CFU-E	: Colony Forming Unit-Erythroid
CREB	: cAMP Response Element-Binding
Ct	: Cycle treshold
CXCR	: Chemokine (C-X-C motif) Receptor
DAG	: Diasilgliserol
DAI	: Diffuse Axonal Injury
DVI	: Diffuse Vascular Injury
ECM	: Extraseluler Matriks Protein
ELISA	: Enzyme Linked Immunossorbent Assay
EPO	: Eritropoietin
EPC	: Endhotelial Progenitor Cell
PLC	: Fosfolipase C
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
eNOS	: Endhotelial Nitric Oxide Synthase
HAL	: Haloperidol
HIF-1 $\alpha$	: Hypoxia Inducible Factor -1 $\alpha$
HRE	: Hypoxia-response Element
IP3	: Inositol Trifosfat
IL	: Interleukin
KIE	: Kidney Inducible Element
NRLE	: Negative Regulatory Liver Element



LIE	: Liver-inducible Element
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MMP	: Matrix Metalloproteinase
mRNA	: Messenger Ribose Nucleic Acid
NICU	: Neuro Intensive Care Unit
NMDA	: N-methyl-d-Aspartate
NO	: Nitric Oxide
NRE	: Negative Regulatory Element
NSE	: Neuron Specific Enolase
NSC	: Neural Stem Cell
NT	: Neurotrophin
PI3K	: Phosphatidylinositol-3 kinase
PIP2	: Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PLC- $\gamma$	: Phospholipase C- $\gamma$
PMN	: Polimorphonuclear
RNL	: Rasio Neutrofil Limfosit
ROS	: Reactive Oxygen Species
RT-PCR	: Real Time-Polymerase Chain Reaction
SDF-1	: Stromal Cell Derived Factor -1
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
SSP	: Susunan Saraf Pusat
SVZ	: Subventrikel Zone
TIK	: Tekanan Intrakranial
TrkB	: Tirosin kinase B
TNFR	: Tumor Necrosis Factor Receptor
TBI	: Traumatic Brain Injury
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	: Von Hippel-Lindau
WHO	: World Health Organization

## DAFTAR GAMBAR DAN TABEL

- Gambar 1. : Patofisiologi Cedera Otak Traumatik.
- Gambar 2. : Mekanisme cedera pada tingkat molekular.
- Gambar 3. : Struktur Eritropoietin.
- Gambar 4. : Jalur pensinyalan intraseluler yang diinduksi EPO Eritropoietin.
- Gambar 5. : Mekanisme faktor neurotropik (BDNF) yang diturunkan dari otak.
- Gambar 6. : Skematik alat cedera kepala Modifikasi Marmarou.
- Gambar 7. : Prinsip kerja Sandwich ELISA.
- Gambar 8. : Gambaran Histopatologi Kelompok A (Kontrol)
- Gambar 9. : Gambaran Histopatologi Kelompok B (Trauma +, EPO-)
- Gambar 10. : Gambaran Histopatologi Kelompok C (Trauma +, EPO +)
- Tabel 1. : Perbedaan Dinamika Ekspresi mRNA BDNF pada Kelompok Tikus.
- Tabel 2. : Perbedaan Dinamika Kadar SDF-1 Serum pada Kelompok Tikus.
- Tabel 3. : Perbedaan Dinamika Kadar NSE Serum pada Kelompok Tikus.
- Tabel 4. : Perbedaan Jumlah Neutrofil (PMN) pada Kelompok Tikus.
- Tabel 5. : Perbedaan Perubahan Limfosit pada Kelompok Tikus.
- Tabel 6. : Korelasi mRNA BDNF, NSE, SDF-1 dengan Neutrofil (PMN) dan Limfosit
- Grafik 1. : Diagram *Box Plot* Ekspresi mRNA BDNF antara Kelompok Tikus.
- Grafik 2. : Diagram *Box Plot* Kadar Serum SDF-1 antara Kelompok Tikus.
- Grafik 3. : Diagram *Box Plot* NSE Serum antara Kelompok Tikus.
- Grafik 4. : Diagram *Error Bar* Jumlah Neutrofil (PMN) antara Kelompok Tikus.
- Grafik 5. : Diagram *Error Bar* Jumlah Limfosit antara Kelompok Tikus.
- Grafik 6. : Korelasi antara Ekspresi mRNA BDNF dengan Kadar SDF-1 serum.
- Grafik 7. : Korelasi antara ekspresi mRNA BDNF dengan kadar NSE serum.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1. Latar Belakang

Cedera otak traumatik (TBI) adalah gangguan multifaset yang menjadi penyebab utama kematian dan kecacatan pada anak-anak dan dewasa muda di negara-negara industri. Pada tahun 2019, Dewan et al melakukan *systematic review* dan hasil yang ditemukan adalah 69 juta (95% CI 64–74 juta) manusia di seluruh dunia akan mengalami cedera otak tiap tahunnya. Persentase kejadian cedera otak yang berasal dari kecelakaan lalu-lintas paling tinggi berasal dari Afrika dan Asia Tenggara (keduanya 56%), dan hasil paling rendah terdapat di Amerika Utara (25%). Angka kejadian TBI secara keseluruhan per 100.000 orang paling tinggi berasal dari Amerika Utara (1.299 kasus, 95% CI 650–1.947) dan Eropa (1.012 kasus, 95% CI 911-1.113) dan paling rendah terdapat di Afrika (801 kasus, 95% CI 732-871) dan Mediterania Timur (897 kasus, 95% CI 771-1.023).

Hasil studi menunjukkan bahwa individu yang bertahan dari fase akut setelah TBI yang sedang/berat masih berisiko tinggi untuk mengalami kematian selama fase pemulihan dan rata-rata memiliki rentang hidup yang lebih pendek (Tabish et al. 2006). Efek langsung dari cedera mekanis pada otak akan menghasilkan cedera difus dan fokal. Gejala yang muncul akibat cedera otak dapat menyebabkan koma, nyeri kepala, mual, afasia, kejang, amnesia, gangguan tidur, dan gangguan psikiatrik. Gejala ini muncul dalam hitungan detik sampai menit (Smith M et al. 2008). Selain itu, keadaan ini dapat menyebabkan konsekuensi jangka panjang yang dapat mengganggu kualitas hidup.

Beberapa penelitian menemukan kemungkinan cedera otak yang dapat berkembang menjadi ensefalopati traumatik kronis dan penyakit Alzheimer (Bramlett and Dietrich, 2015).

Kesulitan dalam diagnosis dan memperkirakan luaran setelah cedera otak berhubungan dengan keterbatasan sarana pemeriksaan klinis dan *neuroimaging*. Indikator klinis tidak dapat memprediksi secara tepat trauma yang terjadi pada otak (Itoh et al. 2009; Meric et al. 2010).

Kemajuan ilmiah dalam dekade terakhir meningkatkan pemahaman kita tentang proses patofisiologi yang kompleks dan heterogen terkait dengan TBI. Patofisiologi TBI bukan hanya kejadian akut, tetapi juga merupakan proses neurodegeneratif progresif yang terdiri dari kaskade reaksi biologis yang paralel dan saling tergantung pada tingkat jaringan, seluler, dan subselular (Dash et al. 2010).

Berbagai macam terapi telah dilakukan pada penatalaksanaan cedera otak, salah satunya dengan pemberian eritropoietin (EPO). Riset-riset yang sudah ada membuktikan bahwa EPO dapat memberikan efek neuroproteksi setelah terjadinya iskemia, hipoksia metabolik, neurotoksik, dan eksitotoksis pada sistem saraf pusat (SSP) (Galvano M et al. 2017). EPO bekerja pada beberapa bagian di SSP, termasuk membatasi produksi dari oksigen reaktif spesifik dan glutamat, modulasi neurotransmisi, mengurangi vasospasme, terjadinya angiogenesis, menghambat apoptosis, dan menurunkan sel-sel inflamasi. Peningkatan fungsi neurogenesis dan angiogenesis setelah pemberian EPO merupakan hal yang paling esensial untuk proses penyembuhan pasien cedera otak traumatik.

Berdasarkan hal ini, maka EPO sering digunakan pada penelitian manusia dan hewan (Meric et al. 2010; Salehi Z et al. 2009).

Fungsi neuroproteksi dari pemberian EPO pada hewan yang mengalami iskemia/cedera otak dapat meningkatkan keyakinan kita untuk memberikan terapi ini pada manusia yang mengalami cedera otak. Pada studi terhadap tikus, terapi dengan EPO dapat memperbaiki gangguan fungsional pada cedera otak dengan meningkatkan mobilisasi sel-sel progenitor endothelium (*endothelial progenitor cells*) dan angiogenesis (Salehi Z et al. 2009)

Banyak riset yang telah meneliti langkah-langkah EPO yang kompleks sehingga menyebabkan terjadinya *tissue-protective effects* pada lokasi cedera, terutama penelitian pada hewan. Tidak hanya pada kejadian cedera otak, namun juga pada kejadian stroke dan kejang. Penelitian lain juga mendukung untuk pemberian EPO pada orang dewasa dengan cedera otak. Sebaliknya, Liu et al (2020) menyatakan bahwa pemberian EPO tidak memperbaiki angka kematian di RS akibat TBI dan juga tidak meningkatkan efek samping termasuk gangguan trombotik (DVT), kelainan kardiovaskular, serta komplikasi lainnya.

Biomarker yang terdapat pada sistem saraf pusat (SSP) dan sistemik dapat menginformasikan atau memprediksi kematian akut setelah kejadian TBI yang sedang atau berat (Tabish et al, 2006). Selain itu, biomarker juga dapat menjelaskan patologi spesifik TBI yang relevan dengan jalur molekuler yang diwakilinya, mengidentifikasi target baru untuk terapi neuroprotektif atau menunjukkan fenomena spesifik cedera otak yang penting (Gururaj et al. 1995).

*Brain derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA, Stromal cell derived factor-1 (SDF-1), dan Neuron spesifik enolase (NSE)* merupakan beberapa biomarker yang dapat digunakan pada cedera otak. Belum banyak penelitian di Indonesia yang telah membuktikan efektivitas EPO pada biomarker tersebut, khususnya pada pasien cedera otak.

BDNF merupakan suatu protein *growth factor* atau neurotrofin yang berfungsi sebagai neuroproteksi, yaitu sebagai anti apoptosis, anti inflamasi, menyebabkan terjadinya angiogenesis, anti epilepsi, dan juga memperbaiki fungsi kognitif dan memori (Chen SD, et al. 2017). SDF-1 adalah protein yang berperan dalam proliferasi dan migrasi sel, perbaikan jaringan/neuromodulasi, angiogenesis, hematopoiesis, dan juga memfasilitasi pertumbuhan kembali serebrum pasca terjadinya stroke. NSE adalah enzim yang menjadi biomarker saat terjadinya kerusakan fungsional pada neuron, seperti pada cedera tulang belakang, cedera otak traumatik, stroke, henti jantung (*cardiac arrest*), neuroblastoma, *small-cell lung cancer (SCLC)*, *anoxic encephalopathy* dan juga penyakit Alzheimer (AD) (Yanuartono et al. 2019; Juul et al. 2020).

Terdapat 3 manifestasi klinis pada pasien pasca TBI yaitu gangguan kognitif, tingkah laku, dan kondisi fisik (Notopoero, 2018). Diharapkan setelah adanya pemberian EPO, terjadi peningkatan pada BDNF dan SDF-1, serta penurunan nilai NSE, sehingga peranan 3 biomarker tersebut bisa bekerja secara optimal di otak dalam memperbaiki kognitif, tingkah laku, dan kondisi fisik pasien. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melihat apakah pemberian EPO efektif terhadap ekspresi mRNA BDNF, kadar SDF-1 dan NSE pada hewan coba tikus Sprague Dawley yang mengalami cedera otak.

## **2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian dari latar belakang tersebut maka dapat dirumuskan beberapa masalah:

1. Bagaimana peran eritropoietin terhadap perubahan ekspresi mRNA BDNF pada serum hewan coba yang mengalami cedera otak?
2. Bagaimana peran eritropoietin terhadap perubahan kadar SDF-1 pada serum hewan coba yang mengalami cedera otak?
3. Bagaimana peran eritropoietin pada perubahan kadar NSE pada serum hewan coba yang mengalami cedera otak?
4. Bagaimana peran eritropoietin terhadap gambaran histopatologi jaringan otak pada hewan coba yang mengalami cedera otak?

## **3. Tujuan Penelitian**

### **Tujuan Umum**

Untuk mengetahui peran pemberian eritropoietin terhadap ekspresi mRNA BDNF, kadar SDF-1, dan NSE serta gambaran histopatologi jaringan otak pada hewan coba yang mengalami cedera otak.

### **Tujuan Khusus**

1. Diketuainya peran pemberian eritropoietin dalam perubahan ekspresi mRNA BDNF pada hewan coba yang mengalami cedera otak.
2. Diketuainya peran pemberian eritropoietin dalam perubahan kadar SDF-1 pada hewan coba yang mengalami cedera otak.

3. Diketuainya peran pemberian eritropoietin dalam perubahan kadar NSE pada hewan coba yang mengalami cedera otak.
4. Diketuainya peran pemberian eritropoietin dalam perubahan histopatologi jaringan otak pada hewan coba yang mengalami cedera otak.
5. Diketuainya hubungan antara mRNA BDNF, SDF-1, dan NSE dengan gambaran histopatologi pasca cedera otak.

