

DISERTASI

**MEKANISME PERBAIKAN MEMORI SPASIAL DI HIPOKAMPUS
MELALUI PEMBERIAN ASAM DOCOSAHEKSANOAT (DHA) PADA
TIKUS JANTAN (*Rattus Norvegicus*) MODEL MALNUTRISI PROTEIN**



DIDIK DWI SANYOTO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

DISERTASI

**MEKANISME PERBAIKAN MEMORI SPASIAL DI HIPOKAMPUS
MELALUI PEMBERIAN ASAM DOCOSAHEKSANOAT (DHA) PADA
TIKUS JANTAN (*Rattus Norvegicus*) MODEL MALNUTRISI PROTEIN**

DIDIK DWI SANYOTO
011317017306

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

**MEKANISME PERBAIKAN MEMORI SPASIAL DI HIPOKAMPUS
MELALUI PEMBERIAN ASAM DOCOSAHEKSANOAT (DHA) PADA
TIKUS JANTAN (*Rattus Norvegicus*) MODEL MALNUTRISI PROTEIN**

DISERTASI

Untuk Memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan
Dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Akhir
Tahap 2 (Terbuka)

Hari : Kamis
Tanggal : 1 April 2021
Pukul : 10.00 – 12.00 WIB

Oleh:

DIDIK DWI SANYOTO
011317017306

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI

**MEKANISME PERBAIKAN MEMORI SPASIAL DI HIPOKAMPUS
MELALUI PEMBERIAN ASAM DOCOSAHEKSANOAT (DHA) PADA
TIKUS JANTAN (*Rattus Norvegicus*) MODEL MALNUTRISI PROTEIN**

YANG TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 5 April 2021

Oleh:
Promotor

Prof. Dr. Irwanto, dr., Sp.A (K)
NIP. 19650227 199003 1 010

Ko-Promotor

Prof. Dr. Abdurrachman, dr., M.Kes, PA (K)
NIP. 19660911 199601 1 001

Disertasi ini telah diuji dan dinilai
oleh panitia penguji Ujian Tahap I (Tertutup)
pada tanggal 25 Januari 2021

Panitia Penguji

Ketua : 1. Prof. Dr. I Ketut Suidana, Drs., M.S
Anggota : 2. Prof. Dr. Irwanto, dr., Sp.A (K)
3. Prof. Dr. Abdurachman, dr., M.Kes, PA(K)
4. Prof. Dr. Aulianni'am, drh, DES
5. Dr. Hanik Badriyah Hidayati, dr., Sp.S (K)
6. Dr. Reny I'tishom, M.Si
7. Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes
8. Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor: 18/UN3.1.1/HK/2021
Tanggal: 25 Januari 2021

UCAPAN TERIMA KASIH

Assalamu'alikum warahmutullahi wabarakatuh.

Alhamdulillahirobbil'alamin, segala puji syukur saya pajatkan ke hadirat Allah SWT, atas rahmat dan karunia-nya jualah penulis disertasi yang berjudul “Mekanisme perbaikan memori spasial di hipokampus melalui pemberian asam docosaheksanoat (DHA) pada tikus jantan (*rattus norvegicus*) model malnutrisi protein” dapat terselesaikan.

Penulisan disertasi ini dapat selesai dengan baik atas arahan, bimbingan, bantuan, masukan dari banyak pihak, oleh karena itu ijinkan saya dengan segala kerendahan hati mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

Prof. Dr. Irwanto, dr., Sp.A(K) selaku promotor yang dengan segala kesibukan beliau telah banyak memberikan waktu untuk konsultasi dalam rangka bimbingan, wawasan dan arahan, bahkan banyak memotivasi, memberi nasehat saya baik dalam rangka penulisan disertasi maupun selama proses menyelesaikan program doktor dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Abdurrachman, dr., M.Kes, PA(K) selaku ko-promotor dan juga sebagai penasehat akademik atas segala motivasi, bimbingan, arahan, nasehat, saran dan berbagi ilmu sehingga disertasi ini dapat terselesaikan. Terima kasih atas segala ilmu yang telah banyak saya dapatkan selama pendidikan maupun saat menyelesaikan disertasi ini.

Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS, selaku mantan promotor pertama saya yang telah memberikan motivasi, pencerahan, nasehat serta berbagi ilmu sehingga membuka wawasan saya dalam menyusun proposal disertasi saya ini. Terima kasih atas segala kebaikan yang telah banyak saya dapatkan.

Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., Ak., CMA., CA sebagai Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti pendidikan pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp.OG(K) sebagai Dekan dan Prof. Dr. Sutoyo, dr., Sp.U dan Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Sc., Sp.PD, K-EMD selaku mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga serta seluruh Wakil Dekan yang telah berkenan menerima saya sebagai mahasiswa pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr., Sp.OG(K) selaku Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor dan Prof. Dr. Joewono Soeroso, M.Sc., Sp.PD, KR, Finasim dan Prof. Dr. Teddy Ontoseno, dr., Sp,A(K), Sp.JP, FIHA selaku mantan ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor yang telah memberikan kesempatan maupun rekomendasi dalam urusan akademik selama penulis mengikuti perkuliahan hingga penyelesaian studi pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Sutarto Hadi, M.Si, M.Sc selaku Rektor Universitas Lambung Mangkurat yang telah memberikan kesempatan dan bantuan kepada saya dalam mengikuti perkuliahan pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Dr. Iwan Aflani, M.Kes, dr., Sp.F, SH, selaku Dekan pada Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Prof. Dr. Ruslan Muhyi, dr., Sp.A(K) dan Prof. Dr. Zairin Noor, dr., Sp.OT(K), MM selaku mantan dekan pada Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat yang ikut memberikan secara khusus motivasi kepada saya dalam menyelesaikan studi di Program Doktor ini.

Para dosen Program Studi Ilmu kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang terhormat: Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS, Prof. Dr. Harjanto JM, dr., AIFM (alm), Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs, M.Si, Dr. Widodo Jatim Pudjirahardjo, dr., MS, Prof. Dr. Indri Safitri Mukono, dr., MS, Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr., MS, Prof. Soetjipto, dr., MS., PhD, Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., Sp.BK, Toetik Koesbardiati, PhD, Prof. Dr. M. Zainudin, Apt, Dr. Siti Pariani, dr., MS, Dr. Susilowati Andayani, dr., MS, Dr. Florentina Sustini, dr., MS, Dr. Sunaryo, dr., MS, Prof. dr. Fedik Abdul Ratam, drh, Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes yang telah banyak memberikan pengetahuan dan pemahaman terhadap ilmu pengetahuan yang saya miliki.

Dosen penguji kualifikasi, penguji proposal, penguji kelayakan dan pengujian ujian tahap 1 (tertutup) disertasi saya pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga: Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS, Prof. Dr. Irwanto, dr., Sp.A (K), Prof. Dr. Abdurrachman, dr., M.Kes, PA(K), Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., M.S, Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes, Dr. Iwan Sahrial Hamid, drh., M.Si, Prof. Dr. Aulianni'am, drh, DES, Dr. Hanik Badriyah Hidayati, dr., Sp.S(K) dan Dr. Reny I'tishom, M.Si terima kasih atas masukan dan wawasan yang luar biasa tentang kajian ilmu untuk perbaikan disertasi ini.

Terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memberikan dana hibah melalui Hibah Doktor. Terima kasih kepada Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya yang telah memberikan masukan terhadap kajian dan metode yang saya ambil sebagai materi disertasi.

Terima kasih saya ucapkan kepada Kepala Laboratorium Biokimia beserta staf laboran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin dan membantu saya selama penelitian di Lab. Biokimia. Terima kasih juga saya tujukan kepada Dr. Karyono Mintarum, dr, Sp.PA beserta staf di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Staf LSIH Universitas Brawijaya Malang yang telah membantu saya di dalam menilai hasil pemeriksaan penelitian ini.

