

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Cedera medula spinalis adalah lesi traumatik pada elemen saraf di dalam kanalis spinalis, yaitu medula spinalis dan kauda ekuina, yang mengakibatkan gangguan motorik dan/atau sensorik sementara atau permanen. Terlepas dari kemajuan besar dalam kedokteran, cedera tulang belakang dianggap sebagai penyakit yang tidak dapat disembuhkan, dengan konsekuensi fisik dan psikososial yang merugikan bagi pasien dan staf medis.

Insiden cedera tulang belakang adalah 15-40 per juta orang di seluruh dunia, dengan sekitar 15.000 kasus baru per tahun di Amerika Utara. Di Asia, insiden cedera tulang belakang berkisar antara 12,6-61,6 per juta penduduk. Taiwan memiliki insiden tertinggi pada 61,6 per juta penduduk, yang lebih dari lima kali lebih tinggi dari insiden terendah di Anatolia, Turki. Usia rata-rata berkisar antara 26,8 hingga 56,6 tahun. Pria berisiko lebih tinggi daripada wanita. Namun, tingkat cedera baru di kalangan wanita sedikit meningkat. Di Taiwan, rasio jenis kelamin adalah 4,9:1 pada 1978-1981 dan 2,75:1 pada 2002-2003. Tren serupa diamati di



1, di mana tingkat prevalensi laki-laki 11,1 kali lebih tinggi antara n 1991, tetapi hanya 5,6 kali lebih tinggi antara 1989 dan 1994. an penyebab utama. Sebuah studi di Afghanistan menemukan

bahwa cedera perang telah melampaui kecelakaan mobil, dengan jatuh sebagai penyebab utama cedera.

Cedera medula spinalis biasanya terjadi pada area yang paling banyak bergerak, seperti leher dan regio torakolumbal. Di segmen servikal, 25% dari semua cedera terjadi di tulang belakang leher bagian atas (C1 - C2) dan sisanya 75% terjadi di daerah subaksial (C3 - C7). Diperkirakan bahwa trauma multipel terjadi pada 4% sampai 20% dari semua kasus. Di daerah torakolumbal, distribusi cedera anatomis paling sering terjadi di regio peralihan torakolumbal, dengan L1 terhitung 16% dari semua cedera. Bentuk cedera primer yang paling umum adalah kompresi berkelanjutan, yang biasanya timbul dari *burst fracture*, atau fraktur dislokasi, di mana fragmen tulang menekan medula spinalis.

Pada pertengahan abad kedua puluh, kemajuan besar dibuat di bidang bedah tulang belakang. Penggunaan dekompresi medula spinalis dan fiksasi internal untuk menekan medula spinalis bermanfaat dalam mengurangi cedera sekunder dan segera menciptakan stabilitas tulang belakang, memungkinkan mobilisasi lebih cepat dan rawat inap lebih pendek. Namun, pemulihan fungsi medula spinalis setelah trauma tetap menjadi tantangan utama.

Sampai saat ini, penggunaan kortikosteroid seperti *methylprednisolone sodium succinate* (MPSS), waktu intervensi bedah optimal, jenis dan waktu profilaksis antikoagulan, peranan dari



magnetic resonance imaging (MRI), serta jenis dan waktu rehabilitasi masih menjadi perdebatan.

Untuk cedera medula spinalis, kompresi sementara, kompresi berkelanjutan, distraksi, dan laserasi adalah mekanisme yang mungkin terjadi. Melalui mekanisme ini, kekuatan yang dihasilkan selama trauma primer dapat menyebabkan kerusakan sekunder atau lebih lanjut pada medula spinalis. Ini membutuhkan manajemen yang tepat yang bertujuan untuk mencegah kerusakan sekuensial atau tidak langsung. Dekompresi dini dan manajemen pencegahan cedera sekunder adalah perawatan yang ideal untuk mencegah kerusakan lebih lanjut pada cedera kompresi parah.

Menurut *Spinal Trauma Research Group*, 24 jam pertama adalah waktu terbaik untuk menerapkan dekompresi yang bersifat neuroprotektif. Namun, hingga saat ini, tidak ada pedoman bedah yang secara ketat mempertimbangkan manfaat operasi yang dilakukan pada tahap awal atau akhir cedera tulang belakang. Pedoman sebelumnya tentang waktu operasi menunjukkan bahwa ada bukti kelas II di mana operasi pertama dapat dilakukan dengan aman dalam waktu kurang dari 72 jam pada pasien cedera tulang belakang dengan hemodinamik stabil. Dekompresi darurat direkomendasikan untuk pasien dengan tetraplegia tidak lengkap, dan dekompresi darurat direkomendasikan untuk pasien dengan cedera tulang belakang dengan kerusakan neurologis.



ascular Endothelial Growth Factor VEGF) awalnya ditemukan pada 1983 sebagai *Vascular Permeability Factor* (VPF) dan berhasil

dikloning pada tahun 1989. VEGF adalah faktor kunci dalam angiogenesis. Banyak penelitian tentang aktivitas angiogenik VEGF telah diterbitkan dalam dekade terakhir. Bukti terbaru menunjukkan bahwa VEGF juga secara langsung memengaruhi berbagai neuron, termasuk neuron, sel Schwann, astrosit, sel induk saraf, dan mikroglia.

VEGF merangsang pertumbuhan aksonal dan meningkatkan kelangsungan hidup neuron dan sel satelit pada dorsal root ganglia. Di jaringan otak tengah, VEGF mendorong pertumbuhan dan kelangsungan hidup dopaminergik dan astrosit. Selain itu, VEGF melindungi sel saraf hipokampus dari glutamat yang sangat beracun dan kerusakan hipoksia. Oleh karena itu, VEGF memberikan efek neurotropik langsung pada berbagai jenis neuron in vitro.

Hipoksia yang terjadi pada cedera medula spinalis merupakan stimulus penting untuk ekspresi VEGF. Peningkatan kadar protein VEGF dalam kondisi hipoksia disebabkan oleh regulasi tingkat transkripsi translasi. Faktor transkripsi yang diinduksi hipoksia (HIFs) mengikat elemen responsif hipoksia (HREs) dari promotor VEGF, sehingga mengatur transkripsi VEGF selama hipoksia.

Selain peran kanoniknya dalam sistem kardiovaskular, VEGF juga telah terbukti meningkatkan perlindungan saraf, panduan aksonal, kelangsungan hidup dan migrasi sel Schwann, dan proliferasi astrosit,

dan sel induk saraf. VEGF memiliki potensi terapeutik yang tinggi untuk mempromosikan revaskularisasi medula spinalis, perlindungan saraf,



proliferasi sel dan regenerasi jaringan, dan pada akhirnya pemulihan fungsional, terutama pada cedera tulang belakang. Dalam penelitian cedera tulang belakang, VEGF telah menunjukkan banyak peran, termasuk mempromosikan angiogenesis, mengurangi jaringan parut glial, meningkatkan neurogenesis pada lesi, meningkatkan oligodendrogenesis dan meningkatkan integritas mielin, mengurangi volume lesi jaringan, dan meningkatkan fungsi alat gerak. Oleh karena itu, VEGF tampaknya menjadi pilihan terapi yang menjanjikan untuk memperbaiki kerusakan sistem saraf yang disebabkan oleh trauma dan penyakit degeneratif.

Neuron-specific enolase (NSE) adalah enzim glikolitik yang ditemukan di sel saraf dan jaringan neuroendokrin. Peningkatan NSE dapat meningkatkan degradasi matriks ekstraseluler, proliferasi sel glial inflamasi, dan remodeling aktin, sehingga memengaruhi migrasi makrofag dan mikroglia ke tempat cedera dan menyebabkan kematian sel. Oleh karena itu, NSE dapat menjadi penanda cedera saraf yang andal, kuantitatif dan spesifik.

Kematian neuron pada medula spinalis dikaitkan dengan peningkatan NSE, yang juga diketahui terlibat dalam patogenesis cedera otak hipoksik-iskemik. Oleh karena itu, NSE sekarang dianggap sebagai biomarker untuk cedera otak iskemik dan baru-baru ini diusulkan sebagai biomarker untuk cedera otak traumatik, stroke, ensefalopati anoksik pasca

tung, dan cedera tulang belakang.



Studi terbaru menemukan bahwa tingkat ekspresi jaringan NSE meningkat setelah cedera tulang belakang akut dan penghambatan ekspresi dan aktivitas NSE mengurangi cedera sekunder setelah cedera tulang belakang. Selanjutnya, penghambatan NSE telah terbukti mengurangi sitokin inflamasi dan mengurangi gliosis setelah cedera tulang belakang melalui berbagai jalur seluler dan metabolisme.

Berbagai macam terapi telah dilakukan dalam penatalaksanaan cedera medula spinalis, namun seringkali masih belum memberikan hasil yang maksimal. Dalam berbagai penelitian yang telah dilakukan, penerapan sel punca *umbilical cord derived mesenchymal stem cell* (UC-MSC) yang diambil dari *Wharton's jelly* dari tali pusat, telah terbukti memiliki hasil yang menjanjikan karena kemampuannya untuk mengurangi peradangan, melintasi sawar darah otak (BBB), serta memberi sinyal pada sel lain atau dirinya sendiri untuk berdiferensiasi menjadi sel saraf. Beberapa penelitian lainnya berupa uji pra-klinis dan uji klinis menunjukkan bahwa aplikasi UC-MSC pada cedera medula spinalis telah berhasil menginduksi regenerasi jaringan yang rusak akibat cedera dan mampu meningkatkan regulasi faktor neurotropik (Cruz et al, 2020).

Conditioned medium (secretome) adalah medium di mana *stem cell* dikembangbiakkan. Medium ini mengandung protein, lemak, asam nukleat, vesikel ekstraseluler (EV) atau mikrovesikel (MVs). Penelitian *in vitro*

nakan secretome yang dilakukan pada hewan coba menunjukkan peningkatan viabilitas sel, proliferasi sel, migrasi sel yang signifikan,



serta terjadi penurunan sel inflamasi. Secretome dapat diproduksi dalam jumlah yang besar dan disimpan dalam waktu yang lama tanpa menghilangkan kemampuannya dalam meregenerasi. Meskipun, tanpa menggunakan agen cryopreservatif yang beracun, dan dapat dimodifikasi untuk efek tertentu. Oleh karena availabilitasnya yang tinggi dan harganya yang lebih terjangkau, secretome dapat menjadi pilihan terapi yang menjanjikan untuk diberikan pada fase akut medula spinalis.

Sebagai pembanding terapi potensial, digunakan MLC901 (NeuroAiD™ II), suatu formulasi *neurorestoratif* berbasis kombinasi ekstrak herbal dan hewani, yang terdiri dari komponen utama seperti *Radix Astragali*, *Radix Salviae Miltiorrhizae*, dan *Cornu Saigae Tataricae*. Secara farmakologis, MLC901 diketahui memiliki efek *neuroprotektif* dan merangsang *neuroplastisitas*, dengan kemampuan meningkatkan regenerasi saraf. Efikasinya telah dibuktikan pada pasien stroke iskemik, dengan hasil perbaikan neurologis yang signifikan, serta dieksplorasi pula pada kondisi lain seperti cedera otak, demensia, dan cedera medula spinalis. Oleh karena itu, MLC901 digunakan sebagai kontrol positif untuk dibandingkan dengan efek pemberian secretome UC-MSD.