#### **4. Manfaat Penelitian**

##### Manfaat Akademik dan Ilmu Pengetahuan

1. Memberikan sumbangan bagi pengembangan ilmu pengetahuan bedah saraf trauma (neurotrauma) dari sudut ilmu dasar dan klinis.
2. Memberikan informasi tambahan tentang peran eritropoietin dalam prognosis cedera otak.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 1. Cedera otak traumatik

##### 1.1 Definisi

Cedera otak yang dalam literatur barat adalah *traumatic brain injury* (TBI) didefinisikan sebagai kelainan non-degeneratif dan non-kongenital yang terjadi pada otak, sebagai akibat adanya kekuatan mekanik dari luar, yang berisiko menyebabkan gangguan temporer atau permanen dalam hal fungsi kognitif, fisik, dan fungsi psikososial, dengan disertai penurunan atau hilangnya kesadaran. TBI merupakan cedera yang paling bisa berdampak di semua kelompok umur (Wang et al. 2018). Efek jangka panjang TBI dapat mengakibatkan dampak buruk ke semua aspek, baik itu dari kondisi fisik, fungsi kognitif, tingkah laku serta emosi. Bahkan pada cedera otak ringan, seperti geger otak (*concussion*), dapat menyebabkan terjadinya masalah kognitif jangka panjang, yang berdampak pada kemampuan orang tersebut melakukan aktivitas sehari-hari dan saat kembali bekerja (Wang et al. 2018; Dharmajaya, 2018).

Pasien yang menderita cedera otak dapat mengalami kontusi pada permukaan otak dan laserasi, perdarahan intrakranial fokal atau difus, dan cedera aksonal difus (DAI) dengan gambaran bola retraksi pada *white matter* yang dapat terlihat dengan bantuan berbagai teknik pencitraan otak pasca rawat inap (Merrick, 2018).

## 1.2 Epidemiologi

Prevalensi cedera otak nasional di Indonesia adalah 8.2 persen, dimana prevalensi tertinggi ditemukan di Sulawesi Selatan (12,8%) dan terendah di Jambi (4,5%) dari survey yang dilakukan pada 15 provinsi. Riskesdas pada tahun 2013 menyebutkan pada provinsi Jawa Tengah menunjukkan kasus cedera sebesar 7,7% yang disebabkan oleh kecelakaan sepeda motor 40,1%. Cedera mayoritas dialami oleh kelompok umur dewasa yaitu sebesar 11,3%. Di negara berkembang seperti Indonesia, perkembangan industri dan perekonomian dapat memberikan dampak terhadap kejadian cedera otak yang semakin meningkat dan merupakan salah satu kasus yang paling sering dijumpai di ruang Instalasi Gawat Darurat (IGD) rumah sakit (De Silva et al. 2009; Hofman K et al. 2005).

Studi sistematis pada tahun 2006 perihal epidemiologi TBI di Eropa menganalisa 23 riset yang dipublikasikan antara tahun 1980 sampai 2003. Hasil angka kejadian yang didapat sebagai berikut: 235 kasus per 100.000 orang per tahun, angka mortalitas rata-rata 15 per 100.000 orang per tahun dan *case fatality rate* 2,7% (Tugyan et al. 2013).

## 1.3 Etiologi

Tiga penyebab utama TBI adalah jatuh dari ketinggian (28%), kecelakaan kendaraan bermotor (20%) dan korban kekerasan (11%). Penyebab lainnya adalah kepala yang tertimpa benda jatuh dan kecelakaan dalam olahraga (Badan Penelitian dan Pengembangan, 2014).

Dari beberapa penyebab yang sudah disebutkan di atas, penyebab TBI dapat dibagi menjadi 2, yaitu akibat cedera tumpul dan akibat cedera tembus. Cedera tumpul seperti kepala tertimpa benda keras yang menyebabkan fraktur. Cedera tembus seperti peluru atau benda tajam (pisau, kapak, obeng, atau alat pemecah es) (Dharmajaya, 2018; Ghajar and Jamahid, 2000).

#### **1.4 Klasifikasi**

##### **1. Cedera Otak Primer**

Cedera yang terjadi pada masa akut, yaitu terjadi segera saat benturan terjadi. Kerusakan ini dapat mengenai jaringan kulit sampai otak, dalam bentuk laserasi kulit kepala, perdarahan, fraktur, dan kerusakan jaringan otak. Kerusakan primer dapat bersifat:

- a. Fokal (lokal). Kerusakan ini terjadi pada bagian tertentu saja, seperti perlukaan dan perdarahan ekstrakranial, fraktur tulang kepala, perdarahan intrakranial, serta kontusio dan laserasi serebri.
- b. Difus. Kerusakan yang sifatnya berupa disfungsi menyeluruh pada otak dan umumnya bersifat mikroskopis. Kerusakan ini berupa cedera aksonal difus (*Diffuse Axonal Injury*, DAI) dan cedera vaskular difus (*Diffuse Vascular Injury*, DVI) (Ng and Lee, 2019).

##### **2. Cedera Otak Sekunder**

Cedera yang terjadi setelah terjadinya trauma/benturan dan merupakan akibat dari peristiwa yang terjadi pada kerusakan primer. Kelainan-kelainan yang dapat terjadi adalah gangguan sistemik akibat hipoksia dan hipotensi, edema serebral,

herniasi jaringan otak, peningkatan tekanan intrakranial (TIK)/hipertensi TIK, infeksi, emboli lemak, hidrosefalus, dan fistula cairan serebrospinalis (CSS) (Ng and Lee, 2019).

### **1.5 Patofisiologi**

Cedera otak dapat dibagi menjadi dua kategori yaitu primer dan sekunder. Kerusakan primer mengacu pada proses yang disebabkan oleh kerusakan traumatik langsung. Kerusakan ini sebagian besar mengakibatkan kerusakan mekanis dari jaringan otak terutama kerusakan akson (Levin HS et al. 2014). Fase pertama adalah kerusakan otak awal yang terjadi segera pada saat benturan, meliputi cedera neural, cedera glial primer, dan respon vaskuler, dimana hal ini dapat meliputi laserasi kulit kepala, fraktur tulang tengkorak, kontusi, perdarahan punggut, perdarahan subarachnoid dan cedera aksonal difus (Greve et al. 2009). Tahap awal cedera otak setelah terjadinya TBI ditandai dengan cedera pada jaringan dan terganggunya aliran darah ke serebral (*Cerebral Blood Flow, CBF*). Hal ini menyebabkan terjadinya glikolisis anaerob sehingga terakumulasinya asam laktat, meningkatnya permeabilitas membrane sel, dan terjadinya edema serebral. Metabolisme anaerob tidak mampu untuk menjaga keadaan energi seluler (*cellular energy states*), sehingga penyimpanan ATP terkuras habis dan akibatnya terjadi kegagalan dalam pompa ion membran yang membutuhkan energi. Tahap ini disebut juga cedera primer karena terjadi saat itu juga (Tang, 2009; Murthy et al. 2005).

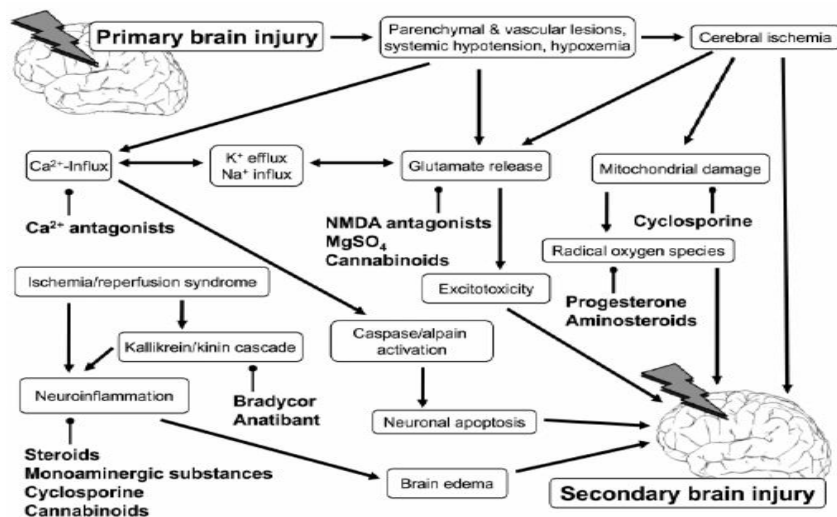
Sedangkan fase kedua dari cedera otak merupakan perkembangan kerusakan neurologi yang terjadi setelah cedera primer, dimana hal ini dapat berkembang dalam

waktu beberapa hari sampai minggu (Greve et al. 2009; Prins et al. 2013). Cedera otak sekunder, yaitu cedera otak yang terjadi setelah cedera otak primer. Mekanisme ini termasuk adanya sekresi neurotransmitter yang menyebabkan pengeluaran glutamat, suatu radikal bebas yang menyebabkan kerusakan pada membran sel (Povlishock et al. 2005). Cedera otak sekunder dapat juga terjadi karena adanya gangguan keseimbangan elektrolit, disfungsi mitokondria sel, respon inflamasi yang terjadi karena trauma, proses apoptosis, dan iskemia sekunder akibat terjadinya vasospasme, oklusi mikrovaskular fokal, atau kerusakan vaskular. Bagan dibawah ini menjelaskan proses cedera sekunder yang terutama disebabkan oleh ekspresi glutamat yang berlebihan dan bersifat neurotoksik (Guerrero Rm et al. 2015; Kochanek et al. 2013).

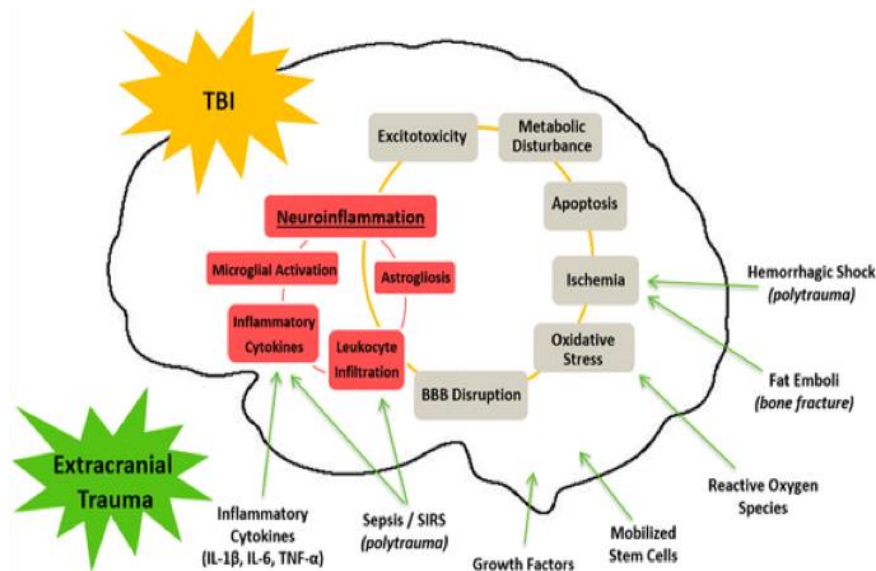
Cedera otak sekunder merupakan akhir dari depolarisasi membran yang bersamaan dengan pelepasan neurotransmitter eksitatori yang berlebihan (contoh: glutamat, aspartat), aktivasi N-methyl-D-aspartate,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionate, and voltase  $Ca^{2+}$  dan  $Na^{+}$ . Arus  $Ca^{2+}$  dan  $Na^{+}$  yang terjadi secara terus-menerus akan menyebabkan proses katabolik (*self-digesting*) intraselular.  $Ca^{2+}$  akan mengaktifkan lipid peroksida, protease, dan fosfolipase yang kemudian meningkatkan konsentrasi intraseluler asam lemak bebas dan radikal bebas (Belov Kirdajova et al.,2020). Selanjutnya, aktivasi dari enzim kaspase (*ICE-like proteins*), translokase, dan endonuklease akan merangsang perubahan struktural progresif pada membran biologis dan nukleosom DNA (fragmentasi DNA dan inhibisi perbaikan DNA). Hal ini mengakibatkan degradasi membran pada struktur vaskular dan selular,

yang tentunya akan mengakibatkan nekrosis atau apoptosis. Cedera sekunder biasanya terjadi dalam hitungan jam atau minggu. (Tang, 2009; Murthy et al. 2005).

Pada kerusakan sekunder, kaskade perubahan biokimia dan fisiologis yang terjadi dapat menyebabkan lebih banyak kerusakan pada neuron di daerah yang terkena. Kerusakan sekunder sangat penting bagi seorang ahli bedah saraf karena sebagian besar perawatan dan intervensi dilakukan pada tahap proses ini. Intervensi terapeutik pada cedera otak primer sangat terbatas, namun cedera sekunder dapat dicegah atau dikendalikan untuk mencegah cedera otak yang semakin memburuk (Rutland-Brown W et al. 2006).



**Gambar 1. Patofisiologi Cedera Otak Traumatik (Beauchamp, et al. 2008)**



**Gambar 2. Mekanisme Cedera Otak pada Tingkat Molekular (Mc Donald SJ, et al. 2016)**

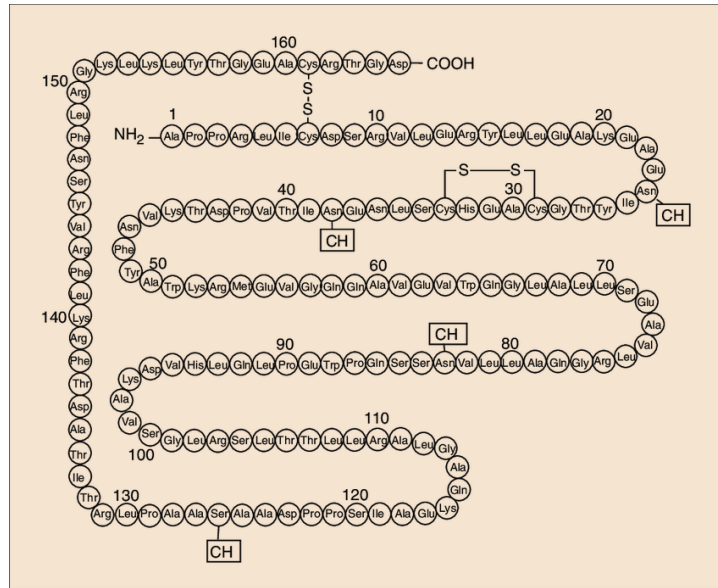
## 2. Eritropoietin (EPO)

### 2.1 Struktur Kimia Eritropoietin

Eritropoietin adalah suatu hormon glikoprotein berukuran 30,4 kDa yang merupakan regulator utama produksi sel darah merah sebagai respons eritropoetik akibat penurunan oksigenasi jaringan (Jelkmann, 1992). Susunan asam amino EPO berhasil dipurifikasi pada tahun 1977 dan gen EPO kemudian berhasil dikloning pada tahun 1985. Selanjutnya, identifikasi kompleks faktor transkripsi *hypoxia-inducible factor* (HIF-1) dan regulasinya dapat menjelaskan mekanisme dasar penginderaan oksigen seluler yang mengatur ekspresi EPO. Gen EPO terdiri dari regio promotor (Prom), lima ekson dan *hypoxia-response element* (HRE) di dalam *enhancer* (Jacobs et al. 1985; Jelkmann, 1992).