Sejawat saya di Divisi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat dr. Ahmad Husairi, M.Ag, M.Imun dan Dr. Oski Iliandri, dr., M.Kes, terima kasih atas motivasi dan dorongan moril kepada penulis. Kepada tim MEU FK ULM; dr. M. Bakhriansyah, M.Kes, M.Med.Ed, MSc, PhD, dr. Alfi Yasmina, M.Kes, M.Pd.Ked, PhD, dr. Hendra Wana Nur'amin, M.Sc dan dr. Pandji Winata Nurikhwan terima kasih telah banyak membantu saya dalam menulis disertasi ini.

Rekan-rekan mahasiswa Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga angkatan 2013 yang telah memberikan semangat dan rasa kebersamaan selama penulis menempuh

pendidikan. Terima kasih kepada mbak Andri, Mbak Fitri, Mbak Mita dan semua staf di Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas bantuannya selama penulis menempuh pendidikan Program Doktor.

Terima kasih ananda ucapkan kepada kedua orang tua saya Ayahanda Senan (alm) dan ibunda Sunarti, atas segala pengorbanan yang tak ternilai bagi kehidupan penulis dengan doa yang tak pernah putus yang telah diberikan kepada saya. Kepada Mertua saya Ibunda Wakijah, ananda haturkan terimakasih atas doa dan dukungannya. Kepada istri tercinta dan tersayang Dr. Triawanti, dr., M.Kes dan ananda Dimas Ikhsan Airlangga serta Alfadito Aulia Denova, terima kasih atas segala doa, kasih sayang dan dukungan yang sudah kalian berikan selama ini.

Terima kasih tak terhingga saya ucapkan untuk semua pihak yang sudah membantu yang namanya tidak dapat saya sebutkan satu persatu. Semoga Allah SWT membalas semua budi baik kalian semua. Harapan dan doa menyertai kehadiran disertasi ini dengan segala keterbatasan yang ada. Semoga dapat memberikan manfaat dan sumbangsih bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya bidang neurosains. Semoga Allah SWT selalu memberikan berkah dan hidayahNya dalam kehidupan kita. Amin.

Surabaya, Maret 2021

Penulis

RINGKASAN

MEKANISME PERBAIKAN MEMORI SPASIAL DI HIPOKAMPUS MELALUI PEMBERIAN ASAM DOCOSAHEKSANOAT (DHA) PADA TIKUS JANTAN (*Rattus Novergicus*) MODEL MALNUTRISI PROTEIN

Didik Dwi Sanyoto

Memori sangat penting dalam kehidupan manusia. Neuron dan astrosit berperan penting dalam proses memori, tidak terkecuali memori spasial. Salah satu penyebab gangguan memori spasial adalah malnutrisi protein. Kasus malnutrisi di Indonesia masih cukup banyak. Berbagai dampak merugikan malnutrisi protein terhadap otak menyebabkan gangguan konsolidasi memori dan mengganggu memori spasial. Memori spasial adalah suatu kemampuan baik pada manusia maupun pada hewan dalam mengetahui lokasi dirinya berada di lingkungan dan kemampuan melakukan navigasi secara efektif. Struktur otak yang bertanggung jawab terhadap memori spasial adalah Hipokampus. Malnutrisi protein dapat merusak hipokampus sehingga menyebabkan gangguan memori spasial. Langkah efektif untuk mengatasi dampak malnutrisi melalui asupan nutrisi yang penting yaitu DHA. DHA, merupakan asam lemak, secara fungsional terikat di FABP7. DHA berfungsi dalam modulasi *learning* dan *memory* melalui *up-regulasi* ekspresi gen PPAR γ di hipokampus. DHA juga berpengaruh pada astrosit berupa meningkatkan diferensiasi dan maturitas astroglia serta memicu pembentukan BDNF. BDNF berperan dalam plastisitas sinaptik dan memori. Astrosit memicu proliferasi *neural stem cells* (NSC) menjadi neural progenitor cells (NPC).