Kurangnya penelitian secretome UC-MSD tentang cedera medula spinalis, terutama yang membahas mekanisme patofisiologis pada tingkat biomolekuler, potensi VEGF sebagai agen neuroprotektif, dan penggunaan

SE sebagai penanda cedera medula spinalis, sehingga penulis
sudah untuk melakukan penelitian dengan judul Pengaruh Pemberian



Secretome UC-MSC Terhadap Ekspresi mRNA Gen Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Kadar Neuron Specific Enolase (NSE), Histopatologi Dan Fungsi Lokomotor Pada Animal Model Cedera Medula Spinalis.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, maka masalah penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Apakah peran secretome UC-MSC pada perubahan ekspresi mRNA gen VEGF pada serum hewan coba yang mengalami cedera medula spinalis?
2. Apakah peran secretome UC-MSC pada perubahan kadar NSE pada serum hewan coba yang mengalami cedera medula spinalis?
3. Apakah peran secretome UC-MSC pada perubahan gambaran histopatologis medula spinalis pada hewan coba yang mengalami cedera medula spinalis?
4. Apakah peran secretome UC-MSC pada perubahan fungsi lokomotor pada hewan coba yang mengalami cedera medula spinalis?
5. Bagaimana hubungan antara mRNA gen VEGF, dan kadar NSE dengan gambaran histopatologis dan fungsi lokomotor pada hewan coba yang diberi secretome UC-MSC?



1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui peran secretome UC-MSc pada perbaikan fungsi lokomotor dan gambaran histopatologis medula spinalis melalui ekspresi mRNA Gen VEGF, dan kadar NSE serum, pada hewan coba setelah cedera medula spinalis.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Diketuainya peran secretome UC-MSc pada perubahan ekspresi mRNA gen VEGF pada serum hewan coba yang mengalami cedera medula spinalis.
2. Diketuainya peran secretome UC-MSc pada perubahan kadar NSE pada serum hewan coba yang mengalami cedera medula spinalis.
3. Diketuainya peran secretome UC-MSc pada perubahan gambaran histopatologis medula spinalis pada hewan coba yang mengalami cedera medula spinalis.
4. Diketuainya peran secretome UC-MSc pada perubahan fungsi lokomotor pada hewan coba yang mengalami cedera medula spinalis.



5. Diketuinya hubungan antara mRNA gen VEGF, dan kadar NSE dengan gambaran histopatologis dan fungsi lokomotor pada hewan coba yang diberi secretome UC-MSD.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

1. Memberikan sumbangan bagi pengembangan ilmu pengetahuan bedah saraf dari sudut ilmu dasar dan klinis.
2. Menambah pemahaman tentang peranan intervensi CM UC-MSD terhadap gambaran histopatologis dan fungsi lokomotor pada pasien cedera medula spinalis.

1.4.2 Manfaat Klinis

1. Dapat digunakan sebagai modalitas terapi medikamentosa pasien cedera medula spinalis.
2. Dapat memperbaiki fungsi medula spinalis yang telah mengalami cedera.

1.4.3 Manfaat Masyarakat Luas

Membantu mempercepat proses pemulihan pasca cedera medula spinalis, sehingga dapat mengurangi biaya perawatan pasien cedera medula



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Cedera Medula Spinalis

2.1.1 Definisi Cedera Medula Spinalis

Medula spinalis terdiri dari jalur kompleks yang membawa informasi dan instruksi antara otak dan bagian tubuh lainnya. Beberapa jalur anatomi yang berbeda di dalam medula spinalis bertanggung jawab untuk mentransmisikan informasi spesifik. Traktus kortikospinalis bertanggung jawab untuk mentransmisikan informasi yang berkaitan dengan fungsi motorik, dan traktus spinotalamikus serta kolumna posterior merupakan jalur sensorik utama. Jalur sensorik ini memiliki jalur yang berbeda tergantung pada sensasi yang disampaikan. Kolumna posterior mentransmisikan informasi tentang getaran, sentuhan halus, dan proprioepsi, dan traktus spinotalamikus mentransmisikan rasa sakit, suhu, dan sensasi sentuhan kasar. Medula spinalis memanjang ke distal sebagai perpanjangan dari medula oblongata, meruncing membentuk konus medularis setinggi vertebra L2. Medula spinalis dilindungi oleh meningen dan vertebra. Neovaskularisasi medula spinalis berasal dari satu arteri spinalis anterior dan dua arteri spinalis posterior, dengan kontribusi tambahan dari arteri radikuler di berbagai titik di



ila spinalis, yang paling penting adalah bagian dua pertiga bawah medula asok oleh arteri Adamkiewicz. Sementara drainase vena medula spinalis kompleks pleksus vena tanpa katup.

Cedera medula spinalis adalah cedera pada medula spinalis yang mengakibatkan gangguan fungsi motorik, sensorik, otonom, dan refleks secara lengkap atau sebagian. Cedera medula spinalis tetap menjadi penyebab penting morbiditas dan mortalitas dalam masyarakat modern. Pada cedera medula spinalis, serabut saraf asendens yang membawa informasi sensorik dan serabut saraf desenden yang membawa informasi motorik rusak, menyebabkan disfungsi semua bagian tubuh yang mengalami cedera. Bahkan jika medula spinalis tidak lengkap, beberapa informasi ditransmisikan, tetapi sering terdistorsi, menyebabkan komplikasi neurologis tambahan seperti nyeri kronis.

Cedera pada medula spinalis dapat menyebabkan tetraplegia dan gangguan fungsional pada ekstremitas atas dan bawah. Cedera pada medula spinalis leher bagian atas dapat menyebabkan kelumpuhan diafragma dan sesak napas. Cedera pada medula spinalis toraks, konus, atau kauda ekuina dapat menyebabkan paraplegia inferior.

2.1.2 Klasifikasi Cedera Medula Spinalis

Klasifikasi cedera medula spinalis secara umum dibagi menjadi komplit dan inkomplit berdasarkan definisi "*sacral sparing*". Ini mengacu pada adanya fungsi sensorik dan motorik di sebagian besar segmen sakral kaudal sebagai akibat dari sentuhan ringan atau sensasi tusukan jarum pada dermatom S4 - S5 dan kontraksi volunter dari sfingter anal. Cedera lengkap didefinisikan sebagai tidak adanya "*sacral sparing*" sementara cedera inkomplit didefinisikan sebagai adanya "*sacral sparing*".



i American Spinal Cord Injury Association (ASIA) terbagi menjadi lima
gklasifikasikan tingkat keparahan cedera medula spinalis

nilangnya fungsi motorik dan sensorik di segmen sakral S4-S5.

- B. Inkomplit: sensorik masih berfungsi dengan baik, tetapi fungsi motorik terganggu sampai segmen S4-S5.
- C. Inkomplit: fungsi motorik terganggu di bawah level neurologis, tetapi otot motorik utama memiliki kekuatan <3.
- D. Inkomplit: fungsi motorik terganggu di bawah level neurologis, tetapi otot motorik utama memiliki kekuatan >3.
- E. Normal: motorik dan sensorik berfungsi dengan baik.

2.1.3 Patofisiologi Cedera Medula Spinalis

Studi langsung mengenai patofisiologi cedera medula spinalis pada jaringan post-mortem manusia tidak memungkinkan maka model hewan dikembangkan sebagai gantinya, dan hampir semua pemahaman rinci tentang patofisiologi cedera medula spinalis telah diperoleh melalui penelitian pada hewan. Setiap model harus relevan dengan patofisiologi cedera medula spinalis manusia, termasuk reproduktivitas dan kemampuan beradaptasi dengan mekanisme cedera yang berbeda. Oleh karena itu, model hewan adalah pilihan utama karena kompatibel dengan cedera medula spinalis manusia dalam hal MRI resolusi tinggi dan elektrofisiologis.

Perkembangan signifikan dalam bagaimana kita dapat menafsirkan cedera medula spinalis adalah peristiwa kerusakan jaringan yang berkepanjangan setelah cedera medula spinalis. Oleh karena itu patofisiologi cedera medula spinalis terdiri dari



primer dan sekunder. Fase primer mencakup cedera mekanis awal yang langsung atau dislokasi vertebrae secara langsung menghasilkan gaya pada jaringan yang kemudian mengganggu akson, vena, dan membran sel. Cedera

sekunder mengacu pada kerusakan lanjutan yang terjadi setelah cedera primer dan dapat berlanjut untuk waktu yang cukup lama atau bahkan bertahun-tahun. Cedera sekunder termasuk kerusakan pembuluh darah, edema, iskemia, eksitotoksisitas, gangguan elektrolit, terbentuknya radikal bebas, peradangan dan kematian sel. Meskipun defisit neurologis muncul sesaat setelah cedera primer, cedera sekunder dapat menyebabkan kerusakan jaringan yang lebih berat.

2.1.4 Cedera Medula Spinalis Primer

Cedera medula spinalis primer dihasilkan dari gaya yang ditimbulkan pada saat cedera dan merupakan penentu utama keseriusan cedera medula spinalis. Cedera medula spinalis umumnya efek traumatis yang terjadi secara tidak terduga pada vertebra yang menyebabkan fraktur dan dislokasi. Empat sistem merek dagang mendasar dari cedera esensial telah dibedakan yang meliputi: (1) impak dengan tekanan terus-menerus; (2) impak dengan tekanan transien; (3) distraksi; (4) laserasi atau transeksi.

Jenis cedera primer yang paling dikenal adalah pengaruh dengan tekanan terus-menerus, yang biasanya terjadi pada fraktur tipe *burst* dengan bagian patahan tulang yang mencederai medula spinalis atau melalui fraktur-dislokasi. Impak dengan tekanan transien lebih jarang terjadi namun paling sering terjadi pada cedera hiperekstensi. Cedera distraksi terjadi ketika dua vertebra tertarik secara terpisah sehingga segmen vertebra meregang dan robek. Cedera laserasi atau transeksi dapat terjadi melalui



enjata tajam, dislokasi berat, atau lepasnya fragmen yang tajam dari in dapat berupa luka ringan hingga berat.

2.1.5 Cedera Medula Spinalis Sekunder

Masa cedera medula spinalis yang memberat dan berkelanjutan terjadi setelah fase cedera primer. Permasalahan pada proses seluler yang terkait ini dapat menyebabkan kerusakan sel dan aksonal yang tertunda, kondisi ini dapat dijadikan target bagi tujuan terapi ke depannya. Selain itu, komponen ini juga terlihat pada berbagai jenis cedera sistem saraf pusat (SSP), seperti cedera medula spinalis dan stroke. Proses cedera medula spinalis sekunder ini melibatkan apoptosis, iskemia, kerusakan sel akibat permasalahan ion dan eksitotoksisitas, peradangan saraf, kerusakan mitokondria, dan kerusakan sel oksidatif.

2.1.5.1 Kematian Sel

Ada dua jenis utama kematian sel: nekrosis dan apoptosis. Kedua jenis ini dapat terjadi pada cedera medula spinalis. Studi terkini juga berfokus pada perubahan protein autofagi, ekspresi protein, dan kontribusi autofagi setelah cedera medula spinalis.

Apoptosis pada umumnya dicirikan sebagai kematian sel yang telah direncanakan, berbeda dari nekrosis yang memerlukan energi dan melibatkan pembentukan protein baru. Apoptosis penting dalam menghilangkan sel-sel yang tidak diinginkan selama pertumbuhan, dan dalam mengatur sistem kekebalan tubuh, dan seluruh sel tampaknya memiliki kemampuan penting untuk memprogram kematian dengan penghancuran DNA secara terkendali.



Dalam nekrosis, proses dimulai dengan terjadinya edema dari retikulum
E) dan mitokondria, menghasilkan *bleb* yang muncul di permukaan sel
dan pecahnya membran plasma, organel dan isi sel. Sedangkan pada

apoptosis, proses dimulai dari pemadatan kromatin, pembentukan membran, kemudian terbentuknya fragmen-fragmen sel di mana setiap fragmen mengandung organel dan dibungkus oleh membran dan akan difagositosis oleh sel-sel sekitarnya atau makrofag.