Promoter gen EPO tidak mempunyai elemen TATA atau CAAT untuk aktivasi transkripsi. Elemen-elemen regulator transkripsi utama adalah *hypoxia responsive element* (HRE) untuk pengikatan HIF-1/2  $\alpha/\beta$  dan faktor transkripsi lain (misalnya

*hepatic nuclear factor* [HNF]-4) (La Ferla et al. 200). Elemen regulator DNA lainnya adalah *kidney inducible element* (KIE), *negative regulatory element* (NRE), *liver-inducible element* (LIE), dan *negative regulatory liver element* (NRLE) (Haase VH, 2010). Pada manusia, mRNA EPO menyandi suatu protein dengan 193 asam amino (Jelkmann, 1992).



**Gambar 3. Struktur Eritropoietin (Lappin TR, 2003)**

## 2.2 Reseptor Eritropoietin

EPO mengikat reseptor permukaan sel progenitor eritroid untuk mengatur proliferasi sel eritroid sumsum tulang untuk berproliferasi, diferensiasi, dan pertahanan hidup. Jumlah reseptor EPO pada permukaan sel kurang dari 1000 reseptor/sel. Reseptor EPO terutama di ekspresikan oleh sel eritroid pada tahap antara *colony forming unit-erythroid* (CFU-E) dan tahap pronormoblas. Sejumlah kecil reseptor EPO diekspresikan oleh *burst forming unit-erythroid* (BFU-E) dan adanya respon yang lemah terhadap EPO ditunjukkan oleh sel pada tahap ini. Jumlah



reseptor terbanyak didapatkan pada CFU-E dan pronormoblas. Jumlah reseptor EPO per sel menurun bertahap selama diferensiasi sel eritroid dan beberapa penelitian melaporkan bahwa retikulosit dan eritrosit matur tidak mengandung reseptor EPO (Xiaobing et al. 2002; Ostrowski and Heinrich, 2018).

Reseptor EPO diekspresikan sebagai suatu protein dengan berat molekul antara 66–78 kD. Reseptor EPO berbentuk suatu dimer yang terbentuk sebelumnya. Pengikatan EPO pada reseptor EPO akan mengubah struktur konformasional reseptor EPO dengan suatu mekanisme *self dimerization*. JAK2 kinase berhubungan dengan reseptor EPO pada daerah transmembran. Proses dimerisasi ini diperlukan untuk tahap aktivasi JAK2 kinase selanjutnya (Xiaobing et al. 2002; Ostrowski and Heinrich, 2018).

Karena adanya proses dimerisasi ini, dua molekul JAK2 kinase yang terletak pada transmembran sebelumnya belum berhubungan menjadi berdekatan dan teraktivasi oleh proses transfosforilasi. Mekanisme selanjutnya adalah proses fosforilasi dari asam amino tirosin pada reseptor EPO. Setelah EPO mengaktivasi reseptor, 8 molekul asam amino tirosin yang terletak pada daerah sitoplasma reseptor EPO akan mengalami fosforilasi. Adanya fosforilasi asam amino tirosin ini dapat menyebabkan terbentuknya suatu tempat khusus untuk molekul SH-2 (Src homology-2) yang akan digunakan dalam proses komunikasi intraseluler selanjutnya (Huang et al. 2018).

Proses komunikasi intraseluler terjadi setelah proses aktivasi reseptor EPO. Sejumlah jalur lalu lintas komunikasi intrasel terlibat dalam tahap ini. Jalur Ras/MAP

kinase akan teraktivasi dan menghasilkan proliferasi sel. EPO juga akan mengaktifkan jalur komunikasi intrasel STAT1, STAT3, STAT5A, dan STAT5B, terutama pada jalur yang diinduksi oleh sitokin (Xiaobing et al. 2002).

### 2.3 Regulasi Ekspresi Gen Eritropoietin

Gen EPO manusia terletak pada kromosom 7 (7pter-q22). Gen EPO ini mengandung 5 ekson dan 4 intron. Model regulasi yang membutuhkan oksigen dari faktor transkripsi HIF-1 $\alpha$  akan melibatkan mekanisme hidroksilasi molekul asam amino prolin spesifik (Suzuki et al. 2017).

Ketersediaan oksigen akan menentukan laju hidroksilasi asam amino prolin dalam molekul HIF-1 $\alpha$ . Hidroksilasi prolin tersebut diperlukan dalam interaksi molekul HIF-1 $\alpha$  dengan protein VHL (*Von Hippel-Lindau*). Interaksi molekul HIF-1 $\alpha$  dengan protein VHL akan membentuk suatu kompleks E3 ubiquitin-protein ligase. Adanya ubiquinasi molekul HIF-1 $\alpha$  akan menyebabkan terjadinya degradasi kompleks protein tersebut oleh proteosome 26s (Orlando et al. 2019).

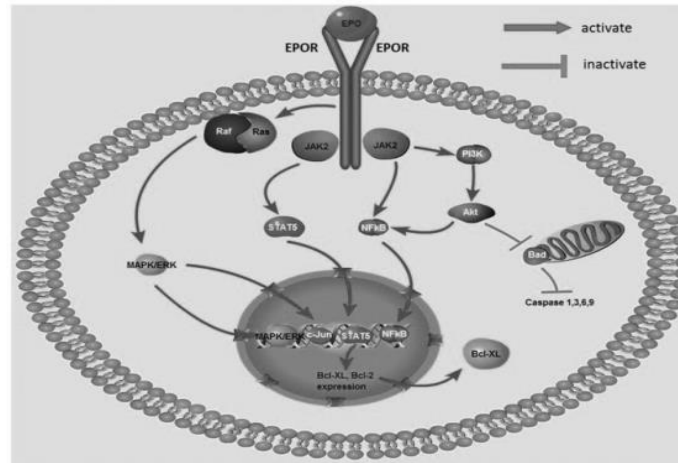
Pada kondisi hipoksia (kadar oksigen dalam sel yang rendah) HIF-1 $\alpha$  akan mengalami proses dimerisasi dengan HIF-1 $\beta$ . Heterodimer HIF-1 akan mengikat *hypoxia response elements* (HRE) yang mengandung *core recognition sequence* 5'-RCGTG-3' dan mengikat molekul koaktivator (Coact) yang akan menghasilkan peningkatan pembentukan *transcription initiation complex* dan selanjutnya meningkatkan sintesis mRNA EPO. Peningkatan sintesis mRNA EPO akan menghasilkan produksi EPO fisiologis yang merupakan respon terhadap keadaan hipoksia (Suzuki et al. 2017; Orlando et al. 2019).

## 2.4 Jalur Pensinyalan Intraseluler yang Diinduksi Eritropoietin

Eritropoietin (EPO) dapat merangsang pematangan, diferensiasi dan kelangsungan hidup sel progenitor hematopoietik. Sementara EPO dan reseptornya (EPOR) hanya diekspresikan secara lemah di otak orang dewasa normal, ekspresi EPO dan EPOR sangat meningkat di neuron, sel progenitor neuron, glia dan sel endotel serebrovaskular sebagai respons terhadap berbagai jenis cedera sel (Naranda et al. 2002). Pengobatan dengan EPO dapat mengurangi infark iskemik dan volume perdarahan, menekan jumlah kematian neuron, dan meningkatkan tingkat kelangsungan hidup pada model hewan stroke. Pengobatan EPO pasca TBI (6 jam atau 24 jam) dengan EPO (5000 U/kg) atau CEPO (50 g/kg) secara signifikan dapat meningkatkan ekspresi BDNF dan meningkatkan pembelajaran spasial pada 5 minggu setelah cedera pada tikus (Grasso G et al., 2004). Pemberian intraperitoneal EPO (5000 U/kg) dapat melintasi sawar darah otak (BBB) dan melindungi otak pada tikus yang mengalami cedera (Marti HH. 2004). Pengobatan EPO yang dimulai selambat-lambatnya 6 jam pasca TBI dapat memberikan perlindungan saraf yaitu menurunkan volume lesi dan hilangnya sel, meningkatkan neurogenesis, serta meningkatkan fungsi sensorimotor dan pembelajaran spasial. Dengan demikian, EPO dapat memberikan perlindungan saraf dan pemulihan saraf melalui promosi neurogenesis dan angiogenesis (Liu B et al. 2009).

Keberadaan jalur pensinyalan EPO/EPOR telah terdeteksi di berbagai sistem, namun peran dan fungsinya yang tepat dalam neurobiologi masih kontroversial. EPO bekerja melalui pengikatan pada reseptor permukaan selnya, yang terdiri dari dua

molekul EPOR (Marti HH, 2004). Pada sel non-neuronal, dengan cara yang serupa tetapi lebih kompleks dari pada sistem hematopoietik, EPO menginduksi fosforilasi tirosin dari EPOR dan kinase terkaitnya, janus kinase 2 (JAK2), yang pada kenyataannya, mekanisme yang sama telah terjadi di neuron. EPO endogen dan eksogen dapat mengikat dan merangsang EPOR untuk menginduksi fosforilasi JAK2. Reseptor yang berbeda terlibat dalam setiap jenis jaringan dan beberapa jalur pensinyalan pelindung saraf diaktifkan di hilir EPOR/JAK2 di sistem saraf. JAK2 yang diaktifkan akan menginduksi berbagai jalur pensinyalan melalui beberapa protein adaptor seperti fosfoinositida 3-kinase (PI3K), transduser sinyal dan penggerak transkripsi 5 (STAT5), faktor nuklir kappa B (NF- $\kappa$ B) dan p42/44 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Ogilvie M, 2000). Semua jalur pensinyalan ini dikenal untuk mempromosikan tidak hanya proliferasi sel darah merah, tetapi juga vasodilatasi, sensitisasi insulin, dan memiliki efek antitrombotik, anti-inflamasi dan anti-apoptosis. Secara khusus, STAT5 dan NF $\kappa$ B akan bertranslokasi ke dalam nukleus dan berfungsi sebagai faktor transkripsi untuk Bcl-2 dan Bcl-xL, yang merupakan gen antiapoptosis. Kedua komponen jalur transduksi sinyal (Akt/PKB) dan produk gen yang diatur oleh faktor transkripsi yang teraktivasi (Bcl-2 dan BclX) telah dibuktikan dapat mengganggu proses apoptosis pada sistem saraf (Zhang Y et al. 2014).



**Gambar 4. Jalur pensinyalan Intraseluler yang Diinduksi Eritropoietin (Chong YM, et al. 2016)**

## 2.5 Fungsi Eritropoietin

Eksresi EPO di otak dewasa meningkat pada kondisi hipoksia dan stres metabolik akut. Hal ini dibuktikan dengan terdeteksinya EPO dalam cairan serebrospinalis atau pada jaringan otak setelah cedera otak traumatik, perdarahan subaraknoid, dan stroke pada pemeriksaan post mortem (Shih et al. 2018).

Mekanisme kerja EPO sebagai neuroprotektor diduga multifaktorial baik secara langsung maupun tidak langsung pada neuron. EPO dapat melawan efek sitotoksik dari glutamat, meningkatkan ekspresi enzim-enzim antioksidan, mengurangi pembentukan radikal bebas, memperbaiki aliran darah serebral, mempengaruhi pelepasan neurotransmitter, dan meningkatkan angiogenesis (Fisher Jw, 2003).

Temuan penelitian juga menunjukkan bahwa pemberian eritropoietin manusia rekombinan (rhEPO) dapat mengurangi perkembangan atau perluasan

edema otak pasca-trauma pada model hewan cedera otak traumatik (Hellewel SC et al. 2013). Efek protektif ini sebagian besar dimediasi oleh menurunnya kematian sel yang diinduksi oleh proses apoptosis, deaktivasi sitokin inflamasi, aktivasi sel progenitor endotel, stimulasi angiogenesis, perbaikan autoregulasi vaskular, dan pengurangan lipase peroksidasi. Berbagai jalur mekanistik, termasuk jalur JAK2/STAT3, perubahan ekspresi p-JAK2 dan p-STAT3, dan regulasi naik-turun level mRNA Bcl-2, serta Bcl-xland Bax diduga sebagai penyebab efek neuroprotektif dari EPO (Liao ZB et al. 2009). Sebagai tambahan, temuan lain menunjukkan bahwa rhEPO menginduksi faktor nuklear eritroid 2 (Nrf2) yang dimediasi oleh respon sitoprotektif. Oleh karena itu, pemberian EPO pasca trauma dapat meningkatkan kinerja neurologis sekaligus mengurangi defisit motorik dan kognitif pada model TBI (Jin W et al. 2011). Studi lainnya menunjukkan bahwa efek perlindungan dari EPO dapat dimediasi melalui perlindungan vaskular karena memiliki kemampuan untuk bertindak tanpa adanya reseptor eritropoietin saraf (Xiong Y et al. 2010).

## **2.6 Peran Eritropoietin pada Cedera Otak**

Penelitian selama beberapa tahun terakhir telah menunjukkan bahwa EPO adalah promotor ampuh bagi kelangsungan hidup neuron. Pemberian EPO eksogen pada hewan pengerat dapat memberikan perlindungan saraf setelah terjadinya iskemia serebral, cedera otak traumatik, dan cedera tulang belakang (Sakanaka et al. 1998; Brines et al. 2000). In vitro, EPO melindungi neuron dari berbagai model kematian apoptosis. Beberapa mekanisme mungkin memediasi tindakan

neuroprotektif EPO, termasuk berkurangnya peradangan (Villa et al. 2003), aktivasi jalur survival kinase (Siren et al. 2001), dan gen antiapoptosis.