Penanggulangan malnutrisi sudah dilakukan dengan berbagai strategi, akan tetapi suplementasi DHA belum menjadi pilihan utama. Rehabilitasi nutrisi pada tikus malnutrisi menunjukkan peningkatan performa pada tes spasial memori hewan coba. DHA otak secara signifikan meningkatkan neurogenesis pada hipokampus. Peningkatan neurogenesis ini ditandai dengan peningkatan jumlah sel positif Tuj-1. Suplementasi DHA dapat meningkatkan performa neuropsikologi dan meningkatkan status DHA pada *infant* malnutrisi. Penanganan terhadap penderita gizi buruk selama ini, belum memasukkan unsur pemberian DHA sebagai bagian dari penanggulangan gizi buruk.

Berbagai penelitian tersebut di atas belum bisa menjelaskan bagaimana mekanisme DHA dapat meningkatkan fungsi kognitif pada anak yang mengalami malnutrisi. Dalam membuktikan dan mempelajari mekanisme DHA mengatasi gangguan kognitif pasca malnutrisi protein maka penelitian ini dilakukan pada hewan model malnutrisi yang diberi DHA, yang difokuskan pada peran astrosit dalam memperbaiki gangguan akibat malnutrisi. Tujuan penelitian ini adalah menjelaskan fisiogenesis perbaikan fungsi memori spasial pada hewan model malnutrisi protein dengan pemberian DHA.

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian *true experimental*. Rancangan penelitian ini adalah *Randomized posttest only with control group design*. Unit eksperimen dalam penelitian ini adalah anak tikus putih, jantan spesies *Rattus norvegicus* galur wistar, usia $\pm$ 21 hari, dalam kondisi sehat, yang telah mengalami perlakuan malnutrisi sejak dilahirkan. Teknik pengambilan

sampel pada masing-masing kelompok adalah secara *simple random allocation*, dan dibagi menjadi 3 kelompok, masing-masing 12 ekor perkelompok. Kelompok normal (KN) adalah kelompok yang tidak mengalami malnutrisi, kelompok kontrol (KK) adalah kelompok malnutrisi dan kelompok perlakuan (KP) adalah kelompok malnutrisi yang mendapat suplementasi DHA 1 mg/hari selama 6 minggu. Perlakuan malnutrisi dilakukan sejak anak tikus dilahirkan (post natal malnutrisi), dengan memberikan indukan pakan rendah protein (AIN-76) dengan kadar casein 6% hingga usia anak tikus 50 hari. Memasuki usia 51 hari anak tikus kelompok perlakuan (KP) diberi suplementasi DHA oral selama 6 minggu (42 hari). Usia ke-85 – 92 hari dilakukan latihan MWM. Pengukuran memori spasial (probe test) dilakukan di usia ke-93. Usia ke-94 dilakukan terminasi untuk mengambil otak dan dilakukan pemeriksaan imunofluoresence pada FABP7 dan PPAR γ , pemeriksaan imunohistokimia pada GFAP dan Tuj-1 serta pemeriksaan ELISA pada BDNF.

Hasil penelitian menunjukkan pemberian DHA berbeda bermakna untuk GFAP ($p=0,003$) dan memori spasial ($p=0,000$). namun tidak berbeda bermakna pada FABP7 ($p=0,159$), PPAR γ ($p=0,102$), Tuj-1 ($p=0,258$). Astrosit (GFAP) pada malnutrisi protein mengalami astrosit reaktif, sehingga jumlah astrositnya meningkat. Peningkatan jumlah astrosit ikut mempengaruhi ekspresi FABP7 dan PPAR γ . FABP7 memiliki selektif yang tinggi terhadap DHA. Pada otak dewasa, FABP7 diekspresikan oleh astrosit. Astrosit reaktif merupakan peristiwa sekunder. Astrosit reaktif disatu sisi bermanfaat namun disisi lain bisa merugikan. Astrosit reaktif yang bersifat sementara dapat memberikan dukungan trofik untuk akson yang beregenerasi, namun jika gangguan berlangsung lama dapat menghambat regenerasi akson. Malnutrisi protein dapat menyebabkan maladaptif sehingga menyebabkan disfungsi dari astrosit itu sendiri. Perlu ditelaah kembali hambatan pada jalur mana sehingga BDNF yang baru terbentuk tidak dapat bekerja dengan baik. Malnutrisi protein menyebabkan gangguan neuron di hipokampus sehingga mengganggu pola pengenalan dan konsolidasi memori. Kesimpulan: Suplementasi DHA dapat memperbaiki memori spasial akibat pembatasan protein.