Apoptosis dapat dipicu oleh sinyal seluler interna atau eksterna dan merupakan jalur akhir dari banyaknya proses cedera medula spinalis sekunder. Jalur ekstrinsik dapat diaktifkan ketika *death ligan* seperti Fas/CD95 dan *tumor necrosis factor α* (TNF- α) berikatan dengan reseptor “*death*” mereka. Setelah pengikatan ligan, protein adaptor seperti *Fas-associated protein with death domain* (FADD) terbentuk, akan mengarah ke aktivasi *caspase-8*. Jalur intrinsik dimulai oleh proses patologis intraseluler seperti kerusakan DNA dan peningkatan kadar protein pro apoptosis seperti Bax dan Bak (protein keluarga Bcl-2). Peristiwa ini memicu pelepasan sitokrom c dari mitokondria, yang kemudian mengikat dan mengaktifkan *Apoptic peptidase activating factor-1* (Apaf-1), yang selanjutnya dapat mengikat dan mengaktifkan *caspase-9*. *Caspase-8* aktif atau *caspase-9* dapat membelah *caspase-3*, yang memicu apoptosis. Jalur ekstrinsik terhubung ke jalur intrinsik melalui perantara protein Bid, yang menginduksi pelepasan protein mitokondria yang bergantung pada Bax/Bak. Untuk melanjutkan apoptosis, *Inhibitor of Apoptosis proteins* (IAPs) harus dinonaktifkan. Inaktivasi ini dicapai dengan pelepasan protein Smac/DIABLO (*Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis Binding Protein*) dari mitokondria .

Menghambat apoptosis adalah tujuan terapi yang bermanfaat. Studi terkini telah menunjukkan viabilitas yang diharapkan dari modifikasi apoptosis yang diperantarai Fas menggunakan sistem in vitro. Pemeriksaan post-mortem pada model hewan coba menemukan bahwa apoptosis yang diperantarai dengan



oleh Fas berperan dalam apoptosis oligodendrosit dan proses peradangan pada fase akut dan subakut dari cedera medula spinalis. Tikus yang mengalami defisiensi Fas menunjukkan penurunan yang besar dalam proses apoptosis dan reaksi peradangan sebagaimana dikonfirmasi oleh penetrasi makrofag dan ekspresi sitokin yang berkurang setelah cedera medula spinalis. Tikus yang mengalami kekurangan Fas menunjukkan pemulihan yang cepat setelah mengalami cedera medula spinalis sehingga rendahnya Fas berpotensi sebagai anti-apoptosis pada cedera medula spinalis.

Dalam apoptosis sel-sel mengecil dan akhirnya difagositosis tanpa melalui reaksi peradangan. Peristiwa penundaan apoptosis di area yang lebih jauh dari lokasi cedera sebagian besar memengaruhi oligodendrosit. Pada tikus dengan cedera medula spinalis, apoptosis terjadi segera 4 jam setelah cedera dan mencapai puncak pada 7 hari. Di lokasi cedera, sebagian besar oligodendrosit hilang dalam rentang 7 hari setelah cedera medula spinalis. Mikroglia dan astrosit juga mengalami apoptosis. Uniknya, apoptosis yang terjadi pada cedera medula spinalis pada model tikus, monyet, dan manusia diprediksi karena kerusakan aksonal.

Degenerasi oligodendrosit karena apoptosis telah ditunjukkan tidak hanya di lokasi cedera namun juga distal dari titik fokus cedera, mendorong terjadinya demielinasi akson yang masih sehat dan menurunkan kemampuan neuron. Demielinasi menekan transmisi saraf dengan mengganggu konduksi saltatorial dan selanjutnya memodifikasi penyebaran dan kemampuan dari saluran ion. Pemulihan saluran ion dan kemampuan neuron dapat dibangun kembali setelah remielinasi dan beberapa akson medula spinalis

untuk memfasilitasi, sehingga usaha untuk melindungi oligodendrosit atau



memperluas remielinasi pada cedera medula spinalis dapat memberikan opsi terapi yang menjanjikan.

Nekrosis membuat sel saraf dan sel glial mengalami kematian karena kerusakan mekanis pada saat cedera primer yang berlanjut ke fase cedera yang akut dan subakut. Nekrosis terjadi karena banyak hal termasuk akumulasi berbagai macam komponen toksik, eksitotoksisitas glutamat dan ketidakteraturan ion, deplesi ATP, dan terlepasnya sitokin proinflamasi oleh neutrofil dan limfosit hingga terbentuknya radikal bebas.

Kematian sel yang disebabkan oleh hipoksia dan eksitotoksisitas telah diteliti ekstensif secara *in vitro*, sekarang telah diketahui bahwa hal ini dapat menyebabkan kematian sel, baik oleh nekrosis, apoptosis, interaksi antara Ca^{2+} intraseluler, radikal bebas, dan mekanisme proteksi sel sangat kompleks.

2.1.5.2 Abnormalitas Vaskular

Iskemia atau kekurangan suplai oksigen untuk memenuhi kebutuhan metabolik dapat disebabkan oleh terganggunya vaskular, hipotensi dari syok hemoragik atau neurogenik, dan masalah pernapasan, dan umumnya dapat terjadi setelah cedera medula spinalis. Hipoksia sistemik muncul cukup sering pada pasien dengan cedera medula spinalis karena terjadi permasalahan pada otot pernapasan. Adanya cedera pada dada juga dapat menyebabkan hipoksia dengan menghambat pertukaran gas di paru-paru. Oleh karena itu, pada akhirnya, ketiadaan oksigen mengganggu kapasitas rantai transpor



menghantarkan adenosin trifosfat (ATP). Hasil yang signifikan dari energi seluler adalah rusaknya pompa natrium-kalium yang memerlukan abkan edema sitotoksik yang memengaruhi neuron dan glia. Edema

aksonal menyebabkan potensial aksi mengalami hambatan. Pernapasan tingkat seluler yang melemah juga menyebabkan asidosis, yang menghambat kemampuan berbagai zat kimia intraseluler dan pada akhirnya dapat mendorong kerusakan sel.

Permasalahan mekanis mikrovaskular menyebabkan petekie dan sumbatan intravaskular, bersama dengan vasospasme dan edema di area cedera, memicu hipoperfusi dan iskemia di sekitarnya. Ini adalah karakteristik mikrovaskular dan biasanya pembuluh darah besar, misalnya, arteri spinalis anterior masih berfungsi baik. Pemeriksaan post-mortem pada manusia telah menunjukkan bahwa perfusi vaskular jauh lebih buruk pada *grey matter* daripada *white matter*, yang mungkin berhubungan dengan gangguan atau sumbatan jaringan arteri sulkal yang menyediakan sebagian besar *grey matter* secara difus. Asupan metabolik yang tinggi dari neuron membuat *grey matter* sangat rentan terhadap cedera iskemik, yang dapat diperburuk oleh terganggunya sistem autoregulasi yang biasanya memberikan kontrol hemodinamik mikrovaskular di dalam medula spinalis. Terganggunya autoregulasi, yang biasanya menjaga hemodinamik medula spinalis secara terus menerus selama perubahan tekanan darah sistolik antara sekitar 50 dan 130 mmHg, mengakibatkan medula spinalis rentan terhadap tekanan arteri sistemik. Lebih beratnya, setelah masa iskemia ini, medula spinalis mungkin mengalami masa reperfusi yang menyebabkan memburuknya cedera sekunder yang disebabkan oleh radikal bebas. Edema di area cedera timbul dan berkembang ke arah rostral dan caudal secara bersamaan dengan nekrosis pada titik fokus lesi dalam 24 - 48 jam setelah cedera.



ksisitas dan Disregulasi Ion

Eksitotoksitas adalah keadaan patologis yang disebabkan oleh penumpukan glutamat berlebihan atau dalam jangka waktu yang lama dan sering mendorong terjadinya kematian sel saraf. Meningkatnya konsentrasi ekstraseluler asam amino eksitatorik ke tingkat neurotoksik terjadi tidak lama setelah cedera medula spinalis. Tingkat asam amino eksitatori ekstraseluler seperti glutamat dan aspartat meningkat dengan cepat sebagai akibat dari ekspresinya dari sel terganggu atau terminal saraf presinaptik dan terganggunya dari transporter dependen energi yang biasanya menghilangkannya. Eksitotoksitas ini menyebabkan masuknya Na^+ dan Ca^{2+} melalui saluran N-metil-D-aspartate (NMDA) dan α -amino-3 hydroxy-5-methyl- isoxazolepropionate (AMPA)/*kainate channels* sehingga dapat terjadi kematian sel secara apoptosis atau nekrosis. Oleh sebab itu, penghambat reseptor NMDA telah dinilai secara luas sebagai pengobatan yang bermanfaat pada cedera medula spinalis dan masalah neurodegeneratif lainnya.

Meningkatnya influks Ca^{2+} yang dapat mengganggu kanal Na^+ pada sel, mengakibatkan toksisitas ionik yang memulai apoptosis sel saraf dan kematian nekrotik. Selain itu, peningkatan kadar kalsium menginisiasi berbagai protein kinase dan fosfolipase, yang menyebabkan degradasi protein dan kerusakan oksidatif. Proses ini juga terjadi pada *white matter* dan menyebabkan kerusakan pada astrosit, oligodendrosit dan mielin. Efek glutamat tidak hanya terbatas pada neuron karena reseptornya banyak diekspresikan pada permukaan semua glia dan sel endotel. Astrosit juga dapat



tamat berlebih secara ekstraseluler setelah peningkatan kadar Ca^{2+} . Kapasitas astrosit terkativasi yang berkurang untuk mengambil kembali yang interstisial karena peroksidasi lipid menyebabkan penumpukan

glutamat tambahan. Memanfaatkan mikrodialisis, peningkatan kadar glutamat telah diidentifikasi dalam *whiter matter* pada cedera tahap akut. Ekspansi glutamat diidentifikasi selama 20-30 menit awal setelah cedera medula spinalis dan kembali ke tingkat basal setelah satu jam.

Penumpukan Ca^{2+} pada mitokondria juga menekan proses respirasi mitokondria dan mengakibatkan deplesi ATP yang menyebabkan tidak bekerjanya Na^+/K^+ ATPase dan meningkatkan Na^+ intraseluler. Selanjutnya, kelebihan Na^+ intraseluler membalikkan proses pertukaran $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ yang mengakibatkan semakin banyaknya Ca^{2+} yang masuk. Depolarisasi seluler mengaktifkan saluran tegangan gerbang kanal Na^+ yang menghasilkan masuknya Cl^- dan air ke dalam sel bersamaan dengan masuknya Na^+ sehingga menyebabkan edema. Peningkatan kadar Na mengakibatkan aktivitas yang meningkat dari Na^+/H^+ *exchanger* sehingga kadar H^+ intraseluler meningkat. Permeabilitas membran terhadap Ca^{2+} meningkat akibat asidosis intraseluler sehingga memperburuk ketidakseimbangan ionik. Akson lebih rentan terhadap kerusakan yang disebabkan oleh ketidakseimbangan ionik karena konsentrasi tegangan gerbang kanal Na^+ di *nodus ranvier*. Banyak bukti menunjukkan bahwa pemberian penghambat kanal Na^+ seperti Riluzole memperkecil kerusakan jaringan dan meningkatkan pemulihan fungsional pada cedera medula spinalis.