Terapi awal dengan EPO akan menghambat produksi ROS yang berlebihan, membalikkan efek kadar glukosa tinggi pada ekspresi Bcl2, Bax, dan caspase-3, dan mencegah apoptosis sel tubulus ginjal yang diinduksi oleh kadar glukosa tinggi. Penelitian ini menunjukkan bahwa EPO dapat menghambat efek pro-apoptosis pada kadar glukosa tinggi melalui stres anti-oksidatif (Lambeth JD et al. 2007).

Temuan bahwa EPO yang diberikan secara sistemik dapat melewati sawar darah otak (Brines et al. 2000; Ehrenreich et al. 2004) dan konfirmasi tentang efektivitas EPO pada pasien stroke (Ehrenreich et al. 2002), sangat meningkatkan nilai sitokin ini sebagai strategi terapi yang mungkin memusatkan perhatian pada mekanisme molekuler yang mendasari efek neuroprotektifnya. Peningkatan  $Ca^{2+}$  intraseluler adalah salah satu peristiwa awal yang dipicu oleh sitokin ini untuk terlibat secara kritis dalam perlindungan saraf (Morishita et al. 1997; Koshimura et al. 1999). EPO menginduksi masuknya  $Ca^{2+}$  melalui aktivasi saluran  $Ca^{2+}$  yang dioperasikan dengan tegangan (Assandri et al. 1999; Koshimura et al. 1999), mungkin sebagai konsekuensi dari depolarisasi neuron (Koshimura et al. 1999). Pengurangan  $Ca^{2+}$  ekstraseluler oleh EGTA atau penghambatan saluran tegangan  $Ca^{2+}$  akan memblokir efek perlindungan EPO terhadap glutamat (Morishita et al. 1997) dan kekurangan faktor pertumbuhan (Koshimura et al. 1999).

Peningkatan kalsium karena aktivitas neuron adalah komponen yang relevan dari jalur sinyal ini, yang konsekuensi fungsionalnya dapat mencakup kelangsungan

hidup neuron (Collins et al. 1991; West et al. 2001). Efek ini didukung oleh aktivasi saluran tegangan  $Ca^{2+}$  dan/atau reseptor NMDA, dimana sebagian disebabkan oleh peningkatan ekspresi gen untuk kelangsungan hidup neuron (Zafra et al. 1990; Bading et al. 1993; Ghosh et al. 1994; Hardingham et al. 2002). Dengan demikian, dapat dibayangkan bahwa EPO dapat meningkatkan kelangsungan hidup neuron dengan meningkatkan transkripsi gen-gen tersebut (Morishita et al. 1997).

EPO berperan sebagai faktor neurotropik pada neuron. Target kedua kerja EPO fisiologis pada jaringan otak adalah pembuluh darah otak. EPO bekerja sebagai faktor angiogenik pada jaringan otak. Target selanjutnya adalah sel glia. EPO dilaporkan berperan pada proses maturasi, proliferasi dan diferensiasi oligodendrosit dan astrosit. Selanjutnya EPO dilaporkan memiliki efek antiapoptosis yang melindungi kerusakan otak yang disebabkan karena adanya hipoksia (Nekoui et al. 2017; Mallet et al. 2017).

Pada keadaan hipoksia, EPO bekerja pada jaringan otak melalui 2 cara. Pertama sebagai faktor neurotropik atau neuroprotektif langsung, dan kedua sebagai faktor angiogenesis. Target utama EPO adalah neuron, sedangkan target utama VEGF adalah mencegah apoptosis dan merangsang pertumbuhan sel endotel yang akan menghasilkan pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) (Tamura et al. 2017).

Selain efek langsung pada sel saraf, perlindungan saraf yang diinduksi EPO melibatkan peningkatan perfusi otak. EPO melindungi integritas dasar vaskular dan merangsang angiogenesis (Marti et al. 2000) dengan bekerja secara tidak langsung



pada sel endotel melalui aktivasi sistem reseptor VEGF/VEGF dan faktor pertumbuhan endotel vaskular, yang merupakan pengatur terpenting pertumbuhan endotel dan angiogenesis (Jaquet et al. 2002).

EPO melindungi integritas vaskular dan menstimulasi angiogenesis dengan bertindak secara tidak langsung pada sel endotel melalui aktivasi faktor pertumbuhan endotel vaskular VEGF/VEGF sistem reseptor, yang merupakan regulator terpenting pertumbuhan endotel dan angiogenesis. Selain itu, EPO memiliki efek positif pada pembuluh darah otak melalui perubahan dalam produksi oksida nitrat (NO), yang terutama berasal dari arginin dalam dua langkah yang dikatalisasi oleh endotel nitrat oksida sintase (eNOS) (Liu et al. 2017).

## **2.7 Perbaikan Fungsi Neurologis dalam Pengobatan dengan Eritropoietin**

EPO terlibat dalam akomodasi perbaikan fungsi neurologis dan dapat memainkan peran sebagai antidepresan yang penting dalam kemajuan terapi depresi. Menurut beberapa percobaan, EPO meningkatkan efek antidepresan dan anti-kecemasan dalam “tes berenang paksa”, yang terkait dengan peningkatan neurogenesis hipokampus secara signifikan (Ma C. et al. 2016). Namun, tidak ada bukti peningkatan mobilitas terkait EPO yang diamati dalam uji lapangan terbuka. EPO yang diberikan secara sistemik akan melintasi BBB dalam konsentrasi yang efektif secara terapi dan memberikan efek neuroprotektif dan neurotropik pada kerusakan otak traumatik, hipoksia-iskemik, eksitotoksik, dan inflamasi, serta dalam kondisi neurodegeneratif dan neuropsikiatri (Berk et al. 2011). Efek morfologi EPO ini disebabkan oleh aksi langsung pada neuron melalui jalur EPO-EPOR dan sangat

berkorelasi dengan faktor neurotropik yang diturunkan dari otak (BDNF), yang memainkan peran penting dalam kelangsungan hidup dan proliferasi neuron. BDNF dan EPO berbagi satu set jalur pensinyalan intraseluler yang umum termasuk kaskade PI3K dan MAPK. EPO dilaporkan menginduksi ekspresi BDNF dan menginduksi potensi efek neuroplastik (Luo et al. 2015).

Studi preklinik menyatakan bahwa EPO dapat menurunkan hipoksia lokal pada jaringan otak, meningkatkan fungsi dari BBB dan menurunkan edema serebral. EPO memiliki efek anti inflamasi, anti eksitotoksik, antioksidan dan anti apoptosis pada neuron dan oligodendosit, serta menginduksi neurogenesis dan angionesis, yang menjadi hal penting untuk perbaikan pada cedera otak dan perkembangan sel neuron normal (Mao et al. 2015). EPO mengurangi kehilangan fungsi neuronal dan gangguan pembelajaran akibat cedera otak. EPO telah menunjukkan sifat anti inflamasinya, yang mungkin berkontribusi terhadap proteksi neuron melalui peningkatan aktifitas inflamasi (Criscuolo et al. 2015). EPO juga menstimulasi faktor pertumbuhan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan otak normal seperti BDNF dan GDNF (Hernandez et al. 2017).

## **2.8 Penatalaksanaan dan Dosis Terapi Eritropoietin**

Penatalaksanaan cedera otak traumatik berat, khususnya cedera batang otak, terus menjadi tantangan, karena tindakan farmakologis atau pembedahan tidak mungkin membalikkan kerusakan otak primer yang disebabkan oleh peristiwa traumatik (Liu et al. 2008). Kunci pada pengobatan klinis adalah perlindungan dini dan efektif pada jaringan saraf untuk menghindari iskemia sekunder dan cedera

hipoksia, dan untuk memfasilitasi pemulihan sel saraf. EPO rekombinan manusia (RhEPO) adalah pengatur utama eritropoiesis. EPO mempromosikan neurogenesis dan angiogenesis, yang penting untuk proses perbaikan setelah cedera otak yang telah dievaluasi untuk perlindungan saraf pada model hewan dan manusia (Mahmood A et al. 2007). Pada tikus, pengobatan EPO dapat meningkatkan hasil fungsional setelah cedera otak traumatik dengan meningkatkan mobilisasi sel progenitor endotel dan angiogenesis (Xiong Y et al. 2009). Pada neonatus prematur, pengobatan EPO akan memberikan beberapa perlindungan saraf tanpa menyebabkan efek samping yang signifikan (Gonzalez FF et al. 2007).

Dosis optimal dan durasi terapi EPO pada pasien dengan cedera otak traumatik belum ditentukan. Pada tikus wistar jantan dewasa, EPO menunjukkan efek *dose dependent* pada hilangnya neuron hipokampus, angiogenesis dan neurogenesis serta fungsi sensorimotor dan pembelajaran spasial. Hewan coba yang menerima dosis sedang 5000 U/kg memiliki peningkatan yang lebih baik dalam hal gambaran histologis dan efek pemulihan fungsional daripada yang menerima 1000 U/kg atau 3000 U/kg (Meng Y et al. 2011). Pada model hewan lainnya, EPO yang diberikan 6 jam setelah cedera otak memberikan hasil terbaik dalam menyebabkan penurunan volume infark, perbaikan neuron di hipokampus, dan peningkatan pemulihan fungsional. Pengobatan EPO yang dimulai pada 24 jam pasca cedera otak tidak mengurangi volume cedera jaringan otak, meskipun ada peningkatan yang signifikan terhadap hasil fungsional yang diamati. Pemberian EPO setiap hari selama tiga hari tampaknya lebih efektif dalam meningkatkan hasil histologis dan pemulihan

fungsional daripada pengobatan EPO dosis tunggal pada model hewan (Bernaudin M et al.1999).

Pada manusia, dosis EPO yang disetujui adalah sekitar 500 unit/kg, yang jauh lebih rendah daripada dosis yang digunakan dalam penelitian pada hewan. Hasil penelitian menyebutkan, dosis pertama EPO diberikan dalam waktu 8 jam setelah cedera otak dan dilanjutkan dengan lima dosis EPO diberikan dengan dosis harian 100 unit/kg (Siren AL et al. 2009). Regimen dosis ini dikaitkan dengan tingkat biomarker serum yang lebih rendah pada cedera otak, dan efek pemulihan fungsional yang lebih baik 3 bulan setelah perawatan. Apakah dosis EPO yang lebih tinggi menawarkan hasil klinis yang lebih baik tentu saja memerlukan penyelidikan lebih lanjut (Brines et al. 2000). Kellert et al menyatakan bahwa tiga dosis injeksi EPO secara subkutan 5000 U/kg ekuivalen dengan dosis tunggal injeksi EPO 30.000/kg. Peningkatan dosis atau lama terapi tidak memberikan keuntungan, ini menunjukkan potensi kemungkinan batas atas dosis EPO yang tinggi.

EPO akan merangsang pematangan, diferensiasi dan kelangsungan hidup sel progenitor hematopoietik. Sementara EPO dan reseptornya (EPOR) hanya diekspresikan secara lemah di otak orang dewasa normal, ekspresi EPO dan EPOR sangat meningkat di neuron, sel progenitor neuron, glia dan sel endotel serebrovaskular sebagai respons terhadap berbagai jenis cedera sel (Wojchowski DM et al. 1999). Pemberian EPO secara intraperitoneal (5000 U/kg) akan melintasi sawar darah otak (BBB) dan melindungi terhadap cedera otak pada tikus. Pengobatan dengan EPO dapat mengurangi infark iskemik, menurunkan tingkat kematian neuron,

dan meningkatkan tingkat kelangsungan hidup pada model hewan cedera otak traumatik (Naranda T et al. 2002).

Pemberian EPO dengan dosis 5000 U/kg mulai hari ke-1 selama 14 hari setelah TBI secara signifikan dapat meningkatkan neurogenesis dan mendorong pemulihan memori spasial setelah TBI. Pengobatan pasca TBI (6 jam atau 24 jam) dengan EPO (5000 U/kg) atau CEPO (50 g/kg) secara signifikan dapat meningkatkan ekspresi BDNF dan meningkatkan pembelajaran spasial pada 5 minggu setelah cedera pada tikus (Marti HH et al. 2004). Efektivitas EPO tidak tergantung pada peningkatan hematokrit dan pengobatan EPO dosis ganda, dosis 5000 U/kg setiap hari selama 3 hari mulai hari 1 pasca cedera dapat meningkatkan pemulihan fungsional lebih baik daripada terapi EPO dosis tunggal (5000 U/kg pada hari 1 pasca cedera) pada tikus dengan cedera otak traumatik (Grasso G et al. 2004). Pengobatan EPO yang dimulai selambatlambatnya 6 jam pasca-TBI dapat memberikan efek perlindungan saraf yaitu, mengurangi volume lesi dan hilangnya sel, meningkatkan neurogenesis, dan meningkatkan fungsi sensorimotor dan pembelajaran spasial. Dengan demikian, EPO memberikan perlindungan saraf dan pemulihan saraf melalui promosi neurogenesis dan angiogenesis (Viviani B et al. 2005).

### **3. Brain derived neurotrophic factor (BDNF)**

BDNF adalah sejenis protein yang merupakan bagian dari neurotrophin dan merupakan keluarga dari Nerve Growth Factor. BDNF bekerja di neuron susunan saraf pusat dan perifer. BDNF dapat membantu neuron bertahan hidup dan

merangsang pertumbuhan yang baru dan sinaps (Bathina S. 2015). Studi tentang BDNF pada pasien TBI sangatlah jarang dan hasilnya sangat kontroversial, dengan demikian, perannya dalam TBI masih belum jelas. Hubungan antara luaran pasien TBI dan kadar BDNF dalam serum atau cairan serebrospinal belum dapat ditentukan (Simon et al. 2016; Korley et al. 2016).