Temuan baru pada penelitian ini adalah mekanisme peningkatan memori spasial pada malnutrisi protein yang di beri DHA, bukan terjadi melalui jalur FABP7 dan PPAR γ . Keterlibatan astrosit reaktif pada malnutrisi protein dalam jangka panjang bisa berakibat maladaptif bagi pemulihan memori spasial.

SUMMARY

MECHANISM OF SPATIAL MEMORY IMPROVEMENT IN HIPPOCAMPUS THROUGH DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA) SUPPLEMENTATION IN MALE RAT (*Rattus norvegicus*) MODEL OF PROTEIN MALNUTRITION

Didik Dwi Sanyoto

Memory is very important in human life. Neurons and astrocytes play an important role in memory processes, including spatial memory. One of the causes of spatial memory disorders is a protein malnutrition. There are still quite a lot of cases of malnutrition in Indonesia. The detrimental effects of protein malnutrition on the brain cause impaired memory consolidation and impair spatial memory. Spatial memory is the ability to recognize the environment and the ability to navigate effectively. The responsible brain structure for spatial memory is the hippocampus. Protein malnutrition can damage the hippocampus, causing spatial memory impairment. The effective steps to solve this problem are through the important nutrient, namely DHA. DHA is a functionally fatty acid bound to FABP7. DHA functions in modulation of learning and memory through up-regulation of PPAR γ gene expression in the hippocampus. DHA also affects astrocytes by increasing the differentiation and maturity of astroglia and triggering the formation of BDNF. BDNF plays a role in synaptic plasticity and memory. Astrocytes trigger the proliferation of neural stem cells (NSC) to become neural progenitor cells (NPC).

Various strategies have been carried out to solve the malnutrition problem. However, DHA supplementation has not become the main choice. Nutritional rehabilitation in malnourished mice showed improved performance on the spatial memory test of experimental animals. Brain DHA significantly increases neurogenesis in the hippocampus. This neurogenesis improvement is marked by an increase in the number of Tuj-1 positive cells. DHA supplementation can improve neuropsychological performance and improve DHA status in malnourished infants. So far, treatment of malnutrition patients has not included the element of giving DHA as part of overcoming malnutrition.

Several studies have not been able to explain how the DHA mechanism can improve cognitive function in malnourished children. Some studies investigate the mechanism of DHA to repair cognitive disorders after protein malnutrition. This study was conducted on malnutrition model animals with DHA treatment, which focused on the role of astrocytes in correcting disorders caused by malnutrition. This study aimed to explain the psychogenesis of improved spatial memory function in protein malnutrition animal models with DHA administration.

This was a randomized post-test only with a control group design. The experimental unit in this study was white rat pups, male species of *Rattus norvegicus* Wistar strain, age $\pm$ 21 days, in healthy condition, which had been malnourished since birth. We conducted simple random allocation and divided it into 3 groups, 12 individuals per group. The normal group (KN) was not malnourished, the control group (KK) was the malnutrition group and the

treatment group (KP) was the malnutrition group DHA supplementation 1 mg/day for 6 weeks. Malnutrition treatment was carried out since the pups were born (postnatal malnutrition), by providing broodstock of low protein feed (AIN-76) with 6% casein levels until the pups were 50 days old. At the age of 51 days, the pups in the treatment group (KP) were given oral DHA supplementation for 6 weeks (42 days). At the age of 85-92 days, the Morris Water Maze (MWM) test was carried out. The spatial memory measurement (probe test) was carried out at the age of 93. At the age of 94, the pups were terminated to take the brain and carried out immunofluorescence examinations for FABP7 and PPAR γ , immunohistochemical examinations on GFAP and Tuj-1, and ELISA examination on BDNF.