Bebas dan Peroksidasi Lipid

Molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan yang membuatnya dapat bereaksi terhadap lipid, protein, dan DNA dengan sangat aktif disebut dengan radikal bebas. Molekul oksigen (O_2) sendiri memiliki dua elektron yang tidak berpasangan. Penambahan satu elektron ke oksigen menghasilkan superoksida, penambahan dua elektron ke oksigen menghasilkan hidrogen peroksida dan tiga elektron menghasilkan radikal hidroksil yang sangat reaktif. Radikal bebas lain yang sangat reaktif, peroksinitrit ($ONOO^-$), dibentuk oleh interaksi superoksida dengan *nitric oxide*.

Kerusakan oksidatif dapat berlangsung selama lima hari. Berkurangnya level antioksidan dan meningkatnya biomarker dari stres oksidatif dapat ditemukan dalam darah dan urin pada 1, 3, dan setahun setelah cedera. Radikal bebas dapat menyebabkan proses oksidasi berkelanjutan di membran sel (peroksidasi lipid), di mana proses oksidasi secara matematis memproduksi lebih banyak radikal bebas yang dapat menyebarkan respons ke seluruh permukaan sel. Radikal bebas juga menyebabkan penurunan aliran darah ke medula spinalis, menyebabkan edema dan reaksi peradangan.

Pembentukan ROS dalam keadaan fisiologis sangat penting untuk reaksi redoks pada sel normal. Mitokondria adalah sumber utama ROS pada sel karena mitokondria mengkonsumsi sekitar 90% oksigen yang digunakan oleh sel selama fosforilasi oksidatif dalam keadaan fisiologis. Kerusakan mitokondria menyebabkan pembentukan ROS lebih lanjut. Perubahan struktural dan fungsional pada mitokondria telah ditemukan pada



cedera medula spinalis menyebabkan terlepasnya asam amino eksitatori homeostasis Ca^{2+} , yang selanjutnya menyebabkan kerusakan pembentukan ROS dan lebih lanjut mendorong kematian sel saraf.

Sel fagosit, misalnya, neutrofil dan makrofag juga menambah perkembangan ROS. Setelah terjadinya cedera medula spinalis, sel fagosit menunjukkan ekspansi yang signifikan dalam pemanfaatan oksigen dan pembentukan superoksida dari nikotinamida terkait dengan membran nikotinamida adenin dinukleotida fosfat oksidase. Kompleks enzim tersebut menukar elektron dari nikotinamida adenin dinukleotida fosfat oksidase di sitosol membran ke partikel oksigen di sisi berlawanan dari membran yang menghasilkan superoksida ekstraseluler. Sel-sel peradangan akan mengeluarkan mediator inflamasi, termasuk Tumor Necrosis Factor (TNF- α), interferon, dan interleukin. ROS yang dikeluarkan oleh sel peradangan dapat berbahaya seperti yang sudah disebut sebelumnya. Reaksi peradangan yang muncul setelah cedera medula spinalis dapat menjadi tujuan terapi yang bermanfaat ke depannya.

Peranan ROS dalam proses fisiologis berupa pensinyalan sel. Namun, pembentukan ROS yang berlebihan dalam kondisi patofisiologis, termasuk cedera medula spinalis dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Dalam mengendalikan ROS, organisme aerob telah menggunakan beberapa mekanisme antioksidan antara lain antioksidan enzimatis dan non enzimatis. Senyawa antioksidan non-enzim dengan berat molekul rendah termasuk glutathione seluler, vitamin C dan E, β -karoten, uric acid. Enzim antioksidan termasuk superoksida dismutase (SOD), katalase, glutathione reductase dan glutathione peroxidase. SOD mengkatalisis perlepasan superoksida menjadi H_2O_2 . Sel mamalia mengandung tiga bentuk SOD, MnSOD, Cu,ZnSOD dan SOD ekstraseluler. MnSOD paling banyak ditemukan di mitokondria, sedangkan Cu,ZnSOD dominan di sitosol. Katalase adalah enzim antioksidan utama yang mengkatalisis dekomposisi



H₂O₂ menjadi H₂O. Glutathione peroksidase adalah enzim utama lain untuk menguraikan H₂O₂.

Pembuangan ROS setelah cedera medula spinalis ditentukan oleh antioksidan selular berupa glutathione dan Cu,ZnSOD. Didapatkan efek dari pemberian glutathione pada peroksidasi lipid setelah cedera medula spinalis pada model tikus. Peningkatan glutathione memberikan perlindungan terhadap peroksidasi lipid setelah cedera. Ini merekomendasikan bahwa pemberian glutathione merupakan terapi yang layak untuk mengurangi kerusakan akibat peroksidasi lipid pada cedera medula spinalis. Mutasi pada gen Cu,ZnSOD telah dikenali pada *amyotrophic horizontal sclerosis* (ALS), penyakit yang digambarkan oleh kerusakan dan hilangnya neuron di otak dan medula spinalis. Ekspresi berlebih dari *gene wide-type* Cu,ZnSOD menunjukkan perlindungan dari cedera medula spinalis. Ini menunjukkan signifikansi dari peranan Cu,ZnSOD dalam menjaga sel neuron pada medula spinalis.

Kerusakan mendasar pada sel yang dihasilkan dari efek ROS ke makromolekul seperti lemak tak jenuh, lipid, protein, dan DNA. Peroksidasi lipid adalah jenis oksidasi sel yang dipicu oleh ROS yang berbahaya. Telah cukup lama diketahui bahwa sebagian besar degenerasi pasca trauma pada cedera medula spinalis disebabkan oleh proses cedera sekunder dan proses biokimia yang berefek adalah ROS yang memicu peroksidasi lipid. Secara khusus, medula spinalis benar-benar rentan terhadap cedera oksidatif karena ada banyak lemak tak jenuh ganda yang sangat rentan untuk peroksidasi oleh ROS. Signifikansi ROS dan peroksidasi lipid pada cedera medula spinalis telah



berbagai studi eksperimental dan klinis yang menunjukkan kemampuan dari beberapa agen bioaktif yang bersifat antioksidan.

Peroksidasi lipid terjadi ketika ROS berinteraksi dengan lemak tak jenuh di membran sel dan menghasilkan lipid reaktif yang kemudian akan membentuk radikal peroksil lipid saat berinteraksi dengan radikal bebas superoksida. Setiap radikal peroksil lipid dapat berinteraksi dengan lemak tak jenuh, mengubahnya sepenuhnya menjadi lipid aktif dan memulai respons berantai yang berlangsung sampai tidak ada lagi lemak tak jenuh yang tersedia atau diakhiri dengan radikal bebas lainnya. Hasil akhir dari akhir peroksidasi lipid ini adalah 4-hidroksinonenal (HNE) dan 2-propenal, yang sangat toksik bagi sel. Peroksidasi lipid juga merupakan alasan terjadinya ketidakseimbangan ionik melalui membran sel yang tidak stabil seperti membran dan retikulum endoplasma. Peroksidasi lipid juga menyebabkan kerusakan Na^+/K^+ ATPase yang menyebabkan penumpukan Na^+ intraseluler. Oksidasi lemak dan protein setelah cedera medula spinalis memiliki berbagai efek pada tingkat sel termasuk kegagalan pernapasan mitokondria dan metabolisme serta perubahan DNA yang pada akhirnya menyebabkan sel mati. Peroksidasi lipid secara khusus dipandang penting dalam patofisiologi cedera medula spinalis, baik selama waktu awal hipoperfusi dan lebih lanjut lagi selama waktu reperfusi. Hasil dari respon oksidatif ini, misalnya, *malonyldialdehyde*, dengan cepat berkembang setelah cedera medula spinalis pada model hewan.

2.1.5.5 Hubungan Antara Eksitotoksisitas, ROS dan Kematian Sel

Komponen eksitotoksisitas dimulai dengan paparan glutamat yang ekstrim dan berlanjut.

Glutamat menstimulasi reseptor AMPA dan reseptor kainate (KAR) untuk membuka saluran



ini memasukkan Na^+ dan menyebabkan depolarisasi membran yang

terbukanya saluran Voltage-dependent Ca^{2+} (VDCC). Beberapa jenis

reseptor AMPA juga permeabel terhadap Ca^{2+} . Ikatan glutamat ke reseptor N-metil-D-aspartat (NMDAR) dalam kondisi depolarisasi, memasukkan Ca^{2+} dalam jumlah yang sangat besar. Aktivasi reseptor glutamat metabotropik (MetR) mendorong IP_3 dan saluran reseptor ryanodine dalam membran retikulum endoplasma. Hal ini akan mengeluarkan Ca^{2+} dari RE ke dalam sitoplasma. Ekspansi kadar Ca^{2+} sitoplasma akibat glutamat dapat memasukkan Ca^{2+} ke dalam mitokondria, yang dalam jumlah berlebihan dapat mendorong pembentukan ROS dan menurunkan produksi ATP. Dengan mengaktifkan protease dan mendorong terjadinya stres oksidatif, Ca^{2+} adalah perantara utama kematian sel yang signifikan, dan peningkatan Ca^{2+} sitoplasma selama 20-30 menit dapat membunuh neuron.

Selain itu, sel glial dan astrosit mampu melakukan eksitotoksitas. Konsentrasi glutamat ekstraseluler dapat mencapai tingkat eksitotoksik ketika glutamat dilepaskan dari astrosit dan silinder aksonal. Reseptor AMPA mengekspresikan GluR_4 permeabel Ca^{2+} selubung mielin dapat menyebabkan kerusakan sitoskeletal dan ruptur mielin berikutnya dengan mengaktifkan protease sensitif Ca^{2+} seperti calpain. Pada somata oligodendrosit, $\text{GluR}_3/4$ permeabel Ca^{2+} yang mengekspresikan reseptor AMPA merupakan jalur masuk Ca^{2+} potensial yang memulai sejumlah kaskade molekuler, seperti aktivasi calpain dan aktivasi selanjutnya dari procaspase-12, defosforilasi BAD oleh kalsineurin, yang berkontribusi terhadap disfungsi mitokondria, dan produksi ROS, yang dapat memengaruhi mekanisme intraseluler. Dengan mengorbankan sintesis ATP, Ca^{2+} juga bertanggung jawab untuk memenuhi kapasitas buffer Ca^{2+} mitokondria.



akibatkan oleh kerusakan mitokondria.

2.1.5.6 Neuroinflamasi

Banyak jenis sel, termasuk astrosit, mikroglia lokal, sel imun, dan sel endotel, yang melapisi arteri darah, semuanya berperan dalam respons peradangan saraf setelah cedera medula spinalis. Dengan infiltrasi neutrofil dua kali lebih banyak selama 24 jam, infiltrasi makrofag persisten, dan peningkatan infiltrasi limfosit, medula spinalis menunjukkan respons inflamasi yang lebih parah terhadap kerusakan daripada otak.

Respon inflamasi memanifestasikan dirinya sebagai migrasi mikroglia, astrosit, dan neutrofil ke lokasi cedera dari hari pertama setelah cedera hingga hari ke-2. Astrosit menghasilkan lebih banyak sitokin dan kemokin sebagai respons terhadap cedera yang terjadi secara tiba-tiba. Ini mendorong proses inflamasi, menarik neutrofil, dan mengintensifkan kerusakan sel. Pelepasan sitokin, protease, dan radikal bebas serta pembuangan debris jaringan semuanya difasilitasi oleh neutrofil. Proses inflamasi yang menyebar sebagai akibat dari keterlibatan neutrofil. Namun, karena neutrofil juga berpartisipasi dalam proses perbaikan, eliminasi neutrofil mengganggu regenerasi jaringan lebih lanjut dan menghambat pemulihan fungsional. Aktivitas myeloperoxidase (MPO) menunjukkan peningkatan yang signifikan dalam akumulasi neutrofil pasca trauma pada 3 jam dan tetap meningkat selama 3 hari setelah cedera medula spinalis.