Reseptor BDNF dan jalur pensinyalan, pro-BDNF, secara selektif akan mengaktifkan reseptor afinitas tinggi, reseptor p75, terutama menginduksi jalur sinyal proapoptosis. BDNF berikatan dengan reseptor spesifisitas tinggi pada reseptor kinase tipe B (TrkB) terkait tropomiosin (TrkB) dan ke reseptor neurotropin afinitas rendah p75, kemudian mengerahkan aksinya melalui interaksi antara dua reseptor transmembran ini, secara terpisah atau bersama-sama, dan berpotensi menyebabkan kematian atau kelangsungan hidup neuron (Elliott et al. 2005). TrkB merupakan keluarga reseptor tirosin kinase Trk termasuk TrkA dan TrkC, yang masing-masing merupakan reseptor untuk NGF dan NT3. TrkB memediasi efek BDNF dan neurotrofin (NT) 4/5. BDNF menghasilkan beberapa efek biologis melalui TrkB reseptor (Fleitas et al. 2018). Mirip dengan BDNF, TrkB diekspresikan secara luas di otak orang dewasa, termasuk korteks, hipokampus, batang otak, dan inti sumsum tulang belakang. Beberapa isoform TrkB telah diamati pada SSP mamalia. Isoform TrkB full-length adalah tipikal tirosin kinase dimana homodimerisasi selama pengikatan ligan akan menyebabkan fosforilasi silang tirosin intraseluler (Wurzelmann et al. 2017).

Residu tirosin dalam domain intraselulernya, menyebabkan dimerisasi yang diinduksi ligan di setiap reseptor, yang mengaktifkan beberapa jalur sinyal intraseluler dengan berbagai fungsi. Lebih khusus lagi, ketika NT berikatan dengan reseptor Trk, tiga enzim ini dianggap sebagai regulator utama yaitu mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) dan phospholipase C (PLC $\gamma$ ) (Rohe et al. 2009).

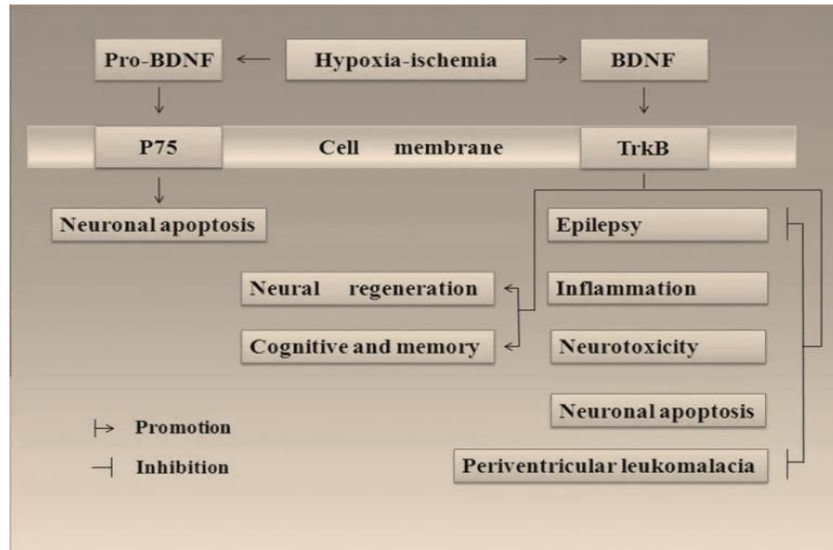
Korhonen et al (1998) menemukan bahwa ada peningkatan kadar BDNF dalam cairan serebrospinal bayi yang menderita asfiksia. Penelitian ini menyimpulkan bahwa peningkatan BDNF merupakan peristiwa tertentu yang disebabkan oleh kerusakan otak pada pasien asfiksia dengan hipoksia atau iskemia otak. Beberapa penelitian lainnya menyebutkan bahwa penurunan BDNF yang terjadi berhubungan dengan luaran yang kurang baik, yaitu terhadap kemampuan kognitif pasien. Penelitian Dharmajaya et al yang menilai kadar BDNF terkait serebrospinal selama 24, 48, 72 dan 120 jam pada pasien cedera otak menunjukkan hasil bahwa pemeriksaan kadar BDNF 48 jam pasca cedera otak adalah tolak ukur yang bermakna sebagai respons perbaikan yang menentukan luaran pasien cedera otak.

Mengingat efek neurotropik BDNF, dapat dipahami bahwa peningkatan regulasi BDNF diinduksi oleh cedera dan reseptor yang bertindak untuk membatasi pensinyalan pro-apoptosis setelah cedera. Hal lain yang mendukung adalah studi klinis yang menyelidiki single nucleotide polymorphism (SNP) umum dari gen BDNF, dimana valin diganti dengan metionin pada kodon 66 (BDNF val66met, atau dikenal sebagai rs6265). Pengurangan 19-30% dalam sekresi protein BDNF yang bergantung

pada aktivitas telah dilaporkan pada manusia yang membawa SNP ini (Shimizu et al. 2004), dengan hasil fungsional yang lebih buruk dilaporkan pada orang-orang ini setelah stroke (Siironen et al. 2007). Namun, alel val66met juga telah dilaporkan dapat meningkatkan pemulihan fungsi eksekutif pada individu dengan TBI (Krueger et al. 2011). Bahkan, knock-in-mice homozigot untuk alel Met telah dilaporkan menunjukkan peningkatan pemulihan fungsional setelah stroke kronis (Qin et al. 2014). Temuan ini memperdebatkan peran yang lebih rumit dari SNP ini yang memerlukan penyelidikan di masa depan untuk mengklarifikasi perannya setelah cedera SSP.

BDNF memainkan peran yang relevan dalam kelangsungan hidup dan plastisitas sel neuron (Korte et al. 1995; Vicario Abejon et al. 2002; Zhang dan Poo 2002). Transkripsinya diatur oleh depolarisasi membran melalui aktivasi saluran kalsium sensitif tegangan tipe-L, dengan masuknya kalsium dan perekrutan aktivator transkrip sensitif  $Ca^{2+}$  (Bading et al. 1993; Tao et al. 1998; Tabuchi et al. 2000).





**Gambar 5. Mekanisme faktor neurotropik (BDNF) yang diturunkan dari otak (Chen, et al. 2012)**

### 3.1 Eritropoetin dan BDNF

Wang et al menjelaskan bahwa pengobatan dengan EPO dapat meningkatkan ekspresi BDNF dalam sel saraf. Vinberg et al melakukan uji coba terkontrol secara acak dan menemukan bahwa EPO dapat meningkatkan kadar BDNF plasma pada pasien dengan gangguan afektif. Viviani et al juga menemukan bahwa EPO melindungi neuron hipokampus primer melalui peningkatan ekspresi BDNF.

EPO dapat menekan apoptosis dari neurosit yang disertai cedera saraf spinal (SCI) oleh regulasi anoxia dan ekspresi oksigen radikal. Pada kesimpulannya, kombinasi Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) secara genetik yang dimodifikasi oleh BDNF dengan EPO dapat secara maksimal menekan apoptosis dari neurosit yang disertai SCI dan melindungi fungsi dari sisa neuron (Gustafsson et al. 2021).

Eritropoietin, selain berperan sebagai pengatur utama progenitor eritroid sel, juga dapat meningkatkan kelangsungan hidup neuron. Dengan menggunakan kultur

primer neuron hipokampus tikus, sebuah penelitian menyatakan bahwa EPO dapat memediasi perlindungan saraf yang mendukung transkripsi faktor neurotropik (BDNF) yang diturunkan dari otak (Morishita et al. 1997; Koshimura et al. 1999). EPO mengurangi 50% kematian neuron yang dipicu oleh prototypic neurotoxicant trimetiltin (TMT) dan mRNA BDNF. Efek ini mengakibatkan peningkatan produksi biologis aktif BDNF, yang menyebabkan aktivasi berkelanjutan dari reseptor spesifik BDNF, yaitu tirosin kinase B (TrkB). Pemberian intracerebroventrikular EPO pada tikus secara signifikan dapat meningkatkan ekspresi mRNA BDNF di otak, yang mendukung gagasan keterlibatan neurotropin ini dalam aktivitas EPO dalam SSP (Schaefer et al. 1997; Koshimura et al. 1999). Ekspresi mRNA BDNF dalam sel saraf diinduksi oleh aktivasi tegangan  $Ca^{2+}$ -channel dan perekrutan transkripsi faktor sensitif  $Ca^{2+}$ . Secara konsisten, EPO akan meningkatkan  $Ca^{2+}$  intraseluler dalam 5 menit dan pengikatan elemen respons cAMP fosforilasi protein (CREB) pada Ser 133 dalam 30 menit (Franklin J et al. 1992). Kedua efek dihilangkan oleh nitrendipine, yaitu penghambat selektif dari saluran tegangan  $Ca^{2+}$  tipe-L (L-VSCCs) (Tao et al. 1998). Data ini menunjukkan bahwa EPO mengaktifkan jalur transkripsi CREB dan meningkatkan ekspresi dan produksi mRNA BDNF, yang berkontribusi terhadap proteksi sel-sel saraf (Barbara Viviani et al. 2005).

Produksi BDNF yang diinduksi oleh EPO berkorelasi dengan peningkatan neurogenesis sebagai respons terhadap stroke dan cedera otak (Wang et al. 2004). Hasil penelitian juga memberikan bukti keterlibatan neurotropin ini dalam efek neuroprotektif dari EPO, serta memperkuat hubungan BDNF sebagai mediator dari

aksi neuronal EPO. Berkenaan dengan jalur molekuler spesifik yang memediasi produksi BDNF yang diinduksi oleh EPO, fokusnya terjadi pada pensinyalan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler. Teori ini memiliki dasar bahwa: (i) respons  $\text{Ca}^{2+}$  terhadap EPO adalah peristiwa awal dan kritis yang terlibat dalam fungsinya (Morishita et al. 1997; Schaefer et al. 1997; Koshimura dkk. 1999) dan (ii) aktivasi gen BDNF adalah  $\text{Ca}^{2+}$  yang dimediasi (Zafra et al. 1990; Bading et al. 1993). Pada neuron hipokampus primer, EPO meningkatkan  $\text{Ca}^{2+}$  melalui aktivasi L-VSCCs sebagai amplitudo dan kinetika kenaikan  $\text{Ca}^{2+}$  yang relevan dalam menentukan jenis respons seluler (yaitu ketahanan hidup vs kematian sel). Peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  yang diinduksi oleh EPO dapat dipantau selama beberapa jam, dimana  $\text{Ca}^{2+}$  yang rendah dan peningkatan melalui L-VSCCs konsisten berhubungan dengan aktivasi ketahanan hidup sel daripada kematian sel. Pada neuron, masuknya  $\text{Ca}^{2+}$  melalui L-VSCCs akan mempromosikan fosforilasi CREB di Ser133 (Sheng et al. 1991; Tao et al. 1998) dan interaksinya dengan transkripsi protein pengikat CREB koaktivator dapat mempotensiasi ekspresi gen target, diantaranya BDNF. Semua pengamatan ini mencetuskan gagasan bahwa jalur transkripsi CREB dapat dipicu oleh EPO dalam sel saraf, seperti yang diamati pada sel eritroid. Oleh karena itu, EPO dapat meningkatkan  $\text{Ca}^{2+}$  dan fosforilasi CREB di Ser133 di neuron hipokampus primer. Aktivasi CREB selanjutnya dikonfirmasi oleh elektroforesis pergeseran mobilitas dengan menggunakan pengujian yang mengandung urutan BDNF-CRE. Perlindungan saraf yang diinduksi oleh EPO juga berkorelasi dengan perekrutan faktor yang berbeda seperti faktor nuklir  $\text{I}\kappa\text{B}$ , PI3K/Akt, MAPK dan Stat-5. Menariknya,  $\text{Ca}^{2+}$  (akhirnya melalui L-VSCC) yang memodulasi aktivitas

beberapa faktor tersebut. Jadi, ada kemungkinan pasangan  $Ca^{2+}$  ke kaskade jaringan transduksi untuk mengatur jaringan neuronal untuk pertahanan hidup.

Pengiriman langsung neurotrofin seperti BDNF ke otak menjadi tantangan utama karena adanya permeabilitas sawar darah otak. Pendekatan alternatif untuk pemberian mRNA BDNF secara langsung adalah dengan meningkatkan aktivitas BDNF di otak oleh agen yang dapat dengan mudah masuk ke dalam SSP. Menariknya, pengobatan rekombinan EPO manusia (rhEPO) baru-baru ini dilaporkan memiliki efek meningkatkan ekspresi BDNF di otak (Zhang et al. 2016). Selain itu, beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa rhEPO adalah agen pelindung saraf yang baik dalam melawan disfungsi saraf akibat berbagai gangguan saraf yang melibatkan peningkatan apoptosis (Sakanaka et al. 1998; Siren et al. 2001; Dzierko et al. 2004; Spandou et al. 2004).

Ekspresi EPO dan reseptornya juga telah ditunjukkan dalam kultur neuron dan astrosit in vitro, dan rhEPO telah ditemukan menjadi pelindung saraf dalam berbagai situasi, termasuk hipoksia dan stres oksidatif in vivo (Bernaudin et al, 1999; Brines et al, 2000; Siren et al, 2001; Marti, 2004). Lebih lanjut, penelitian terbaru oleh Ehrenreich et al menunjukkan bahwa rhEPO dapat meningkatkan fungsi kognitif pada pasien skizofrenia kronis. Studi lainnya melaporkan bahwa pemberian haloperidol (HAL) dan olanzapine memiliki efek temporal yang berbeda dari ekspresi EPO dan reseptornya pada otak tikus dewasa (Pillai dan Mahadik, 2006). Data tersebut menunjukkan bahwa pada 14 hari pengobatan HAL akan meningkatkan kadar EPO dan reseptornya di hipokampus dan striatum, tetapi kadar EPO menurun di bawah

nilai kontrol selama 45 hari pengobatan, sedangkan pengobatan olanzapine akan mempertahankan kadar yang meningkat selama 45 hari. Perubahan ini sejalan dengan perubahan neuropatologi yang dilaporkan sebelumnya pada tikus (Mahadik et al, 1988; Terry et al, 2002). Studi-studi ini menunjukkan bahwa rhEPO dapat mencegah penurunan kadar BDNF yang diinduksi HAL di otak dan dengan demikian memungkinkan BDNF untuk memberikan perlindungan saraf melalui regulasi apoptosis. Studi pada hewan tersebut memberikan konsep awal potensi penggunaan rhEPO sebagai pendekatan tambahan untuk melawan efek samping terapi antipsikotik kronis pada pasien manusia.