The results showed that DHA was significantly different for GFAP ($p=0.003$) and spatial memory ($p=0.000$) but not significantly different at FABP7 ($p=0.159$), PPAR γ ($p=0.102$), Tuj-1 ($p=0.258$). Astrocytes (GFAP) in protein malnutrition experience reactive astrocytes, so that the number of astrocytes increases. The increase in the number of astrocytes also affects the expression of FABP7 and PPAR γ . FABP7 is highly selective against DHA. In the adult brain, FABP7 is expressed by astrocytes. Reactive astrocytes are secondary events. Reactive astrocytes, on the other hand, are beneficial but on the other hand, can be detrimental. Transient reactive astrocytes can provide trophic support for regenerating axons, however, if the disturbance is prolonged it can inhibit axon regeneration. Protein malnutrition can be maladaptive, causing dysfunctionality of the astrocytes themselves. It is necessary to re-examine the obstacles on which route so that the newly formed BDNF cannot work properly. Protein malnutrition causes neurons in the hippocampus to disrupt pattern recognition and memory consolidation. Conclusion: DHA supplementation can improvement spasial memory due to protein restriction. .

This study found the new mechanism of increasing spacing of protein malnutrition given DHA, not through the FABP7 and PPAR γ pathways. The long-term involvement of reactive astrocytes in protein malnutrition can be maladaptive for spatial memory recovery.

ABSTRAK

**MEKANISME PERBAIKAN MEMORI SPASIAL DI HIPOKAMPUS
MELALUI PEMBERIAN ASAM DOCOSAHEKSANOAT (DHA) PADA
TIKUS JANTAN (*Rattus Novergicus*) MODEL MALNUTRISI PROTEIN**

Didik Dwi Sanyoto

Pendahuluan: Memori sangat penting dalam kehidupan manusia. Neuron dan astrosit berperan penting dalam proses memori, tidak terkecuali memori spasial. Salah satu penyebab gangguan memori spasial adalah malnutrisi. Berbagai dampak merugikan malnutrisi protein terhadap otak menyebabkan gangguan memori spasial. Langkah efektif untuk mengatasi dampak malnutrisi melalui asupan DHA. DHA berfungsi dalam modulasi *learning* dan *memory*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian DHA terhadap memori spasial melalui jalur FABP7, PPAR γ , GFAP, Tuj-1 dan BDNF.

Metode: Kelompok dibagi 3, satu kelompok normal, dua kelompok Pemberian pakan malnutrisi protein (AIN-76A) selama 50 hari sejak dilahirkan lalu diikuti suplementasi DHA pada kelompok perlakuan. Pada usia ke 90 dilakukan pengukuran memori spasial dan terminasi hewan untuk mengambil otak guna pengukuran FABP7, PPAR γ , GFAP, Tuj-1 dan BDNF.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada memori spasial ($p=0.000$), namun tidak ditemukan perbedaan bermakna pada FABP7, PPAR γ , GFAP, Tuj-1 dan BDNF.

Diskusi: Astrosit (GFAP) pada malnutrisi protein mengalami astrosit reaktif, sehingga jumlah astrositnya meningkat. Peningkatan jumlah astrosit ikut mempengaruhi ekspresi FABP7 dan PPAR γ . FABP7 memiliki selektif yang tinggi terhadap DHA. Astrosit reaktif yang bersifat sementara dapat memberikan dukungan trofik untuk akson yang beregenerasi, namun jika gangguan berlangsung lama dapat menghambat regenerasi akson. Gangguan kronik seperti malnutrisi protein, dapat berakibat maladaptif sehingga menyebabkan disfungsi dari astrosit itu sendiri. Malnutrisi protein menyebabkan penurunan neurogenesis hipokampus sehingga mengganggu pola pengenalan dan konsolidasi memori. Suplementasi DHA mampu memperbaiki memori spasial.