Makrofag, limfosit B, dan limfosit T semuanya mulai berkurang setelah hari ketiga. Setelah makrofag dan sel mikroglia mempresentasikan antigen, limfosit T mulai menjadi aktif. Sel T penolong dan limfosit T yang telah diaktifkan melepaskan sitokin yang mendorong fagositosis dan pembentukan antibodi sel B. Fase kronis dari proses imun dipercepat oleh produksi antibodi sel B terhadap sel SSP, yang mengakibatkan inflamasi yang berlangsung selama bertahun-tahun setelah serangan awal.



Pemahaman tentang fungsi dari respon inflamasi setelah cedera medula spinalis telah berkembang secara dramatis dalam beberapa tahun terakhir. Proses inflamasi memiliki efek positif dan negatif, yang masing-masing mendorong regenerasi atau degenerasi jaringan. Di satu sisi, sitokin proinflamasi seperti IL-1, TNF-, ROS, dan NOS, serta protease dan zat sitotoksik lainnya, diproduksi oleh mikroglia teraktivasi di medula spinalis yang rusak. Dalam model tikus cedera medula spinalis, infus antagonis IL-1 selama 72 jam mengurangi apoptosis yang diinduksi cedera secara signifikan, menunjukkan bahwa ekspresi awal IL-1 memiliki dampak negatif. Selain itu, setelah cedera medula spinalis, menetralkan TNF- α meningkatkan pemulihan fungsional dan menurunkan apoptosis dan kehilangan jaringan.

Dalam dua hingga tiga hari setelah kerusakan, mikroglia dan makrofag menyusup ke medula spinalis yang terluka setelah invasi neutrofil. Daerah perivaskular meningen dan ruang subarachnoid mengandung makrofag SSP serta monosit yang berasal dari darah berkontribusi pada populasi makrofag. Setelah tikus mengalami cedera, jumlah mikroglia dan makrofag mencapai puncaknya 7-10 hari kemudian, menurun pada fase subakut dan kronis. Mikroglia dan makrofag memiliki asal yang beragam, meskipun memiliki banyak penanda dan fungsi imunologis yang sama. Mikroglia adalah sel imun SSP yang berkembang di kantung *yolk sac* selama perkembangan embrio.

Monosit darah, yang merupakan keturunan myeloid di sumsum tulang, menghasilkan makrofag. Kerusakan *brain-spinal cord barrier* (BSCB) akut setelah cedera memungkinkan monosit untuk menyerang dan berdiferensiasi menjadi makrofag.



Monosit terutama ditemukan di daerah perilesional, sedangkan makrofag terutama ditemukan di lokasi kerusakan. Setelah diaktifkan, makrofag dan mikroglia memiliki

morfologi dan imunohistologi yang sama. Mikroglia dan makrofag berkontribusi pada regenerasi SSP. Mereka membantu dalam proses perbaikan dengan mengekspresikan protein perangsang pertumbuhan seperti trombospondin, neurotropin-3, dan faktor pertumbuhan saraf. Karena kapasitasnya untuk memfagositosis dan menghilangkan sel-sel yang mati dan puing-puing mielin setelah cedera medula spinalis, makrofag dan mikroglia sangat penting untuk proses penyembuhan luka.

Makrofag dan mikroglia dapat terpolarisasi menjadi fenotipe pro-inflamasi (mirip M1) atau antiinflamasi pro-regeneratif (mirip M2) berdasarkan sinyal lingkungan mikro, dan sebagai hasilnya, mereka dapat berkontribusi pada cedera atau proses perbaikan setelah cedera medula spinalis. Masih belum jelas dan memerlukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan apakah makrofag dan mikroglia dapat terpolarisasi atau memiliki karakteristik makrofag yang diturunkan monosit. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa paparan interferon sitokin spesifik Th1, interferon (IFN) γ dapat menghasilkan proinflamasi mikroglia atau makrofag M1-like. Liposakarida dan sitokin proinflamasi dapat mendorong diferensiasi makrofag M1. Oksida nitrat dan metabolit oksidatif lainnya, serta sitokin proinflamasi, yang penting untuk pertahanan tubuh dan penghancuran sel tumor, juga diproduksi dalam jumlah besar oleh sel-sel ini dan selanjutnya dapat membahayakan sel dan jaringan sehat.

Cedera medula spinalis dengan komponen lingkungan mikro juga tampaknya mendorong polarisasi M1 dari makrofag yang diaktifkan. Studi tentang cedera medula spinalis telah menunjukkan bahwa peningkatan kadar sitokin proinflamasi, TNF- α , dan



tingkat besi intraseluler setelah cedera mempromosikan fenotipe proinflamasi makrofag. Mikroglia dan makrofag M1-like yang diaktifkan

mengekspresikan MHCII, menyajikan antigen ke sel T, dan mendukung aktivasi dan kontrol respons imun bawaan dan adaptif setelah cedera medula spinalis. Studi pada model ensefalomyelitis autoimun eksperimental (EAE) dan cedera medula spinalis akut dan subakut telah menunjukkan bahwa makrofag M1-like terkait dengan ekspresi proteoglikan kondroitin sulfat (CSPGs) yang lebih tinggi, peningkatan keparahan EAE, dan kerusakan jaringan. Karena makrofag M1-like mengekspresikan lebih banyak CSPG daripada makrofag M2-like, menambahkan makrofag M1-like yang aktif ke kultur dorsal root ganglia (DRG) secara in vitro menyebabkan retraksi aksonal dan kegagalan regenerasi. CSPG, kemungkinan penghambat perkembangan akson, 17 kali lipat lebih banyak di M1 daripada di M2, M1 juga dapat membatasi regenerasi saraf setelah kerusakan.

Faktor repulsif lainnya, seperti *epulsive guidance molecule A* (RGMA), yang telah terbukti menyebabkan retraksi aksonal setelah cedera medula spinalis, juga diproduksi oleh makrofag M1-like. Sangat menarik untuk dicatat bahwa penelitian baru mengungkapkan bahwa mikroglia M1 terpolarisasi IFN- γ dan TNF- α telah mengurangi kemampuan fagositosis, yang penting untuk penyembuhan jaringan setelah cedera. Mikroglia/makrofag M2-like pro-regeneratif dengan kadar IL-10, TGF- β , dan arginase-1 yang tinggi dan aktivitas jalur NF- κ B yang berkurang, terpolarisasi oleh sitokin Th2, IL-4 dan IL-13. IL-10 adalah sitokin imunoregulasi efektif yang membantu pemulihan dan regenerasi kerusakan SSP. Pengurangan ekspresi protein anti-apoptosis seperti Bcl-2 dan peningkatan regulasi protein pro-apoptosis seperti Bax keduanya terkait dengan



Tikus yang kekurangan IL-10 dengan cedera medula spinalis memiliki sional yang lebih buruk daripada tikus tipe liar. Polarisasi IL-10 dari

mikroglia M2 meningkatkan kapasitas untuk fagositosis. Melalui mekanisme yang dimediasi IL-10, mikroglia terpolarisasi M2 meningkatkan kapasitas sel prekursor otak untuk diferensiasi oligodendrosit. Mikroglia dan makrofag M2-like juga memodulasi sistem kekebalan dan mendukung regenerasi aksonal. Namun, aktivitas seperti M2 yang berlebihan mendorong perkembangan jaringan parut atau fibrotik melalui pelepasan zat seperti TGF- β , *platelet derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) , dan galektin-3, seperti efek merugikan dari respons makrofag M1 yang berkepanjangan. Untuk memperbaiki cedera medula spinalis, menjaga keseimbangan antara M1 proinflamasi dan respons makrofag/mikroglia M2 proregeneratif merupakan hal yang bermanfaat.

2.2 Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cell (UC-MS C)

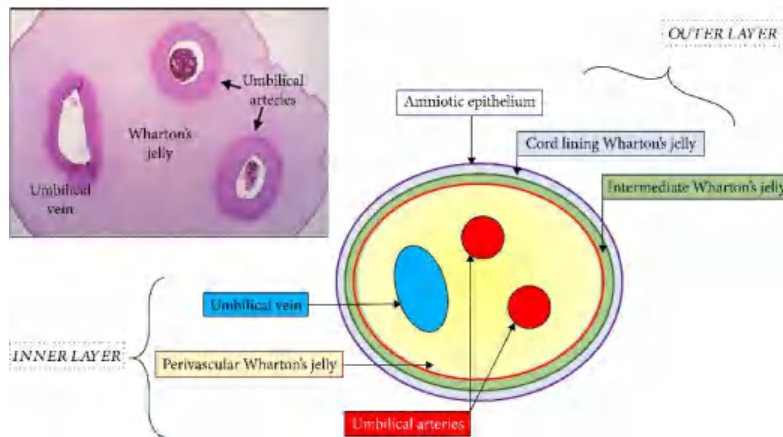
2.2.1 UC-MS C

Umbilical cord derived mesenchymal stem cell (UC-MS C) adalah sel punca yang berasal dari mesoderm embrionik yang terletak di tali pusat selama perkembangan janin. Tali pusat berfungsi sebagai penghubung antara janin yang sedang tumbuh dan sirkulasi darah ibu orang tua. Memiliki panjang rata-rata sekitar 50 cm dan diameter 1-2 cm, serta memiliki selubung dan dua arteri dengan panjang diameter rata-rata 7-8 dan 3-4 mm. Di sekitar pembuluh darah ini, terdapat tempat konsentrasi tertinggi MSC diisolasi menurut



riset, yang disebut Wharton's Jelly. Selain itu, MSC bukan satu-satunya yang dapat diisolasi di sini, karena sel punca hematopoietik (HSC)

biasanya juga ditemukan. MSC dapat didistribusikan ke berbagai jaringan dan sel somatik dan rangkaian berikut akan terbatas pada berbagai bagian yang berbeda dari jaringan ikat dewasa serta sumsum tulang.