EPO dan BDNF memiliki efek sinergitas untuk mencegah apoptosis dari selubung neuron, Wang et al melaporkan bahwa pengobatan dengan EPO meningkatkan ekspresi BDNF pada sel-sel neuron. Vinberg et al melakukan studi percobaan kontrol acak dan menemukan bahwa EPO dapat meningkatkan level plasma BDNF pada pasien dengan gangguan afektif. Dalam penelitian ini, pengobatan bersama rhEPO dengan HAL dipelajari untuk menentukan efek pada BDNF di percobaan in vivo dan in vitro. Studi ini juga menentukan apakah perubahan tingkat BDNF setelah HAL saja atau pengobatan bersama dengan rhEPO berkaitan dengan perubahan berbagai penanda apoptosis (Bcl-2, Bcl-xl, Bax, dan caspase-3).

#### **4. Stromal cell derived factor-1 (SDF-1)**

Stromal cell derived factor-1 (SDF-1) adalah bagian dari CXC [juga dikenal sebagai CXC motif chemokine 12 (CXCL12)] yang diekspresikan oleh berbagai jenis sel. Dua isoform SDF-1 (SDF-1a dan SDF1b), yang hanya berbeda oleh empat asam amino pada terminal-C, dihasilkan dari satu gen tunggal dengan penyambungan diferensial RNA. Struktur utama SDF-1 ditemukan di seluruh spesies, dengan hanya satu perbedaan asam amino antara protein manusia dan tikus (Cheng et al. 2017).

CXCR4 dan SDF-1 diekspresikan selama perkembangan di cerebellum, hippocampus dan neocortex dan secara pasti diekspresikan dalam otak selama masa dewasa. Studi terbaru menunjukkan bahwa SDF-1 dan CXCR4 memainkan peran penting dalam homeostasis di SSP (Maan et al. 2019).

Hubungan antara ekspresi SDF-1/CXCR4 dan migrasi neural stem sel (NSC) di sekitar area yang rusak setelah TBI masih belum dapat dijelaskan dan penelitian mengenai hal ini pun terbatas (Itoh et al. 2013). Sebuah studi menjelaskan hubungan antara SDF-1/CXCR4 dan stem sel yang muncul di daerah yang rusak setelah TBI pada tikus, menunjukkan bahwa ekspresi mRNA SDF-1 dan sintesis protein SDF-1 tidak meningkat setelah TBI. Namun, terdapat peningkatan signifikan SDF-1 pada daerah yang rusak dan menyebar ke dalam korteks 1-3 hari setelah TBI (Maan et al. 2019; Zhang et al. 2016).

Sebuah studi menunjukkan bahwa pengikatan SDF-1 ke CXCR4 melalui beberapa jalur pensinyalan, yang dapat menghasilkan berbagai respons penting selama proses angiogenesis, seperti kemotaksis, proliferasi sel, migrasi, dan sekresi faktor angiopoietik (Carmeliet, 2000). Jalur transduksi sinyal PI3K/Akt dan mitogen-

activated protein kinase (MAPK)/ERK, yang dimediasi oleh SDF-1, berkontribusi pada migrasi sel, proliferasi, pembentukan tabung myelin, apoptosis, dan kemotaksis (Ganju RK et al. 1998).

SDF-1 menghambat apoptosis neuron kortikal melalui jalur caspase-3 dan Bcl-2/Bax setelah TBI. Pengobatan dengan SDF-1 dapat mencegah apoptosis neuron yang diinduksi TBI sehingga mendorong peneliti untuk mengeksplorasi mekanisme regulasi yang mungkin terjadi melalui penekanan pada pensinyalan apoptosis oleh caspase-3. Studi ini menemukan bahwa peningkatan caspase-3 dan PARP melalui proses pembelahan jaringan otak tikus dengan TBI terbukti berkurang setelah pengobatan dengan SDF-1, namun sebaliknya terlihat lebih meningkat setelah pengobatan antibodi SDF-1 (Eldabah BA. 2000).

Studi dari Yoo et al menunjukkan bahwa peningkatan kadar SDF-1 mendorong proliferasi neuron dan meningkatkan neurogenesis pasca stroke, yang menunjukkan peran neuroprotektif SDF-1 pada cedera otak. Selain itu, pengobatan SDF-1 dilaporkan dapat menginduksi apoptosis sel pada leukemia myeloid akut, sedangkan pengobatan ini menghambat apoptosis sel mesenkim sumsum tulang dan sel progenitor endotel. Hasil sebelum ini menunjukkan bahwa SDF-1 memberikan efek pro-apoptosis atau anti-apoptosis pada tipe sel yang berbeda (Kremer KN et al. 2013).

#### **4.1 Eritropoetin dan SDF-1**

EPO mengatur tingkat CXCR4/SDF-1 melalui jalur pensinyalan spesifik, glikoprotein ini dan reseptor sejenisnya, EPOR, yang memberikan perlindungan terhadap gangguan di SSP (Keswani et al. 2005). Oleh karena EPO mempromosikan

neurogenesis dan dapat menginduksi migrasi neuroblast dari subventricle zone (SVZ) menuju olfactory bulb (OB) setelah kerusakan SSP (Shingo et al. 2001; Chen et al. 2007; Ransome dan Turnley. 2007), hal ini dapat memenuhi peran sebagai terapeutik mendasar dalam iskemia serebral dengan mengatur kadar CXCR4/SDF-1 (Wang et al. 2004; Avasarala dan Konduru, 2005; Xiong et al. 2007; Brunner et al. 2009). Pada model iskemia serebral, meningkatnya perbaikan sel-sel progenitor yang diturunkan dari sumsum tulang melalui sumbu CXCR4/SDF-1, diinduksi oleh cerebrolysin neuroprotektan dalam kardiomyosit (Brunner et al. 2009) dan sel-sel saraf, baik in vivo maupun in vitro (Merino et al. 2009). Temuan ini mendukung gagasan bahwa EPO mempromosikan efek perlindungan melalui kemokin CXCR4/SDF-1 (Brunner et al. 2009; Gao et al. 2012).

Sebagai faktor neuroprotektif, rhEPO juga memiliki efek positif pada peningkatan regulasi SDF-1. EPO dapat meningkatkan sekresi SDF-1 pada jaringan yang terluka melalui reseptor EPO (Li et al. 2015). Interaksi SDF-1/CXCR4 dapat mengaktifkan beberapa jalur pensinyalan, termasuk jalur fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) dan mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ERK1/2, yang kemudian mengatur ekspresi matrix metalloproteinase (MMP) (Liu SC et al. 2014). Hal ini menunjukkan bahwa SDF-1/CXCR4 dapat mengaktifkan jalur pensinyalan PI3K dan MAPK dan mempromosikan sekresi MMP untuk memfasilitasi terjadinya angiogenesis dan proliferasi sel (Antonelli M et al. 2012).

Studi lain menunjukkan bahwa ekspresi SDF-1 yang diinduksi oleh kondisi hipoksia sangat penting dalam perbaikan sel selektif dan migrasi sel progenitor CXCR4



ke jaringan iskemik, dan menunjukkan bahwa induksi ekspresi SDF-1 melalui hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) dapat secara langsung memandu sel progenitor regeneratif ke area cedera (Staller et al. 2003). Bersamaan dengan temuan bahwa HIF-1 mengatur CXCR4, hasil penelitian lain menunjukkan bahwa hipoksia jaringan merupakan mekanisme fundamental yang dapat mengatur perekrutan dan retensi sel punca dan progenitor. Dengan demikian, lingkungan mikro hipoksia dapat mewakili sel induk dan progenitor, dimana stabilisasi dan aktivasi HIF-1 dari stimulus (SDF-1) dan reseptor (CXCR4) akan memfasilitasi perekrutan sel progenitor pada jaringan iskemik yang membutuhkan perbaikan (Rivard et al. 2000). Dengan demikian, manipulasi aktivitas HIF-1 dapat menjadi cara yang berguna untuk meningkatkan kapasitas perbaikan bawaan tubuh (Elson et al. 2001).

Perubahan dalam lingkungan mikro sumsum tulang menyebabkan peningkatan regulasi HIF-1 dan vascular endothelial growth factor (VEGF) di seluruh sumsum tulang (Urao et al. 2012). Mekanisme bagaimana iskemia mampu menginduksi peningkatan reactive oxygen species (ROS) dan ekspansi hipoksia di sumsum tulang belum sepenuhnya dipahami. Oleh karena itu, ROS yang diturunkan dari Nox2 akan menginduksi ekspansi hipoksia dan ekspresi HIF-1 di lingkungan mikro sumsum tulang, ROS dari jaringan iskemik juga berperan dalam mempromosikan mobilisasi sel induk dan sel progenitor (Urao et al. 2008). SDF1 yang dilepaskan dalam jaringan iskemik akan mendorong mobilisasi sel punca dan progenitor ke dalam sirkulasi dengan mengikat reseptor motif CXC 4 (CXCR4) (Ceradini et al. 2004).

Studi lain mengungkapkan bahwa beberapa sitokin dan jalur pensinyalan dapat mengatur efek terapeutik bone marrow stromal cell (BMSC), baik in vitro maupun in vivo. Telah dibuktikan bahwa SDF-1 dan reseptornya CXCR4 merupakan dua sitokin penting dalam kondisi fisiologis dan patologis, yang bergabung dan memainkan peran penting dalam mengatur migrasi dan proliferasi berbagai jenis sel (Guo et al. 2015). Dalam penelitian terbaru tentang transplantasi sel punca mesenkim (MSC) untuk pengobatan TBI, pensinyalan SDF-1/CXCR4 ditemukan sebagai faktor yang penting dalam memfasilitasi migrasi sel yang ditransplantasikan ke area cedera otak. Hal ini terkait dengan pengurangan jumlah neuron apoptosis dan pemulihan fungsi saraf (Ma JH et al. 2015).

VEGF dan reseptornya VEGFR adalah pengatur penting dari pertumbuhan, perkembangan, dan migrasi beberapa jenis sel (Deng et al. 2017). Faktor pertumbuhan endotel yang paling melimpah dan aktif adalah VEGF-A (Kuai et al. 2016). Studi menunjukkan bahwa VEGF-A dapat merangsang reseptor faktor pertumbuhan yang diturunkan dari trombosit (PDGFRs), sehingga mengatur migrasi dan proliferasi BMSC manusia (Liu et al. 2011). Ekspresi VEGF yang berlebihan pada BMSC manusia dapat merangsang ekspresi SDF-1 jaringan yang mengalami infark dan menghasilkan mobilisasi besar-besaran dalam penempatan BMSC dan sel induk jantung, yang bermanfaat untuk pengurangan ukuran infark (Pillariseti et al. 2001).

Sebagai pengatur eritropoiesis, EPO adalah faktor pertumbuhan signifikan yang mendorong perekrutan BMSC dan selanjutnya memicu pembentukan tulang dan angiogenesis dari BMSC (Li C et al. 2014). Kemokin dan sitokin ini merupakan

faktor signifikan dalam mengatur mobilisasi, migrasi, dan perekrutan sel induk (Shen Y et al. 2006). Kaigler et al menyatakan bahwa BMSC akan mensekresi VEGF dalam jumlah yang cukup untuk meningkatkan pertumbuhan dan diferensiasi sel-sel endotel pada model angiogenesis in vitro.

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa sumbu reseptor kemokin 4 (CXCR4) yang diturunkan dari sel stroma/CXC memainkan peranan penting dalam perekrutan sel induk mesenkim yang diturunkan dari sumsum tulang (BMSC) ke lokasi lesi pada hewan model. Tujuan dari penelitian tersebut adalah untuk mengetahui efek dari sumbu SDF-1/CXCR4 pada migrasi BMSC yang ditransplantasikan dan dimobilisasi oleh EPO menuju lokasi lesi cedera. Penemuan dari penelitian ini mengkonfirmasi bahwa EPO memobilisasi BMSC ke lokasi lesi mengikuti TBI dan meningkatkan efek anti-apoptosis dari BMSC dengan mengatur ekspresi sumbu SDF-1/CXCR4 (McGee et al. 2012).

### **5. *Neuron Specific Enolase (NSE)***

Enolase atau 2-fosfo-D-gliserat hidrolase merupakan enzim untuk metabolisme energi yang terdapat di dalam sitoplasma sel. Enolase adalah salah satu enzim dari jalur glikolitik untuk mengubah glukosa menjadi piruvat. Enolase mengubah 2-fosfo-D-gliserat menjadi fosfoenolpiruvat. Enolase merupakan dimer dari dua subunit, alfa, beta, atau gamma (Haque et al. 2016). Terdapat lima isoenzim enolase, yang tergantung pada subunit penyusun dimer yaitu aa, bb, gg, ab, ag. Enolase otak hanya terdiri atas subunit alfa dan gamma, neuron hanya terdiri atas

enolase gamma-gamma, jaringan neuroektodermal mungkin memiliki alfa-gamma atau gamma-gamma, dan glia hanya terdiri atas enolase alfa-alfa, yang hampir identik dengan enolase hati, juga terdiri atas enolase alfa-alfa. Enolase gamma disebut sebagai neuron spesifik nolase (NSE) karena karakteristik neuronnya (Marangos et al. 1978; Haque et al. 2016).

NSE terdeteksi dalam serum dan cairan serebrospinal (CSS) dengan menggunakan teknik penetapan radioimmunologi standar (RIA). RIA yang tersedia secara komersial merupakan RIA antibodi berdasarkan pada teknik yang digambarkan oleh Molnar (Lima et al. 2004).

