

TESIS

**PENGARUH INJEKSI INTRASKLERA SEL PUNCA MESENKIMAL
LIMBUS TERHADAP EKSPERSI MMP-3 DAN TIMP-1 SKLERA
PADA HEWAN MODEL FORM DEPRIVATIF MYOPIA
(STUDI EKSPERIMENTAL IN VIVO PADA *ORYCTOLAGUS
CUNICULUS*)**



Oleh:

ATINA YUSTISIA LESTARI

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK JENJANG
MAGISTER**

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
RSUD DR. SOETOMO SURABAYA**

2020

**PENGARUH INJEKSI INTRASKLERA SEL PUNCA MESENCHYMAL
LIMBUS
TERHADAP EKSPERSI MMP-3 DAN TIMP-1 SKLERA
PADA HEWAN MODEL FORM DEPRIVATIF MYOPIA
(STUDI EKSPERIMENTAL IN VIVO PADA *ORYCTOLAGUS
CUNICULUS*)**

TESIS

Diajukan sebagai syarat memperoleh gelar Magister Kedokteran Klinik

(M.Ked.Klin)

Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik Jenjang Magister

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Oleh:

ATINA YUSTISIA LESTARI

NIM:

011518016301

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN KLINIK JENJANG
MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
RSUD DR. SOETOMO SURABAYA
2020**

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya sendiri, dari semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar. Bagian atau keseluruhan isi tesis ini tidak pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik pada bidang studi dan/ atau universitas lain dan tidak pernah dipublikasikan/ ditulis oleh individu selain penyusun kecuali bila dituliskan dengan format kutipan dalam isi tesis.

Apabila ditemukan bukti pernyataan saya tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan yang berlaku di Universitas Airlangga

Surabaya, 10 Februari 2020



Atina Yustisia Lestari, dr.
NIM 011518016301

LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan tesis yang berjudul :

**Pengaruh Injeksi Intrasklera Sel Punca Mesenchymal Limbus Terhadap
Ekspersi MMP-3 Dan TIMP-1 Sklera Pada Hewan Model Form Deprivatif
Myopia (Studi Eksperimental In Vivo Pada *Oryctolagus Cuniculus*)**

Diajukan sebagai syarat memperoleh gelar Magister Kedokteran Klinik
(M.Ked.Klin)

Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik Jenjang Magister

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Oleh :

Atina Yustisia Lestari, dr

Pembimbing I

Prof. Dr. Gatut Subendro, dr., Sp.M(K)

NIP 19460212 197203 1 001

Pembimbing II

Ria Sandi Deneska, dr., SpM(K)

NIP 19750929 201410 2 001

Pembimbing Patologi Anatomi

Dyah Fauziah, dr., Sp.PA(K)

NIP 19731205 200312 2001

Konsultan Statistik

Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes.

NIP 19650625 199203 1 002

Mengetahui

F.UTB

Koordinator Program Studi PPDS Ilmu Kesehatan Mata

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga / RSUD dr. Soetomo Surabaya

Dr. Evelyn Komaratih, dr., SpM(K)

NIP 196801101997032003

HALAMAN PENGESAHAN PANITIA PENGUJI TESIS

TESIS ini diajukan oleh:

Nama : Atina Yustisia Lestari, dr.

NIM : 011518016301

Program Studi : Ilmu Kedokteran Klinik Jenjang Magister

Judul : PENGARUH INJEKSI INTRASKLERA SEL PUNCA
MESENCHYMAL LIMBUS TERHADAP EKSPERSI MMP-3
DAN TIMP-1 SKLERA PADA HEWAN MODEL FORM
DEPRIVATIF MYOPIA (STUDI EKSPERIMENTAL IN VIVO
PADA *ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)

Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji

Program Studi Ilmu Kedokteran Klinik Jenjang Magister Universitas Airlangga

Pada tanggal 13 Februari 2020

Panitia Penguji,

1. Ketua Penguji : Dr. Evelyn Komaratih, dr. Sp.M(K)
2. Penguji : Prof. Dr. Gatut Suhendro, Sp.M(K)
3. Penguji : Dr. Nurwasis, dr., Sp.M(K)
4. Penguji : Dr. Hari Basuki Notobroto, dr. M.Kes
5. Penguji : Ria Sandy Deneska, dr. Sp.M(K)