Gambar 2 1. Struktur umbilical cord

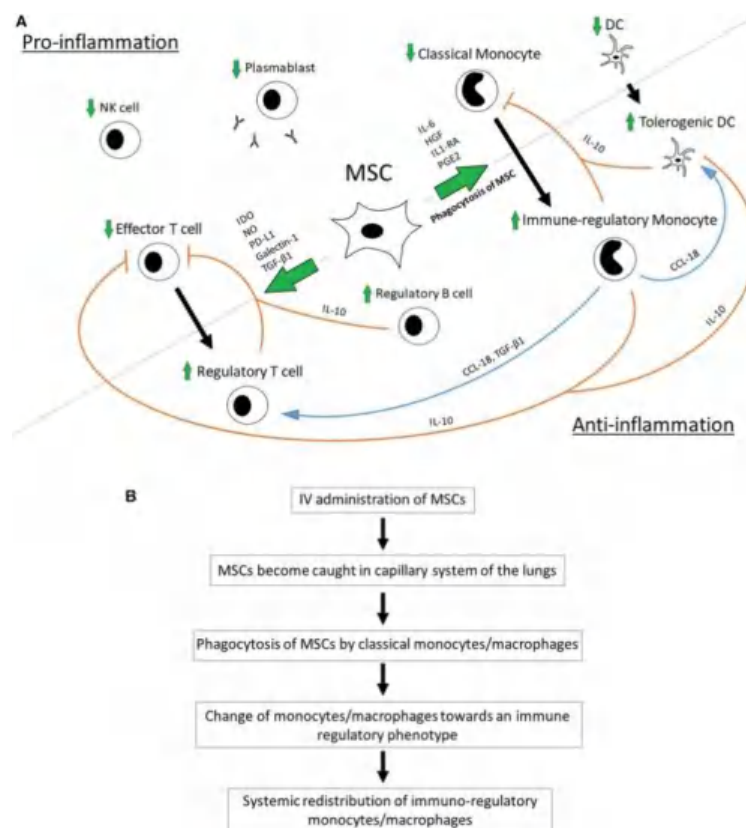
2.2.2 Potensi Kemampuan UC-MSC dalam *Multilineage Differentiation*

Kemampuan ekstensif diferensiasi sel punca mesenkimal multilineage, ditambah dengan aksesnya sendiri dari berbagai sumber yang berbeda seperti sumsum tulang, jaringan adiposa, jaringan tali pusat, ligamen periodontal, pulpa gigi, dan cairan menstruasi, meningkatkan minat baru-baru ini dalam menggunakan MSC dalam baik uji pra-klinis



untuk mengobati penyakit lain. Dari semua sumber, MSC yang berasal dari tali pusat memiliki konsentrasi paling banyak, mudah diakses dibandingkan dengan sumsum tulang, dan rentan terhadap rangsangan spesifik yang dapat

menimbulkan diferensiasi multipoten di dalam sel induk. MSC ditunjukkan memiliki bukti eksperimental yang kuat dari kemampuan diferensiasi multilineage, karena mampu berdiferensiasi ke ketiga lapisan germinal, mesoderm, ektoderm, dan endoderm, dan tidak terbatas pada garis keturunan mesenkimnya sendiri. Potensi diferensiasi ini tampaknya terkait dengan pemanfaatan MSC dari jalur transduksi sinyal yang disebut pensinyalan Wnt dan merupakan mekanisme kunci dalam memunculkan diferensiasi multilineage dalam MSC, melalui interaksinya satu sama lain.



Gambar 2 2.A: Usulan interaksi MSC dengan sel imun inang; B: Usulan jalur antiinflamasi yang diperantarai MSC melalui fagositosis MSC



2.2.3 UC-MSc sebagai Immonumodulator

Dalam hal bertindak sebagai imunomodulator, penelitian terbaru menunjukkan bahwa sel punca mesenchymal (MSC) menunjukkan kemampuan fungsional sebagai pusat kendali untuk sebagian besar faktor inflamasi dan sel imun seperti monosit/makrofag, sel T, sel B, sel dendritik, Treg, dan sel pembunuh alami (sel NK). Khususnya, untuk Treg dan makrofag, interaksi dengan MSC menyebabkan interaksi kompleks yang mengkatalisasi yang menyebabkan kedua potensi imunomodulator terbuka. Penyebab interaksi ini sering disarankan untuk dikaitkan dengan sekretom MSC yang terdiri dari berbagai faktor pensinyalan seperti eksosom atau sitokin, meskipun ada juga bukti yang menunjukkan interaksi sel-sel sebagai mekanisme yang digunakan MSC untuk memediasi sebagai imunomodulator. Saat ini, lebih banyak penelitian mengenai kemampuan imunomodulator MSC masih dieksplorasi seperti terhadap MSC yang mengalami apoptosis, tidak aktif secara metabolik, atau bahkan terfragmentasi. Penelitian lebih lanjut di bidang ini akan dapat memperluas pemahaman tentang kontribusi potensial MSC hidup terhadap tumorigenesis, atau opsi untuk memanfaatkan sel dan fragmen mati sebagai alternatif untuk eksperimen.

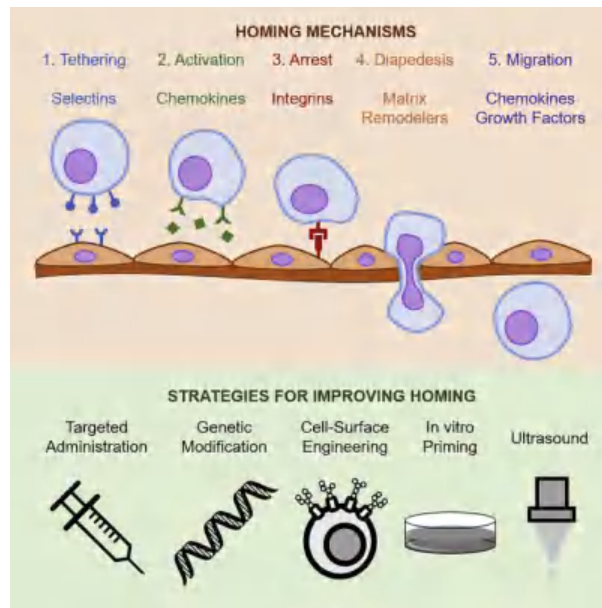
2.2.4 Jalur “Homing” UC-MSc

MSC memiliki dua cara agar sel dapat menargetkan situs yang rusak melalui mekanisme homingnya. Sel punca mesenchymal dapat menjalani homing non-sistemik, di mana MSC ditransplantasikan secara lokal pada jaringan target dan dipandu menuju lokasi cedera



kemokin (Tinggi ke rendah), atau melalui homing sistemik, di mana sel akan menjadi lima langkah berbeda yaitu: 1. Penambatan dan

penggulangan, 2. Aktivasi, 3. Penangkapan, 4. Transmigrasi atau diapedesis, dan 5. Migrasi.



Gambar 2 3. Jalur “Homing” yang digunakan MSC

2.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) adalah sinyal utama dalam induksi pertumbuhan pembuluh darah, proses yang disebut angiogenesis. Meskipun studi pada satu dekade lalu, menunjukkan bahwa VEGF adalah faktor spesifik sel endotel, temuan yang lebih baru mengungkapkan bahwa VEGF juga memiliki efek langsung pada sel neuron. Studi genetik menunjukkan bahwa tikus dengan penurunan ekspresi VEGF mengalami degenerasi neuron motorik mengingatkan pada gangguan neurodegeneratif



rophic Lateral Sclerosis (ALS). Studi genetik tambahan menegaskan bahwa VEGF adalah modifier dari degenerasi neuron motorik pada manusia dan pada model ALS. Penurunan ekspresi VEGF dapat meningkatkan

degenerasi neuron motorik dengan membatasi perfusi jaringan saraf dan neuroproteksi yang bergantung pada VEGF. VEGF juga berefek pada kematian neuron setelah akut iskemik pada otak dan medula spinalis, dan juga terlibat dalam gangguan neurologis lain seperti neuropati diabetes dan iskemik neuropati, regenerasi saraf, penyakit Parkinson, penyakit Alzheimer, dan sklerosis multipel. Temuan ini telah meningkatkan minat dalam menilai potensi terapeutik VEGF untuk gangguan neurodegeneratif (Li et al., 2017; Storkebaum et al., 2004).

VEGF merupakan mitogen yang disekresikan dan terkait dengan angiogenesis dengan mengikat reseptor tyrosine kinase VEGFR-1 (Flt-1) dan VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Beberapa studi mengindikasikan VEGFR-2 mentransmisi kritikal angiogenesis sinyal sebagai respons terhadap VEGF. Isoform VEGF seperti 121, 165, 189 terdeteksi pada manusia dan 120, 164, 188 pada tikus. Meskipun isoform VEGF memainkan peran penting dalam pengembangan jaringan vaskular, ia bekerja secara independen pada neuron untuk memandu neurogenesis, pertumbuhan akson, plastisitas sinaps dan pola dendrit. VEGF mempertahankan neuron motorik dari kerusakan radikal bebas, hipoksia/hipoglikemia, eksitotoksisitas glutamat sehingga memainkan peran penting pada penyembuhan cedera medula spinalis (Storkebaum et al., 2004; Wang et al., 2015).

Neuropilin-1 (NP-1) adalah reseptor spesifik untuk isoform VEGF₁₆₅ dan ko-reseptor dari VEGFR-2. NP-1 juga berikatan dengan semaphorin3A (Sema3A), sebuah neurorepellant yang terlibat dalam panduan akson. Neuropilin- 2 (NP-2) mengikat VEGF₁₆₅ dan VEGF₁₄₅, serta Sema3C dan Sema3F. Fakta bahwa NP-1 dan NP-2



semaphorins dan VEGF menunjukkan bahwa reseptor ini memiliki peran baik pada sistem saraf dan kardiovaskular. VEGFR-1 memiliki efek positif dan negatif. Dalam

embrio, domain pengikat ligan ekstraseluler yang larut dari VEGFR-1 menjebak VEGF dan dengan demikian mengurangi angiogenesis yang dihasilkan oleh VEGFR-2. Dalam kondisi patologis, aktivasi VEGFR-1 oleh *Placental Growth Factor* (PGF), bentuk homolog lain dari VEGF, merangsang pertumbuhan dan pematangan pembuluh darah baru melalui pensinyalan langsung melalui VEGFR-1 dan *cross talk* antara reseptor VEGF (Storkebaum et al., 2004).

VEGF-A berikatan dengan VEGFR-1, VEGFR-2, NRP-1 dan NRP-2. VEGF-B dan PGF berikatan dengan VEGFR-1. VEGF-C dan VEGF-D mengikat VEGFR-2 dan VEGFR-3. Pensinyalan dari reseptor tersebut akan mengarah ke angiogenesis, vaskulogenesis, limfanogiogenesis, permeabilitas vaskular, kelangsungan hidup sel melalui penghambatan apoptosis, migrasi, proliferasi, dan mobilisasi progenitor. Sel neuron lebih banyak mengekspresikan VEGFR-2 sedangkan VEGFR-1 lebih banyak ditemukan pada sel glial (Xm & Mj, 2018)

2.3.1 Efek VEGF Pada Sel Neuron

VEGF pernah dianggap sebagai faktor pertumbuhan paling spesifik pada endotel, tetapi bukti terbaru menunjukkan bahwa VEGF juga memiliki efek langsung pada jenis sel saraf. Pada kultur dorsal root ganglia VEGF merangsang pertumbuhan aksonal dan meningkatkan kelangsungan hidup neuron dan sel satelit, sedangkan penghambatan sinyal VEGFR-2 menghalangi pertumbuhan aksonal sebagai respons terhadap VEGF.