NSE merupakan biomarker kerusakan otak akut yang terdapat di CSS dan darah, akibat pecahnya membran sel neuron yang merupakan marker yang sensitif dari cedera otak akibat hipoksia, iskemik, dan trauma kerusakan pada SSP. NSE dengan kelebihan masa paruhnya yang lebih lama di dalam darah dibandingkan dengan biomarker lainnya, dapat menunjukkan adanya proses inflamasi otak dan kematian sel neuron. Tingginya kadar NSE berhubungan dengan cedera sel neuron (Haiga et al. 2019).

Selain diekspresikan khusus di neuron, NSE memiliki stabilitas yang tinggi di dalam cairan biologis, yaitu sebagai protein yang larut bebas dalam sitoplasma, dan dapat dengan mudah menyebar ke ekstraseluler dan CSS pada saat membran sel saraf terluka. Oleh karena itu, pengukuran NSE dalam CSS (cNSE) dapat menjadi penanda kerusakan sel saraf. NSE diasumsikan merupakan suatu enzim yang berasal dari sitoplasma sel yang dikeluarkan saat terjadi kerusakan sel (Mercier et al. 2018).

Kadar konsentrasi serum tinggi serum NSE tinggi ditemukan pada TBI berhubungan dengan tingkat keparahan cedera. Pada kasus TBI yang berat, NSE akan berkorelasi dengan hasil klinis. Biasanya, meningkat dalam 12 jam pertama setelah trauma dan kemudian menurun dalam beberapa jam dan hari. Peningkatan sekunder bisa terjadi pada pasien yang kondisinya memburuk. Kadar NSE normal dalam serum darah perifer adalah  $8,7 \pm 3,9$  ng/ml (laki-laki  $8,9 \pm 3,9$ , perempuan  $8,3 \pm 4,0$ ). Konsentrasi NSE dalam CSS adalah  $17,3 \pm 4,6$  ng/ml (laki-laki  $17,4 \pm 4,2$ , perempuan  $17,0 \pm 5,2$ ) (Mercier et al. 2018; Hikmi et al. 2018).

NSE diyakini sebagai penanda penting yang secara langsung menilai kerusakan fungsional pada neuron. Kadar NSE sering meningkat pada pasien dengan gangguan SSP yang terkait dengan cedera otak sekunder yang serius (Ergun R et al. 1998). Serum NSE juga telah diuji sebagai penanda cedera otak setelah iskemia serebral global, dan ditemukan sangat meningkat, sehingga menunjukkan bahwa deteksi NSE adalah alat diagnostik yang berharga dalam manajemen klinis pada iskemia serebral dan dapat menjadi parameter prognostik selama perjalanan pasca-iskemik. Dengan demikian, NSE saat ini dikenal sebagai biomarker kerusakan otak iskemik dan telah dievaluasi pada TBI (Kleine et al., 2003).

Penjelasan yang paling mungkin untuk temuan ini adalah hilangnya sel-sel sistem saraf pusat. Segera setelah TBI yang parah, cedera sel-sel saraf masif terjadi sebagai akibat dari berbagai mekanisme seperti cedera aksonal difus, kontusio serebral, intraparenkimal dan hematoma ekstra-aksial, dan edema serebral (Streitburger et al. 2012). Cedera otak primer ini diikuti oleh cedera otak sekunder,

suatu mekanisme cedera yang berbeda yang dimulai pada waktu trauma awal dan berlanjut selama berjam-jam atau sehari-hari. Mekanisme tersebut termasuk eksitotoksitas yang dimediasi oleh neurotransmitter, disfungsi mitokondria, dan respon inflamasi dengan aktivasi mikroglia sementara atau persisten (Egea-Guerrero et al. 2014). Cedera otak primer dan sekunder sesuai dengan peningkatan akut kadar NSE yang pada gilirannya berkorelasi dengan luaran pasien. Peningkatan NSE bersifat sementara, dimana seminggu setelah TBI, tingkat NSE akan kembali ke normal. Penurunan kadar NSE yang diamati pada fase kronis TBI mungkin mencerminkan serangkaian proses patofisiologi yang terpisah (Johnson p et al. 2000).

NSE adalah biomarker kerusakan saraf. Dalam studi perbandingan S100B dan NSE, S100B adalah prediktor hasil yang lebih baik secara keseluruhan, dengan NSE yang hanya memprediksi resiko kematian. NSE memiliki waktu paruh lebih lama dari S100B, sedangkan S100B lebih terkait dengan cedera ekstrakranial (Thelin et al. 2016). Oleh karena itu, NSE mungkin bermanfaat pada pasien TBI dengan trauma multipel. TBI menyebabkan bocornya S100B dan NSE dari sel-sel otak yang rusak ke dalam darah atau cairan serebrospinal (CSS). Konsentrasi biomarker di CSS mungkin lebih akurat untuk memprediksi hasil pada TBI (Ramont et al. 2005).

Selain dianggap sebagai molekul penting yang secara langsung menilai kerusakan neuron, NSE juga terlibat dalam perbaikan saraf. NSE telah terbukti dapat mengontrol kelangsungan hidup neuron, diferensiasi, dan regenerasi neuron dengan mengaktifkan jalur pensinyalan PI3K/Akt dan MAPK/ERK. Aktivasi yang dimediasi NSE dari jalur PI3K dan ERK1/2 diperlukan untuk pertumbuhan neuron, yang dapat

dilemahkan oleh penghambatan MEK (MAPK/ERK kinase) dan PI3K. Aktivitas neurotropik ini dapat diatur oleh protease sistein, cathepsin X (Cat X), yang memotong ujung terminal-C dari molekul dan mengganggu aktivitasnya (Polcyn et al. 2017). Menariknya, aktivasi PI3K yang dimediasi NSE juga mengatur RhoA kinase, pengatur utama organisasi sitoskeleton aktin, dan dapat mempengaruhi kedua proses neurodegenerasi dan perlindungan saraf yang tergantung pada kekuatan sinyalnya. Berdasarkan pemahaman yang lebih baik tentang NSE yang efektif di neuron dan glia mungkin memberikan peluang baru untuk pengobatan cedera SSP (Marangos et al. 1980).

NSE adalah biomarker yang berharga dalam degenerasi dan regenerasi saraf pada kejadian SCI. Setelah cedera, ekspresi dan aktivitas NSE secara nyata diregulasi di glial dan sel neuronal, serta menunjukkan peran enzim tersebut dalam peradangan setelah peristiwa ini (Hafner A et al. 2013). Namun, NSE juga memiliki sifat neurotropik pada spektrum luas neuron SSP dan diperlukan oleh sel-sel saraf untuk bertahan hidup. Kemungkinan regulasi sitokin dan kemokin inflamasi serta protease dapat mengatasi kerusakan aksonal dan kematian neuron. Cat X dapat mengatur NSE dan kelangsungan hidup neuron (Pislar A et al. 2017). Jadi, regulasi NSE melalui Cat X atau jalur lain mungkin merupakan strategi terapeutik yang penting untuk pencegahan peradangan dan neurodegenerasi pada SCI dan beberapa penyakit neurodegeneratif lainnya. Studi berikutnya harus berfokus pada regulasi NSE dalam mengoptimalkan peradangan saraf dan promosi pelindung saraf dalam kondisi neurodegeneratif (Zheng J et al. 2012).

## **5.1 Eritropoietin dan *Neuron Specific Enolase***

Eritropoietin (EPO) adalah hormon glikoprotein dengan efek seperti sitokin pleiotropik. EPO memiliki efek, terlepas dari efek pada eritropoiesis, yang relevan dengan pasien yang mengalami TBI. Efek tersebut termasuk anti-apoptosis dan efek neurologis pelindung dengan adanya hipoksia dan iskemia (Chao F et al. 2008). Efek pelindung saraf dari EPO telah dibuktikan pada model hewan dari TBI. NSE telah terlibat dalam iskemia, hipoksia, dan beragam penyakit metabolik, proliferasi, inflamasi, autoimun, dan neurodegeneratif (Sawhney S et al. 2015). Hilangnya neuron dan koneksi sinaptik secara bertahap adalah gambaran umum dari gangguan neurodegeneratif, di mana tingkat kehilangan saraf berkorelasi dengan peningkatan kadar NSE dalam serum dan CSS serta perkembangan klinis penyakit. Selain itu, penghambatan NSE telah terbukti mengurangi kemokin/sitokin inflamasi, menghambat aktivasi MMP-9, memodulasi hormon metabolik, dan mengurangi gliosis pasca SCI melalui jalur seluler dan metabolik yang berbeda (Bae S et al. 2012).

Meskipun NSE dianggap sebagai molekul penting yang secara langsung menilai kerusakan neuron, NSE juga dapat terlibat dalam perbaikan saraf. NSE telah terbukti mengontrol kelangsungan hidup neuron, diferensiasi, dan regenerasi neurit dengan mengaktifkan jalur pensinyalan PI3K/Akt dan MAPK/ERK (Hafner A et al. 2012). Aktivasi yang dimediasi NSE dari jalur PI3K dan ERK1/2 diperlukan untuk perkembangan neurit, yang dapat dilemahkan oleh penghambatan MEK (MAPK/ERK kinase) dan PI3K (Haque, et al. 2018).



## 6. Pemeriksaan Histopatologi dengan Hematoxylin and Eosin (H&E)

Pada cedera otak, disfungsi langsung dan sekunder dari BBB terjadi akibat konsekuensi dari gangguan kompleks dan integritas membran basal kapiler (Bradburry MW et al. 1993). TBI sering mengakibatkan terjadinya invasi neutrofil, monosit, dan limfosit dari perifer dan aktivasi mikroglia akibat gangguan BBB. Hal ini akan memulai kaskade respon inflamasi (Morganti et al. 1997). Terdapat bukti yang mendukung patogenesis leukosit pada otak yang mengalami cedera akut. Leukosit, termasuk neutrofil, akan melepaskan radikal bebas, protease dan sitokin proinflamasi, yang semuanya dapat meningkatkan kerusakan jaringan (Owen and Campbell, 1999). Rekrutmen leukosit ke dalam otak orang dewasa yang mengalami trauma (Schoettle et al. 1990) terjadi sebagai respons terhadap aktivasi komplemen (Kaczorowski et al. 1995) dan bertepatan dengan gangguan sawar darah otak (Soares et al. 1995).

Cedera akut pada otak akan mengaktifkan mikroglia dan pelepasan sitokin pro-inflamasi (Rivet S et al., 2009). Dijelaskan bahwa neutrofil dapat merangsang perekrutan dan aktivasi monosit/makrofag di jaringan perifer (Soehnlein O et al. 2008). Tampak bahwa aktivasi mikroglial/makrofag kurang menonjol pada tikus yang diberi kondisi neutropenia, yang menunjukkan hubungan serupa antara perekrutan neutrofil dan aktivasi sel fagosit di otak seperti pada jaringan perifer (Zhu ZF et al. 2010). Hubungan ini semakin diperkuat oleh kurangnya akumulasi PMN di hipokampus, yang dikaitkan dengan aktivasi beberapa sel apoptosis dan mikroglia/makrofag. Pada penelitian lain yang menggunakan model perdarahan

intraserebral pada tikus, didapatkan keadaan neutropenia yang mengakibatkan penurunan jumlah mikroglia/makrofag yang teraktivasi secara signifikan pada hari ke-7 dan 14 setelah cedera (Moxon et al. 2011).

Neutrofil adalah sel sirkulasi yang berumur pendek yang dengan cepat bergerak ke tempat infeksi atau cedera sebagai lini pertama pertahanan. Sawar darah otak membatasi masuknya neutrofil ke SSP yang tidak cedera, namun, gangguan dalam sawar darah otak memungkinkan infiltrasi neutrofil setelah cedera (Liao P et al. 2013). Infiltrasi neutrofil berada di sepanjang arteriol dan vena serebral dalam waktu 5 menit setelah cedera otak pada manusia, dengan jumlah terbatas pada vena pascakapiler di daerah otak yang mengalami hipoperfusi (Hallenbeck et al. 1986). Neutrofil kemudian mengisi ruang subarachnoid dan subdural dalam waktu 4 jam setelah cedera dan menunjukkan peningkatan empat kali lipat dalam tingkat sirkulasi, dengan infiltrasi ke parenkim kortikal dan subkortikal yang telah diamati selama beberapa hari berikutnya (Clark J et al. 1994).

Neutrofil yang diaktifkan menuju pada daerah otak yang cedera, memiliki kapasitas untuk mendukung patogenesis sekunder melalui pembentukan ROS (radikal anion superoksida, hidrogen peroksida, asam hipoklorit) (Snelgrove et al. 2018) dan pelepasan kembali komponen granular, termasuk neutrofil elastase dan MMP-9, yang secara kolektif memediasi kematian sel, gangguan penghalang darah-otak dan degradasi matriks ekstraseluler. Dengan kandungan asam lemak yang tinggi yang selanjutnya diperparah dengan cadangan antioksidan yang rendah, otak yang sedang

berkembang berada dalam posisi yang buruk untuk merespons produk-produk beracun yang dihasilkan oleh neutrofil yang diaktifkan (Bayir et al. 2006).

Neutrofil dapat ditemukan teragregasi dalam mikrovaskuler 2 jam pasca trauma (Schoettle RJ et al. 1990). Infiltrasinya di jaringan saraf yang rusak dimulai dalam 24 jam (Soares HD et al. 1995), diikuti oleh makrofag dalam waktu 36-48 jam setelah trauma (Giulian D et al. 2016). Sedangkan Limfosit T telah terbukti menginfiltrasi ke otak dalam 2-3 hari pasca cedera pada model tikus TBI (Holmin S et al. 1995).