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kami panjatkan kepada Allah SWT, karena hanya atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Bimbingan dan dorongan dari berbagai pihak selalu menjadikan semangat kami selama persiapan hingga penyelesaian tesis ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menghaturkan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. **Prof. Dr. Gatut Suhendro, dr., Sp.M(K)** sebagai pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, arahan, penelitian sebelumnya, dan membuka pola pikir penulis sebagai sumber dan ide dalam penyusunan tesis ini.
2. **Ria Sandy Deneska, dr. Sp.M(K)** sebagai pembimbing yang telah memberikan banyak koreksi dan dorongan agar segera menyelesaikan penyusunan tesis ini.
3. **Dr. dr. Dyah Fauziah, Sp.PA(K)** sebagai pembimbing Patologi Anatomi yang memberikan banyak arahan dalam pemrosesan specimen dan pembacaan specimen penelitian
4. **Dr. Hari Basuki, dr., M.Kes** sebagai konsultan statistika yang telah memberikan masukan mengenai statistika dan konsep penelitian dalam penyusunan tesis ini.
5. **Dr. Nurwasis, dr., SpM (K)** sebagai Kepala Departemen / SMF Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga / RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
6. **Dr. Evelyn Komaratih, dr., SpM(K)** sebagai Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga / RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah mengarahkan dan memotivasi saya untuk menyelesaikan tesis ini.
7. **Dr. Reni Prastyani, dr., SpM., M.Kes** selaku koordinator penelitian yang telah memberikan motivasi dan arahan dalam penyusunan tesis ini.
8. **Yulia Primitasari, dr., SpM(K)** sebagai ibu asuh yang telah mendukung dan banyak mengarahkan dalam pembuatan tesis ini.
9. **Para Guru Besar dan Staf Pengajar** Departemen Ilmu kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya, yang telah memberikan bantuan dan saran dalam penyusunan tesis ini.
10. **Rini Kusumawar Dhani, dr. Sp.M** yang telah memberikan motivasi dan arahan dalam penyusunan tesis ini.
11. **Yuyun Rindiasuti, dr. , Denisa Rosati, dr., Rizky Abdullah, dr.** yang telah membantu banyak dalam proses penelitian hingga terselesaikannya tesis ini.
12. **Tim Penelitian Stem Cell Research and Development Center, Universitas Airlangga.**
13. **Bapak/Ibu moderator dan sekretaris sidang**
14. **Teman-teman sejawat PPDS I** Departemen Ilmu Kesehatan Mata Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo

Surabaya yang telah memberikan bantuan dan dorongan semangat dalam penyusunan tesis ini

15. **Kedua orang tua saya, kedua mertua saya, dan suami saya tercinta Fardian Santoso** yang selalu mendukung dan mendoakan saya dalam setiap langkah saya.
16. **Anak hebat, Asceline Dyantari Santoso** yang telah bersabar dan menjadi sumber motivasi saya.
17. **Tim Audiovisual**

Semoga amal baik yang telah diberikan mendapat balasan yang setimpal serta mendapatkan berkah dan rahmat Allah SWT.

Surabaya, Februari 2020

Penulis



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TESIS UNTUK
KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai civitas akademika Universitas Airlangga, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Atina Yustisia Lestari, dr.

NIM : 011528016301

Program Studi : Ilmu Kedokteran Klinik

Departemen : Pascasarjana Fakultas :

Kedokteran Jenis Karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Airlangga Hak Bebas Royalti Noneksklusif atas tesis saya yang berjudul “Pengaruh Injeksi Intrasklera Sel Punca Mesenchymal Limbus Terhadap Ekspresi Mmp-3 Dan Timp-1 Sklera Pada Hewan Model Form Deprivatif Myopia (Studi Eksperimental In Vivo Pada *Oryctolagus Cuniculus*)”. Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Airlangga berhak menyimpan, mengalihmediakan, mengelola, dalam bentuk pangkalan data, merawat, dan mempublikasikan tesis saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis dan sebagai pemilik Hak Cipta. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, Februari 2020