iliki efek neurotropik pada kultur neuron dari sistem saraf pusat dan pada

/EGF memberikan efek ini melalui pensinyalan melalui VEGFR-2, PI3-

pada kultur mesensefalon, VEGF meningkatkan pertumbuhan dan

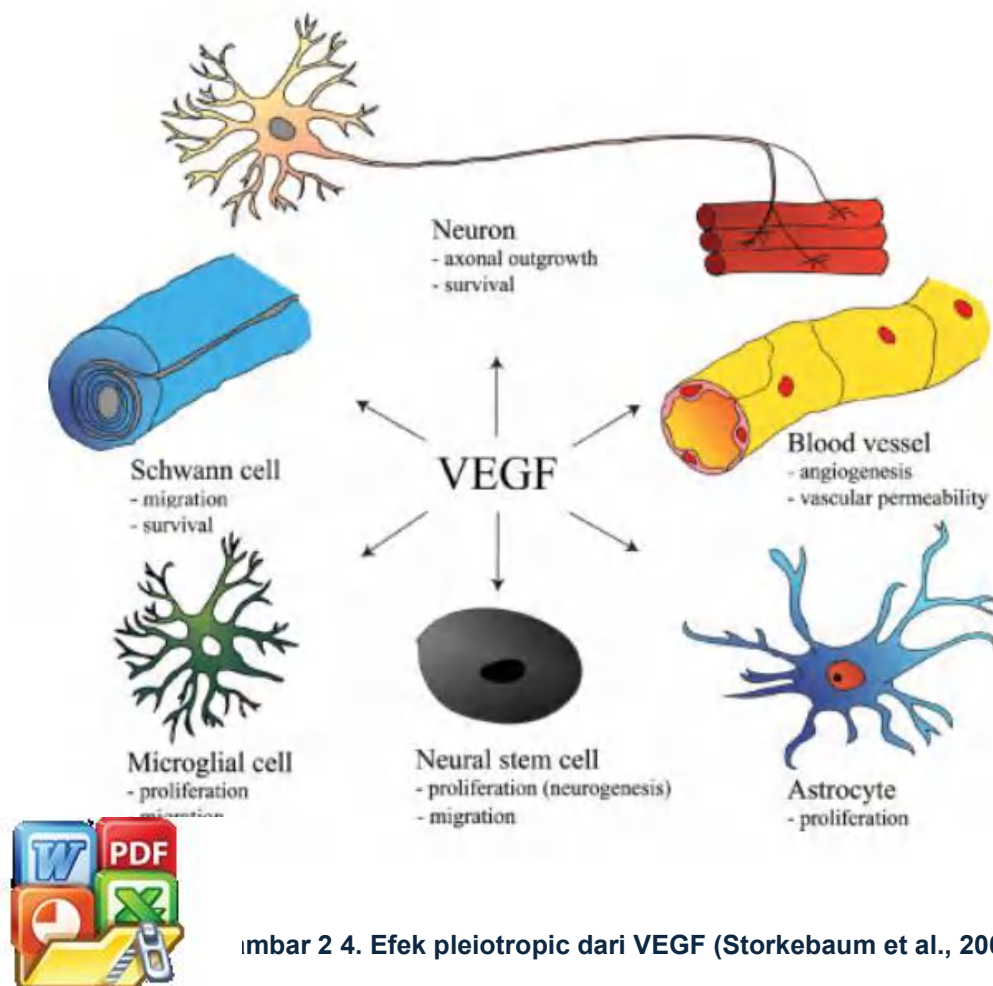
kelangsungan hidup neuron dopaminergik dan astrosit. Pemberian sinyal melalui VEGFR-2, PI3-kinase dan Akt melindungi sel HN33 (fusi sel somatik dari neuron hipokampus dan sel neuroblastoma) terhadap kematian yang disebabkan oleh kekurangan oksigen dan glukosa (Storkebaum et al., 2004)

Pensinyalan VEGFR-2 melalui PI3-kinase/Akt dan MEK/ERK juga melindungi neuron hipokampus yang dikultur terhadap toksisitas yang diinduksi glutamat atau cedera hipoksia, mungkin melalui penghambatan proses eksitotoksik, dan menstimulasi kelangsungan hidup neuron granula serebelar setelah prekondisi hipoksia. Pensinyalan VEGF/VEGFR-2 juga melindungi kultur neuron kortikal yang mengalami hipoksia. VEGF merangsang kelangsungan hidup neuron melalui regulasi arus Ca^{2+} , tetapi efek ini bergantung pada pensinyalan melalui VEGFR-1, bukan melalui VEGFR-2. Memang, dalam sel neuroblastoma SH-SY5Y, hipoksia dan deprivasi glukosa mengatur tingkat VEGF dan saluran K^+ dengan gerbang tegangan Kv1.2 dan juga meningkatkan tyrosine phosphorylation dari saluran ion ini. Penambahan VEGF eksogen dalam kondisi ini meningkatkan kelangsungan hidup sel dan fosforilasi tirosin Kv1.2, sedangkan penghambatan VEGF memiliki efek berlawanan. Dengan demikian, VEGF memiliki efek neurotropik *in vitro* langsung pada beberapa jenis sel saraf, termasuk neuron otonom, sensorik, dopaminergik, hipokampus, serebelar, dan kortikal. Selain efeknya pada neuron yang dibedakan, VEGF menstimulasi neurogenesis *in vitro* dan *in vivo*. Misalnya, VEGF merangsang proliferasi prekursor neuron dalam kultur *cortex cerebri*, dan infus

ricular terus menerus dari VEGF merangsang penggabungan BrdU di zona subventrikular dan subgranular dari girus dentate hipokampus al., 2004)



Efek neuroproliferatif *in vitro* dari VEGF dimediasi melalui VEGFR-2 dan peningkatan regulasi dari *E2F family transcription factors*, konsisten dengan regulasi transisi fase G1-S dari siklus sel. VEGF juga meningkatkan kelangsungan hidup stem sel neuron yang dikultur dalam kondisi anoksik dan merupakan *chemoattractant progenitor neuron* yang distimulasi *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2). Secara khusus, FGF-2 menginduksi ekspresi VEGFR-1 dan VEGFR-2 pada neural progenitors, dan pensinyalan melalui VEGFR-2 memediasi efek chemotactic dari VEGF. Secara keseluruhan, VEGF memiliki efek neurotropik langsung *in vitro*, terutama dimediasi oleh VEGFR-2 (Storkebaum et al., 2004).



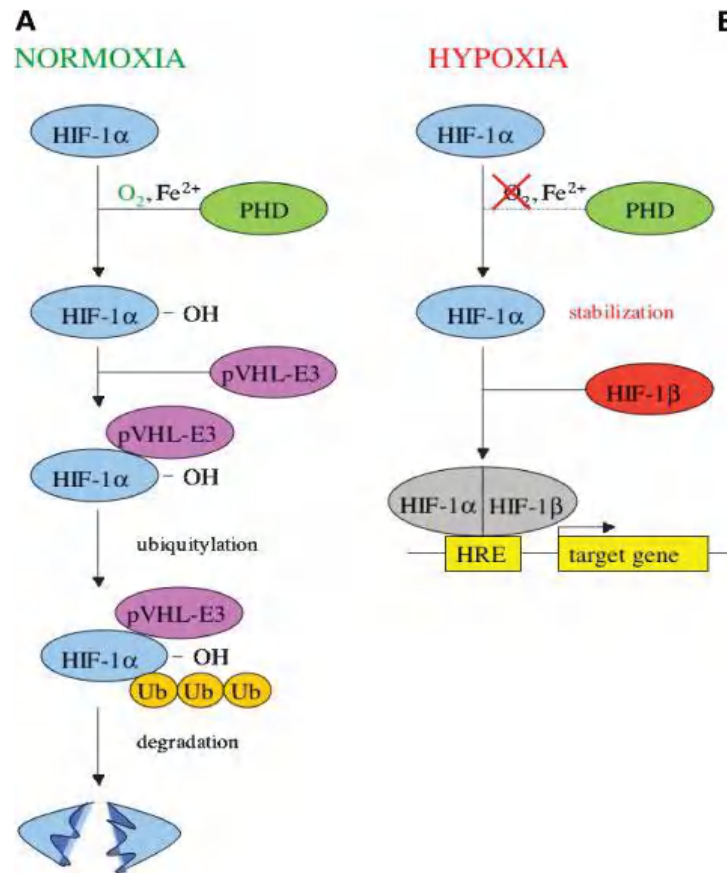
gambar 2 4. Efek pleiotropic dari VEGF (Storkebaum et al., 2004).



2.3.2 Regulasi VEGF

Peningkatan kadar protein VEGF dalam kondisi hipoksia disebabkan oleh kontrol pada tingkat transkripsi dan translasi. *Hypoxia-inducible transcription factors* (HIF) mengikat *Hypoxia-response element* (HRE) pada promotor VEGF dan dengan demikian meningkatkan transkripsi VEGF pada keadaan hipoksia. Hidroksilasi HIF-1 α oleh *proline hydroxylase domain-containing proteins* (PHD) menargetkan degradasi HIF-1 α oleh jalur proteasome di normoksia. Dalam hipoksia, PHD tidak lagi dapat menghidroksilasi HIF-1 α dan tingkat protein HIF- 1 α distabilkan, memungkinkan faktor transkripsi ini dimerisasi dengan HIF-1 β dan meningkatkan transkripsi dari gen VEGF. Hipoksia juga memengaruhi stabilitas mRNA VEGF dengan mengatur pengikatan HuR mRNA binding protein dan faktor-faktor lain ke urutan spesifik di 3' *untranslated region* (UTR). Mekanisme lain dari induksi hipoksia VEGF melibatkan regulasi dari *Internal Ribosome Entry Site* (IRES), terletak di 5' UTR dari mRNA VEGF (Storkebaum et al., 2004). Akibatnya, interaksi antara HIF-1 α dan pVHL tidak dapat terjadi dan HIF-1a distabilkan. Hal ini memungkinkan HIF-1a memasuki nukleus, dimerisasi dengan HIF-1b dan meningkatkan transkripsi VEGF dan gen responsif hipoksia lainnya (Storkebaum et al., 2004).





Gambar 2 5 HIF-1 α pada keadaan normoksia dan hipoksia (Storkebaum et al., 2004)

Pada kondisi normoksia, HIF-1 α di hidroksilasi oleh PHD, proses tersebut membutuhkan O_2 sebagai kosubstrat dan besi sebagai kofaktor. Hidroksilasi HIF- 1 α memungkinkan interaksi antara HIF-1 α dan *tumor supressor von Hippel- Lindau kigase compleMLC901 E3* (pVHL-E3). Hasil interaksi ini adalah *ubiquitylation* dari HIF-1 α dan degradasi oleh jalur proteasome. B: Dalam kondisi hipoksia, PHD tidak dapat menghidroksilasi HIF-1 α , karena kekurangan O_2 .



2.3.3 Perubahan Level VEGF dan Ekspresi Reseptor VEGF Setelah Cedera Medula Spinalis

Bartholdi dkk. dan Herrera et al. mengamati penurunan ekspresi VEGF di episenter cedera pada 1 hari pasca cedera medula spinalis dengan penurunan ekspresi VEGF selama 1 bulan pasca cedera medula spinalis. Selain itu, Ritz et al. melaporkan penurunan tingkat VEGF, Angiopoietin-1 (Ang-1), PDGF-BB, dan PGF, dan peningkatan ekspresi faktor pertumbuhan hepatosit faktor angiogenik. Reseptor VEGF Flt-1 dan Flk-1 telah terbukti diekspresikan secara konstitutif oleh sel endotel vaskular, neuron, dan beberapa astrosit di medula spinalis. Setelah cedera medula spinalis, VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR2 (Flk-1) dan reseptor neuropilin-1 telah terbukti diregulasi dalam astrosit reaktif dan mikroglia/makrofag setelah cedera medula spinalis kontusif. Ekspresi reseptor ini memuncak antara 7 dan 14 hari setelah cedera dan tetap relatif tinggi bahkan pada 14 hari dan seterusnya. Secara keseluruhan, ini menunjukkan bahwa VEGF dan dua reseptor tirosin kinase berperan dalam inflamasi dan respons astrositik setelah cedera medula spinalis` kontusif. Namun, Skold et al. studi *in vitro* menunjukkan bahwa upregulasi VEGF, reseptor dan ko-reseptornya di astrosit dapat terjadi tanpa adanya sel inflamasi, dengan prostaglandin menjadi bagian hulu dari VEGF (Xm & Mj, 2018).