Rekrutmen leukosit polimorfonuklear (PMN), khususnya granulosit neutrofil, merupakan karakteristik dari respon inflamasi awal setelah TBI (Holmin S et al. 1998). Rekrutmen neutrofil telah terbukti meningkat selama 24 jam pertama setelah TBI eksperimental (Whalen MJ et al. 1999). Sejalan dengan peningkatan kadar kortisol plasma, terjadi kenaikan jumlah limfosit perifer yang sementara tetapi berkurang secara signifikan, dengan penurunan 42% dalam 1 jam setelah cedera dan penurunan 20% dalam 4 jam dibandingkan dengan tikus kontrol (Santarsieri M et al. 2014). Penurunan tampaknya lebih dominan pada sel T dari pada sel B, dengan penurunan 53% sel T dibandingkan dengan penurunan hanya 28% pada sel B pada 1 jam setelah cedera. Tidak ada perbedaan yang signifikan dalam jumlah monosit dan neutrofil yang bersirkulasi dibandingkan dengan kontrol pada titik waktu yang diperiksa (Wagner AK et al. 2011).

Dampak kortikal terkontrol (CCI) digunakan sebagai model TBI untuk menyelidiki peran neutrofil dalam respon cedera. Untuk memastikan bahwa cedera

otak mengakibatkan perekrutan PMN, bagian otak yang diambil 24 jam setelah cedera diwarnai dengan antibodi terhadap antigen Gr-1. Sejalan dengan penelitian sebelumnya (Soares HD et al., 1995; Clausen F et al. 2007), TBI dapat mengakibatkan terjadinya akumulasi PMN di korteks yang cedera ( $174,7 \pm 10,7$  sel/bidang). Berbeda dengan apa yang diamati di korteks, tidak ada perekrutan neutrofil yang jelas ke hipokampus ( $1,2 \pm 0,47$  sel/bidang dan  $2 \pm 0,82$  sel/bidang untuk tikus neutropenia dan hewan kontrol, masing-masing) (Ellinor Kenne et al. 2012).

Penurunan pada cedera sekunder disebabkan oleh PMN sehingga membutuhkan lebih sedikit aktivasi mikroglia/makrofag. Selain penurunan apoptosis, penipisan neutrofil mengakibatkan hilangnya jaringan otak dan volume lesi yang dilemahkan setelah TBI. Efek neuroprotektif dari neutropenia ditemukan signifikan pada hari ke 7 dan 14 setelah cedera (Khan M et al. 2009). Dengan demikian, ada efek yang menguntungkan dari penipisan PMN dini pada perkembangan cedera, kemungkinan karena sitotoksitas terkait PMN yang lebih sedikit, edema yang lebih sedikit atau pengurangan jumlah sel inflamasi di daerah yang cedera (Semple BD et al. 2010).

Takeda et al dalam studinya menjelaskan bahwa BDNF akan menurunkan jumlah *neutrophil-like HL-60 cells* yang melekat pada sel-sel endotel mikrovaskuler pada manusia (HMVECs). Dalam kesimpulannya, BDNF dapat mengurangi proses inflamasi melalui penurunan rekrutmen neutrofil oleh regulasi ekspresi ICAM-1. Studi lainnya yang menunjukkan bahwa inhibisi pada NSE akan menurunkan sitokin/kemokin inflamasi, menghambat aktivasi MMP-9, modulasi hormon

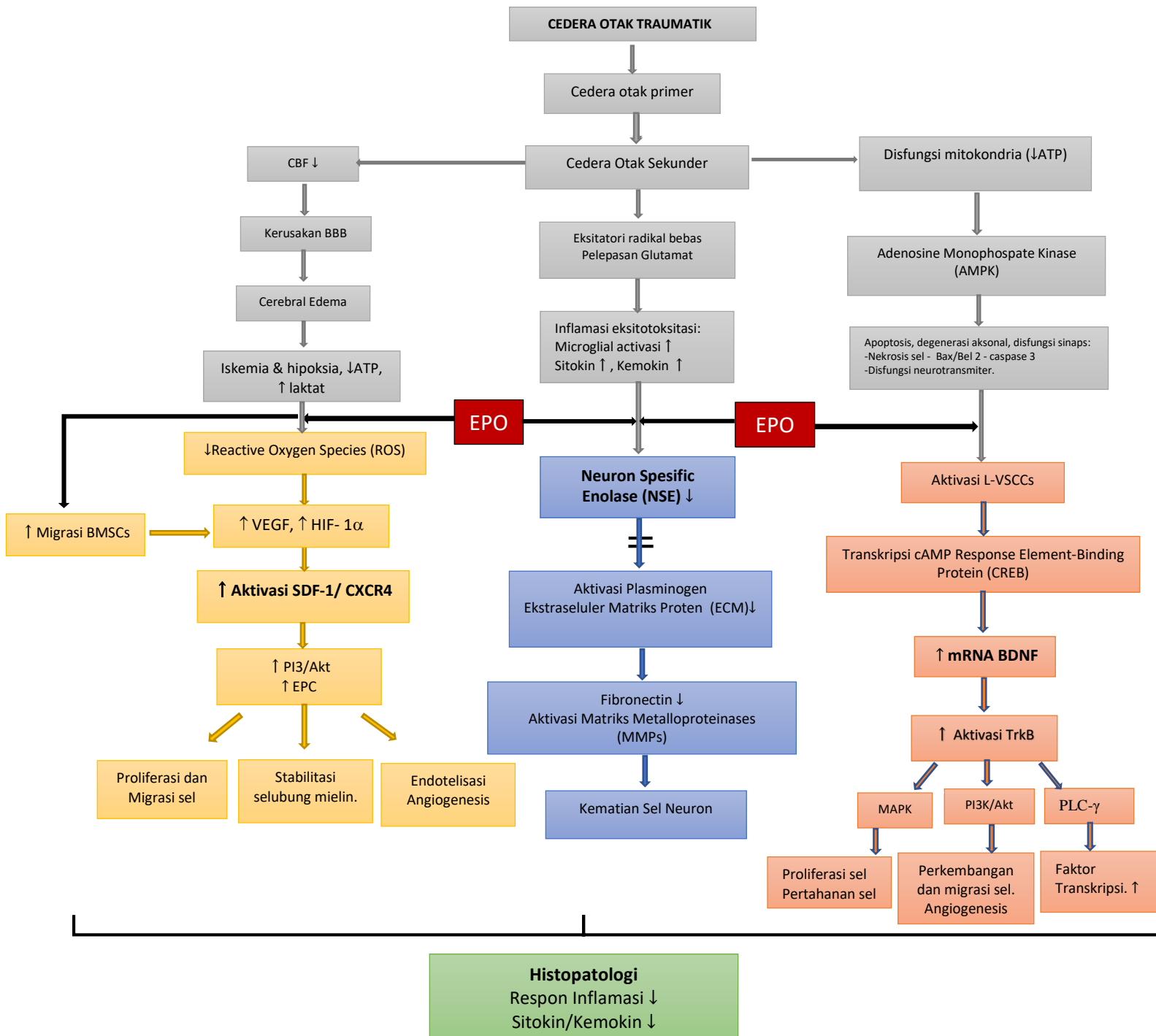
metabolik, dan mengurangi gliosis pasca cedera cervical (Policyn R, et al. 2017; Haque, et al. 2017).

SDF-1 adalah kemokin yang memediasi mobilisasi dan migrasi sel induk hematopoietik leukosit (Aiuti et al. 1997). SDF-1 secara alami diekspresikan dalam sumsum tulang dan bertindak sebagai faktor retensi untuk neutrofil. Selama peradangan, konsentrasi SDF-1 di sumsum tulang mengalami penurunan dan PMN kemudian memasuki sirkulasi secara signifikan bermigrasi ke tempat peradangan (Konrad FM et al. 2014). Hal ini sejalan dengan penelitian Sun W et al yang menyatakan bahwa SDF-1 menekan respon inflamasi dengan menghambat ekspresi sitokin proinflamasi, seperti TNF-a, IL-1b, dan IL-6.

# BAB III

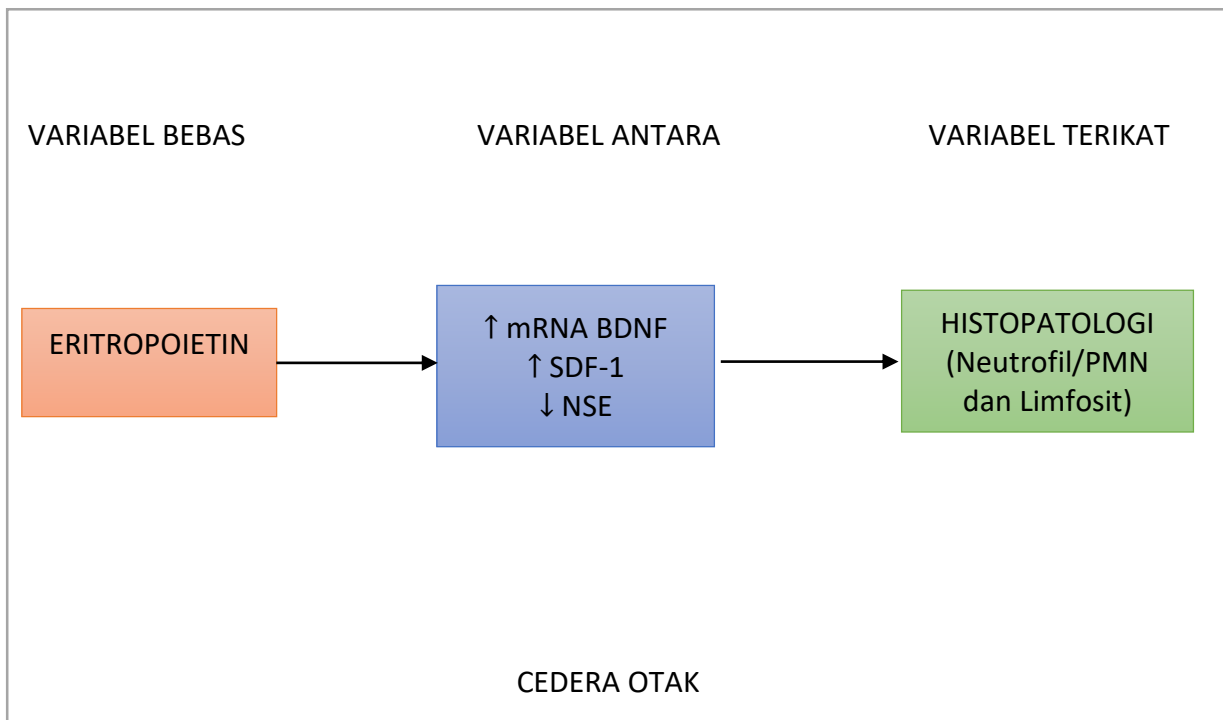
## KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP

### 1. Kerangka Teori



Cedera otak traumatik akan menimbulkan cedera otak primer yang bisa berlanjut menjadi cedera otak sekunder, yang memulai beberapa kaskade neuroinflamasi yang pada akhirnya akan menyebabkan kerusakan sampai kematian neuron. Pemberian EPO diharapkan dapat meningkatkan aktivasi L-VCCs untuk meningkatkan ekspresi mRNA BDNF, menurunkan ROS dan meningkatkan migrasi BMSCs yang akan meningkatkan VEGF dan HIF-1 sehingga terjadi aktivasi dan peningkatan kadar SDF-1, serta inhibisi pelepasan radikal bebas dan glutamat sehingga mencegah pelepasan NSE untuk mencegah kerusakan neuron. Efek terapi EPO diharapkan dapat memberikan gambaran penurunan respon inflamasi dengan penurunan sitokin/kemokin pada gambaran histopatologi.

## 2. Kerangka Konsep



### **3. Hipotesis**

1. Pemberian EPO berperan dalam meningkatkan ekspresi mRNA BDNF pada serum hewan coba yang mengalami cedera otak.
2. Pemberian EPO berperan dalam meningkatkan kadar SDF-1 pada serum hewan coba yang mengalami cedera otak.
3. Pemberian EPO berperan dalam menurunkan kadar NSE pada serum hewan coba yang mengalami cedera otak.
4. Pemberian EPO berperan dalam menurunkan kadar leukosit pada histopatologi hewan coba yang mengalami cedera otak.

### **4. Defenisi Operasional Penelitian**

Cedera otak adalah perlukaan pada jaringan otak akibat trauma dari luar yang menyebabkan terjadinya defisit neurologis. Dalam penelitian ini, perlakuan hewan coba dengan dijatuhkan beban seberat 20 gram dari ketinggian 20 cm.

Eritropoetin (EPO) adalah suatu hormon glikoprotein berukuran 30,4 kDa yang merupakan regulator utama produksi sel darah merah sebagai respons eritropoetik akibat penurunan oksigenasi jaringan. Dalam penelitian ini digunakan sediaan human recombinant erythropoietin (rhEPO) yang diberikan dengan dosis tunggal 30.000 U/kg secara subkutan.

mRNA BDNF adalah sejenis protein yang merupakan bagian dari neurotropin dan merupakan keluarga dari Nerve Growth Factor. Hasil yang diperoleh melalui sampel serum kemudian diukur dengan metode real time quantitative PCR (RT PCR).



Hasilnya akan dilaporkan sebagai relative fold expression yang dibandingkan dengan ekspresi GAPDH sebagai housekeeping gene.

SDF-1 adalah bagian dari CXC [juga dikenal sebagai C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12)] yang diekspresikan oleh berbagai jenis sel. Kadar SDF-1 serum yang diukur dengan metode sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) menggunakan kit rat SDF-1 immunoassay nomor katalog LS-F21608 dan diinterpretasikan dalam satuan ng/ml.

NSE adalah enzim untuk metabolisme energi dan terdapat dalam sitoplasma sel. Enolase adalah salah satu enzim dari jalur glikolitik untuk mengubah glukosa menjadi piruvat. Kadar NSE serum yang diukur dengan metode sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) menggunakan kit NSE immunoassay nomor katalog LS-F5577 dan diinterpretasikan dalam satuan ng/ml.

Histopatologi adalah hasil pemeriksaan jaringan otak hewan coba yang diperiksa di Laboratorium Patologi Anatomi (PA) setelah perlakuan. Hasil yang diperoleh adalah gambaran jaringan otak dan hitung jumlah sel neutrofil (PMN) dan sel limfosit per lapangan pandang.