Atina Yustisia Lestari, dr.
NIM 011518016301

RINGKASAN

Pengaruh Injeksi Intrasklera Sel Punca Mesenchymal Limbus Terhadap Ekspresi Mmp-3 Dan Timp-1 Sklera Pada Hewan Model Form Deprivatif Myopia (Studi Eksperimental In Vivo Pada *Oryctolagus Cuniculus*)

Atina Yustisia Lestari, Gatut Suhendro, Ria Sandy Deneska, Dyah Fauziyah, Hari Basuki Notobroto, Rizky Abdullah, Denisa Rosati

Myopia merupakan masalah kesehatan global yang meningkat prevalensinya dalam dekade terakhir. Peningkatan prevalensi myopia seiring dengan perubahan pola hidup digitalisasi sehingga meningkatkan aktivitas jarak dekat (*near work activity*). Studi oleh Wu *et al* (2019) menyebutkan ada populasi anak Asia usia sekolah dengan myopia, progresifitas myopia cukup tinggi berkisar 0,5-1.0 D pertahun. Berbagai metode pencegahan progresifitas myopia diteliti baik *in vitro*, *in vivo*, hingga *clinical trial*. Salah satu studi intervensi myopia skala besar saat ini ada adalah *Atropine for the Treatment of Myopia 1 dan 2* (ATOM 1 dan 2). Studi tersebut memberikan efek antimyopia dengan menghambat progresifitas hanya berkisar 1.38 ± 0.98 D, yang berbeda signifikan dibandingkan kontrol. Shinohara *et al* (2017) melakukan transplantasi *human dermal fibroblast* (hFbs) pada tikus wistar *form deprivation myopia* (FDM). Sebanyak 10.000 sel hFbs diinjeksikan subtenon pada limbus superior dan inferior kornea dengan jarum 30 *gauge*. Studi tersebut menunjukkan perbedaan yang bermakna status refraksi, panjang axila length, dan diameter serabut kolagen anantara kelompok. (Wu *et al.*, 2019; Shinohara *et al*, 2017; Chia *et al*, 2015; Shinohara *et al*, 2017).

Target terapi dalam intervensi myopia saat ini berfokus pada faktor pertumbuhan pada sklera dan sel fibroblas. Pada proses myopisasi terjadi penurunan level dopamine dalam retina. Hal tersebut menyebabkan peningkatan ekspresi dari *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) dalam retina, koroid, dan sklera. Sklera merupakan target jaringan dari sinyal pertumbuhan tersebut. Peningkatan TGF- β pada sklera menyebabkan penurunan FGF-2, penurunan produksi fibroblast, peningkatan ekspresi enzim *matrix metalloproteinases* (MMPs), dan penurunan inhibitor endogen MMP yaitu *tissue inhibitor metalloproteinase* (TIMPs). Keseimbangan antara MMPs/TIMPs meregulasi dari struktur *extra cellular matrix* (ECM) sehingga menjaga integritas dari lapisan sklera. Sel punca mesenkimal limbus merupakan sel pluripoten yang mampu berdiferensiasi bergantung dari *niche* menjadi fibroblas, chondrosit, adiposit, dan sel neuron. Sel punca mesenkimal limbus mampu meregulasi faktor pertumbuhan, dan membawa TIMPs eksogen. Kandungan pada sel punca tersebut diharapkan mampu meregulasi patobiologi yang terjadi pada myopia.

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh injeksi intrasklera sel punca mesenkimal limbus (SPML) terhadap ekspresi MMP-3 dan TIMP-1 pada sklera posterior hewan model. Pada penelitian ini isolasi dan kultur sel punca mesenkimal limbus menggunakan modifikasi Komaratih *et al* (2019). Isolasi SPML dengan metode semienzimatis. Media kultur primer pada kultur SPML ini diberikan suplementasi bFGF 5ng/mL. Sel punca tersebut positif terhadap ekspresi CD105, CD90, CD73, dan negative terhadap ekspresi CD45. Hewan

model form deprivative myopia (FDM) menggunakan 24 kelinci usia 2,5 bulan yang dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok kontrol (tanpa oklusi), kelompok FDM (dioklusi total selama enam minggu), dan kelompok FDM+SPML (dioklusi selama total 6 minggu, mendapat injeksi SPML intrasklera di minggu ke-4). Sel punca mesenkimal limbus diinjeksikan intrasklera di arah jam 10, 2,5 mm posterior dari limbus. Pemeriksaan dengan mikroskop imunofluoresen dilakukan untuk mengevaluasi migrasi SPML berlabel PKH26 ke sklera posterior. Pemeriksaan Imunohistokimia dilakukan dengan antibodi *polyclonal* MMP-3 (ABIN2777121, *antibodies-online.com*) dan antibodi *polyclonal* TIMP-1 (ABIN18607558, *antibodies-online.com*) digunakan untuk menilai ekspresi MMP-3 dan TIMP-1.