2.4 Neuron Specific Enolase (NSE)



enzim glikolitik multifungsi yang bertindak sebagai protein pengikat in ditemukan terlibat dalam keadaan hipoksia dan iskemia. Enolase yak peran dalam kontrol pertumbuhan, aktivasi kekebalan, peradangan,

dan respons alergi. Ekspresi permukaan sel dari enolase sering terdeteksi pada monosit/makrofag yang teraktivasi, mikroglia, dan astrosit, yang mendorong degradasi matriks ekstraseluler (ECM), produksi sitokin/kemokin proinflamasi, dan invasi sel inflamasi di lokasi cedera. Setelah aktivasi, enolase juga dapat bertindak sebagai *heat-shock protein* dengan mengikat struktur sitoskeletal dan kromatin, dan mungkin memainkan peran penting dalam berbagai cedera, dan proses patofisiologis. Studi terbaru menunjukkan bahwa NSE, memiliki potensi berguna sebagai biomarker untuk menilai kerusakan neuron dan prognosis dari cedera medula spinalis. NSE dapat diperiksa pada darah dan cairan serebrospinalis. Konsentrasi tinggi NSE telah di deteksi di *gray matter* pada otak dewasa, sementara level rendah dari NSE di laporkan terdapat pada *white matter*.

NSE memiliki implikasi pada kondisi iskemia, hipoksia, dan beragam penyakit metabolik, proliferasi, inflamasi, autoimun, dan neurodegeneratif. 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 CSF dan perkembangan klinis penyakit. Studi terbaru menunjukkan peran inflamasi untuk NSE pada cedera medula spinalis, kondisi dengan perubahan patologis progresif yang mencakup kaskade molekuler yang kompleks dan berkembang. Tingkat ekspresi NSE di jaringan yang berbeda setelah cedera medula spinalis pada tikus ditemukan meningkat secara signifikan setelah cedera medula spinalis akut dan penghambatan ekspresi dan aktivitas NSE menurunkan cedera sekunder pada medula spinalis. Selain itu, penghambatan enolase/NSE telah terbukti mengurangi



inflamasi, menghambat aktivasi MMP-9, memodulasi hormon metabolik, gliosis setelah cedera medula spinalis melalui jalur seluler dan metabolik

yang berbeda. Namun, peran spesifik NSE dalam kondisi inflamasi setelah cedera medula spinalis dan mekanisme di mana tingkat NSE yang tinggi dapat memengaruhi neurodegenerasi pada cedera medula spinalis, masih belum jelas.

Sementara peran spesifiknya dalam proses inflamasi masih belum jelas, NSE dianggap sebagai biomarker pada stres neuron dan memiliki potensi prognostik untuk berbagai gangguan neurologis. Kadar NSE serum meningkat secara signifikan pada pasien dengan hasil neurologis yang buruk dalam berbagai kondisi. Selain itu, tingkat kecacatan dan defisit neurologis sering berkorelasi dengan peningkatan konsentrasi NSE, yang menunjukkan nilai prognostiknya. Peningkatan NSE dianggap sebagai penanda kerusakan oksidatif dan merupakan parameter yang mendasari beberapa gangguan neurodegeneratif, termasuk penyakit Huntington, ataksia Friedreich, paraplegia spastik hereditas, bentuk familial yang langka dari penyakit parkinson, penyakit Alzheimer, dan *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (ALS). Dalam penelitian terbaru, konsentrasi serum NSE diukur pada pasien dengan serangan jantung dari lima rumah sakit di Jerman, Austria, dan Italia, dan hasilnya dianalisis. Konsentrasi serum NSE yang tinggi memprediksi hasil neurologis yang buruk pada sebagian besar pasien henti jantung. Level NSE juga telah digunakan untuk memprediksi hasil neurologis pada cedera medula spinalis traumatis dan penyakit retinal, seperti ablasi retinal. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa NSE serum memiliki nilai prediksi yang tinggi untuk menentukan tingkat keparahan dan hasil neurobehavioral awal setelah stroke akut dan kejadian neurologis merugikan lainnya. Nilai serum NSE ditemukan relatif rendah pada



medula spinalis iskemik dan dapat meningkat lebih tinggi pada pasien yang tidak diinginkan dibandingkan pada pasien dengan hasil yang

menguntungkan bahkan setelah 6 bulan. Kadar NSE yang meningkat juga terdeteksi pada subjek diabetes, dan kadar NSE yang lebih tinggi berkaitan erat dengan neuropati diabetik.

Selain mengevaluasi serum untuk biomarker kerusakan saraf, sejumlah penelitian bertujuan untuk memvalidasi biomarker plasma untuk kerusakan saraf yang dapat digunakan dalam model penyakit saraf akut dan kronis. Plasma NSE adalah biomarker eksperimental yang valid dan sederhana yang memungkinkan untuk mengukur derajat cedera saraf dalam pendekatan non-invasif. Konsentrasi NSE plasma yang lebih tinggi dikaitkan dengan kematian pada pasien sepsis yang kritis, menunjukkan bahwa NSE mungkin memiliki kegunaan sebagai penanda cedera saraf pada sepsis. Kadar NSE plasma meningkat dalam berbagai kondisi kerusakan SSP. NSE meningkat pada beberapa jenis kanker, trauma kepala, kerusakan otak setelah operasi jantung, dan infark serebral. Dengan demikian, NSE memiliki potensi diagnostik dan prognostik untuk inflamasi dan kerusakan saraf pada masing-masing kondisi ini (Haque et al., 2016, 2017, 2018; Polcyn et al., 2017).

2.5 Secretome

Secretome adalah kumpulan molekul bioaktif yang disekresikan oleh sel ke lingkungan ekstraseluler, termasuk protein, lipid, mikroRNA, vesikel ekstraselular, dan berbagai faktor pertumbuhan (Rani et al., 2015). Dalam bidang terapi regeneratif, secretome yang berasal dari sel punca mesenkimal (Mesenchymal Stem Cells/MSC) telah menjadi fokus



efek terapinya yang tidak bergantung pada transplantasi sel secara
o et al., 2017).

Penelitian menunjukkan bahwa efek terapeutik MSC sebagian besar dimediasi oleh molekul-molekul dalam secretome. Komponen utamanya meliputi faktor angiogenik seperti Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), sitokin antiinflamasi seperti Transforming Growth Factor-beta (TGF- β), serta eksosom yang mengandung RNA regulator dan protein pensinyalan (Phinney & Pittenger, 2017). Molekul-molekul ini bekerja secara sinergis untuk mempercepat regenerasi jaringan, mengurangi peradangan, dan mencegah apoptosis.

Secretome MSC telah diaplikasikan secara luas dalam studi praklinis. Pada model cedera saraf tulang belakang, secretome terbukti meningkatkan pemulihan motorik dengan merangsang regenerasi akson dan remielinisasi (Teixeira et al., 2017). Dalam studi stroke iskemik, secretome mempercepat pemulihan neurologis tanpa risiko tumorigenesis seperti pada transplantasi sel (Andressen et al., 2018). Bahkan, dalam kasus luka kronik, secretome menunjukkan aktivitas promotif terhadap migrasi dan proliferasi sel epitel serta angiogenesis lokal (Chen et al., 2008).

Keunggulan secretome dibanding terapi sel langsung antara lain meliputi kemudahan penyimpanan, kontrol dosis, serta mengurangi risiko imunogenisitas atau transformasi neoplastik (Rekker et al., 2014). Secretome dapat dikembangkan sebagai produk acellular siap pakai (off-the-shelf), bahkan dalam bentuk lyophilized yang stabil. Namun demikian, terdapat tantangan besar dalam hal standarisasi produksi, mengingat komposisi secretome sangat bergantung pada jenis sel, kondisi kultur, dan metode



Dengan semakin banyaknya data klinis dan praklinis, pemanfaatan secretome memiliki prospek cerah sebagai alternatif terapi regeneratif berbasis biologis, khususnya dalam bidang neurologi, ortopedi, dan dermatologi (Silini et al., 2019).

2.6 MLC901

Cedera medula spinalis (CMS) menyebabkan disfungsi neurologis yang kompleks, bersifat multiphasik, dan mencakup proses patofisiologis primer dan sekunder. Fase primer terjadi akibat trauma mekanis langsung yang merusak jaringan saraf, pembuluh darah, dan membran sel. Fase sekunder menyusul dalam hitungan menit hingga hari, ditandai oleh eksitotoksisitas, peningkatan stres oksidatif, peradangan, disfungsi mitokondria, gangguan sawar darah-otak (BBB), serta aktivasi jalur apoptosis dan nekrosis (Ahuja et al., 2017).

Dalam CMS, kerusakan neuron dan oligodendrosit menyebabkan hilangnya transmisi sinyal saraf, sementara cedera pada pembuluh darah memicu iskemia lokal. Pelepasan glutamat secara berlebihan menyebabkan *excitotoxicity*, yaitu aktivasi berlebihan reseptor NMDA dan AMPA, yang meningkatkan influx kalsium intraseluler dan merangsang pembentukan *reactive oxygen species* (ROS), yang kemudian memicu *mitochondrial permeability transition* dan aktivasi caspase (Oyinbo, 2011). Akumulasi ROS dan nitrit juga menyebabkan kerusakan lipid membran (lipid peroxidation), kerusakan DNA, dan akhirnya apoptosis atau nekrosis sel.



konteks tersebut, **MLC901 (NeuroAiD II)** bekerja sebagai agen dengan **mekanisme multimodal**, melibatkan efek **antioksidan**, **neurotropik**, **pro-regeneratif**, dan **antiinflamasi**. Komponen aktif dari

MLC901 seperti *Radix Astragali*, *Radix Polygalae*, dan *Rhizoma Acori Tatarinowii* diketahui memiliki efek menstabilisasi membran neuron dan memperbaiki metabolisme energi selular (Heurteaux et al., 2010). Secara molekuler, MLC901 terbukti:

1. **Menghambat eksitotoksisitas:** MLC901 menurunkan overaktivasi NMDA receptor dan mengurangi influx on Ca^{2+} intraseluler. Efek ini menghambat aktivasi jalur apoptotik yang bergantung pada kalsium (Quintard et al., 2011).
2. **Menekan stres oksidatif dan peradangan:** Studi in vitro dan in vivo menunjukkan bahwa MLC901 mengurangi ekspresi ROS dan meningkatkan aktivitas antioksidan endogen seperti superoksida dismutase (SOD) dan glutathione (GSH). Selain itu, MLC901 menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, dan IL-6 (Lim et al., 2020).
3. **Menghambat jalur apoptosis:** MLC901 menurunkan ekspresi caspase-3 dan caspase-9, serta meningkatkan ekspresi protein anti-apoptosis seperti Bcl-2, menunjukkan pengaruh langsung terhadap jalur intrinsik kematian sel (Heurteaux et al., 2010).
4. **Meningkatkan neuroplastisitas dan regenerasi aksonal:** MLC901 meningkatkan ekspresi BDNF, VEGF, dan GAP-43 – protein penting dalam pertumbuhan dan perbaikan akson. Efek ini disertai dengan peningkatan neurogenesis dan densitas sinaptik pada daerah yang mengalami cedera (Quintard et al., 2011).



ang angiogenesis: Peningkatan ekspresi VEGF yang distimulasi oleh juga mendukung pembentukan pembuluh darah baru pada area iskemik,

memperbaiki suplai oksigen dan nutrisi, serta mempercepat perbaikan jaringan saraf (Pham et al., 2011).

Dalam model hewan CMS, pemberian oral MLC901 setelah cedera menghasilkan peningkatan signifikan dalam skoring fungsional motorik (contoh: BBB score), menunjukkan pemulihan koneksi saraf motorik yang lebih baik. Efek ini bahkan lebih nyata bila diberikan dalam waktu 24 jam pertama pasca-trauma, mengindikasikan peran pentingnya dalam fase akut cedera (Lim et al., 2020).

Dengan mekanisme yang menyorot berbagai aspek patofisiologi CMS, MLC901 menjadi kandidat yang kuat sebagai kontrol positif dalam studi-studi eksperimental regeneratif, termasuk bila dikombinasikan dengan terapi sel atau secretome yang menargetkan regenerasi struktural.