Hasil penelitian menunjukkan perubahan yang signifikan pada hasil streakretinoskopi (NEITZ, Tokyo, Japan) di minggu ke-4 pasca oklusi pada kelompok FDM ($p=0,001$) dan FDM+SPML ($p=0,001$), tidak pada kelompok kontrol ($p=0,066$). Namun saat membandingkan minggu ke-4 dan ke-6 belum didapatkan perbedaan yang bermakna. Konfirmasi streakretinoscopy dilakukan dengan *a-scan* biometri (*Quantel Medical. Lumibird*), didapatkan perbedaan bermakna pada kelompok kontrol ($p=0,021$), FDM ($p=0,001$), dan FDM+SPML ($p=0,002$) yang mengindikasikan bola mata mengalami pertumbuhan panjang axial. Namun pemanjangan *axial length* paling besar pada kelompok FDM. Hal tersebut selaras dengan hasil streakretinoscopy. Pada studi ini injeksi SPML intrasklera tidak berpengaruh pada ekspresi MMP-3 ($p=0,17$), tetapi berpengaruh pada ekspresi TIMP-1 pada kelompok SPML dibandingkan kontrol dan FDM ($p=0,004$ dan $p=0,015$). Berdasarkan penelitian ini tidak dapat dibuktikan pengaruh MMP-3 dalam proses myopisasi dan injeksi SPML. Penelitian lainnya oleh McBrein *et al* (2010) menyebutkan terdapat perbedaan yang signifikan dari ekspresi MMP-2 pada proses myopia dan terapi antimyopia. Sehingga menurunkan ekspresi MMPs merupakan salah satu evaluasi dari respon terapi. MMPs secara normal didapatkan pada jaringan ikat termasuk sklera. MMP-3 dominan diekspresikan oleh fibroblast, sedangkan MMP-2 diekspresikan oleh sel radang makrofag. Dalam penelitian ini, kami tidak dapat membedakan MMPs laten dan aktif, sehingga tidak dapat menghitung aktivitas dari enzim tersebut. Ekspresi yang positif pada IHC belum dapat menggambarkan aktivitas enzim protease tersebut. Serupa dengan penelitian lainnya TIMP-1 merupakan salah satu growth faktor yang dibawa oleh SPML. TIMP-1 memiliki sifat protektif dengan menghambat aktivitas hampir seluruh enzim MMPs. Aktivitas TIMP-1 menghambat MMPs tersebut dapat menjadi target terapi pada myopia. Oleh karena itu penggunaan SPML pada terapi myopia menjadi salah satu alternative terapi yang berpotensi untuk digali manfaatnya.

SUMMARY***Effect of Limbal Mesenchymal Stem Cell Intrasclera Injection on Mmp-3 and Timp-1 Sclera Expression in Animal Models Form Deprivation Myopia (In Vivo Experimental Study in Oryctolagus Cuniculus)***

Atina Yustisia Lestari, Gatut Suhendro, Ria Sandy Deneska, Dyah Fauziyah, Hari Basuki Notobroto, Rizky Abdullah, Denisa Rosati

Myopia is a global health problem which has increased in prevalence in the last decade. The increase in the prevalence of myopia is in line with changes in digitizing lifestyle and near work activity. Study by Wu et al (2019) states that at Asian school-age children with myopia, progression the disease is quite high ranging from 0.5-1.0 D per year. Various methods preventing myopia progression were investigated both in vitro, in vivo, and clinical trials. One of large-scale myopia intervention study currently in existence is Atropine for the Treatment of Myopia 1 and 2 (ATOM 1 and 2). This study provides antimyopia effect by inhibiting progression around 1.38 ± 0.98 D, which is significantly different than controls. Shinohara et al (2017) carried out a human dermal fibroblast (hFbs) transplant in myopia wistar form deprivation (FDM) mice. As many as 10,000 hFbs cells are injected subtenon by 30 gauge needle. The study showed significant differences in refraction status, axila length, and diameter of collagen fibers among groups. (Wu et al., 2019; Shinohara et al, 2017; Chia et al, 2015; Shinohara et al, 2017).

Currently therapeutic targets in myopia intervention focus on growth factors in sclera and fibroblast. In the process of myopisation, dopamine levels decrease in the retina. This causes an increase in the expression of Transforming Growth Factor- β (TGF- β) in the retina, choroid, and sclera. Sclera is a target tissue from this growth signal. Increased TGF- β in sclera decrease FGF-2 level, fibroblast production, increased expression of matrix metalloproteinases (MMPs), and decreased MMP endogenous inhibitors, tissue inhibitor metalloproteinases (TIMPs). The balance between MMPs/TIMPs regulates the extra cellular matrix (ECM) structure and maintain the integrity of the sclera layer. Limbal mesenchymal stem cell (LSMC) are pluripotent cells which able to differentiate depending on the niche into fibroblasts, chondrocytes, adipocytes, and neuron cells. LSMC are able to regulate growth factors, and carry exogenous TIMPs. Therefore LSMC expected to be able regulate the pathobiology that occurs in myopia.

This study aim to investigate capability of LSMC against myopic proces by reducing MMP-3 and increasing TIMP-1 expression in posterior sclera of animal models. In this study isolation and culture of LSMC using modified Komaratih et al (2019) by semienzymatic method. The primary culture media in LSMC was given bFGF supplementation of 5ng/mL. Cells were positive for CD105, CD90, CD73 expression, and negative for CD45 expression. Animal model form deprivative myopia (FDM) used twenty four 2.5-month-old rabbits divided into three groups consist of control group (without occlusion), FDM group (eye occlusion for six weeks), and FDM + LSMC group (eye occlusion for six weeks, got intrasclera LSMC injection in week 4th). LSMC are injected

intrasclera in the 10 o'clock direction at 2.5 mm posterior from limbus. Scanning immunofluorescence microscope was performed to evaluate the migration of the SPML labeled PKH26 to the posterior sclera. Immunohistochemical tests with MMP-3 polyclonal antibodies (ABIN2777121, antibodies-online.com) and TIMP-1 polyclonal antibodies (ABIN18607558, antibodies-online.com) were used to assess MMP-3 and TIMP-1 expression.

This study showed significant changes in the refraction status (examined by streakretinoscopy NEITZ, Tokyo, Japan) in the 4th week after occlusion in the FDM group ($p=0.001$) and FDM + LSMC ($p=0.001$), but not in the control group ($p=0.066$). However, when comparing the 4th and 6th weeks there were no significant differences. Confirmation of streakretinoscopy was done by a biometry scan (Quantel Medical. Lumibird), found significant differences in the control group ($p = 0.021$), FDM ($p = 0.001$), and FDM + SPML ($p = 0.002$) which indicated the all eyeball had elongation. However, the lengthening of axial length was greatest in the FDM group. This is consistent with the results of streakretinoscopy. In this study intrasclera LSMC injection had no effect on MMP-3 expression ($p = 0.17$), but affected TIMP-1 expression in the LSMC group compared to controls and FDM ($p = 0.004$ and $p = 0.015$). Based on this research, the effect of MMP-3 in the process of myopization and LSMC injection cannot be proven. Another study by McBrein et al (2010) stated that there were significant differences in the expression of MMP-2 in the process of myopia and antimyopia therapy. So reducing MMPs expression is therapeutic response that can be evaluated. MMPs are normally found in connective tissue including sclera. MMP-3 is dominantly expressed by fibroblasts, whereas MMP-2 is expressed by inflammatory macrophage. In this study, we were unable to distinguish between latent and active MMPs, so we were unable to calculate the activity of these enzymes. Positive expression on IHC has not been able to describe the activity of the enzyme. Similar to other studies, TIMP-1 is one of the growth factors brought about by LSMC. TIMP-1 has protective properties by inhibiting the activity of almost all MMPs enzymes. TIMP-1 activity in inhibiting MMPs can be a target of therapy in myopia.