Kesimpulan: Pemberian DHA memperbaiki memori spasial pada hewan model malnutrisi protein, namun tidak terbukti melalui jalur PPAR γ , GFAP, Tuj-1 dan BDNF.

Kata Kunci: Malnutrisi protein, PPAR γ , GFAP, Tuj-1, memori spasial

ABSTRACT

**MECHANISM OF SPATIAL MEMORY IMPROVEMENT IN
HIPPOCAMPUS THROUGH DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA)
SUPPLEMENTATION IN MALE RAT (*Rattus norvegicus*) MODEL OF
PROTEIN MALNUTRITION**

Didik Dwi Sanyoto

Introduction: Memory is very important in human life. One of the causes of spatial memory disorders is a protein malnutrition. The detrimental effects of protein malnutrition on the brain cause impaired spatial memory. The effective steps to solve this problem are through the important nutrient, namely DHA. DHA functions in modulation of learning and memory. The purpose of this study was to assess the effect of DHA on spatial memory through the FABP7, PPAR γ , GFAP, Tuj-1 and BDNF pathways.

Methods: The rats were classified into 3 groups, namely, normal, malnutrition (control), and malnutrition supplemented with DHA (treatment). Protein malnutrition diet (AIN-76A) was given for 50 days since birth, followed by DHA supplementation in the treatment group. At 90 days, spatial memory was assessed, and the rats were terminated to obtain the brain for the measurements of FABP7, PPAR γ , GFAP, Tuj-1 and BDNF expression.

Results: Results showed that there was a significant difference in spatial memory ($p=0.000$), while there were no significant differences in the FABP7, PPAR γ , GFAP, Tuj-1 and BDNF expression.

Discussion: Astrocytes (GFAP) in protein malnutrition are reactive, leads to an increase in the total number of astrocytes. This increase affects the expressions of FABP7 and PPAR γ . FABP7 is highly selective to DHA. A chronic dysfunction, including protein malnutrition, may become maladaptive, which leads to astrocyte dysfunction. Protein malnutrition leads to a decrease in neurogenesis of hippocampus, causing a dysfunction in pattern recognition and memory consolidation. DHA supplementation may improve the spatial memory.

Conclusion: DHA supplementation increases the spatial memory in animal model of malnutrition, but the mechanism is not through the PPAR γ , GFAP, Tuj-1 and BDNF pathways.

Keywords: Protein malnutrition, PPAR γ , GFAP, Tuj-1, spatial memory

DAFTAR ISI

Sampul Dalam	i
Lembar Awal Disertasi	ii
Lembar Prasyarat Gelar	iii
Lembar Pengesahan	iv
Penetapan Panitia Penguji	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	ix
<i>Summary</i>	xi
Abstrak	xiii
<i>Abstract</i>	xiv
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
DAFTAR SINGKATAN	xxii

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1	Latar Belakang	1
1.2	Rumusan Masalah	4
1.3	Tujuan Penelitian	5
1.3.1	Tujuan umum penelitian	5
1.3.2	Tujuan khusus penelitian	5
1.4	Manfaat Penelitian	6
1.4.1	Manfaat teoritis	6
1.4.2	Manfaat praktis	6

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1	Memori	7
2.1.1	Struktur otak penyimpan memori	7
2.1.2	Peran neuron dalam fungsi <i>learning and memory</i>	12
2.1.3	Gangguan memori akibat malnutrisi protein	15
2.1.4	Alat untuk mengukur memori	18
2.2	Astrosit	19
2.2.1	Peran astrosit dalam fungsi <i>learning dan memory</i>	19
2.2.2	Gangguan pada astrosit akibat malnutrisi Protein	23
2.3	Malnutrisi	27
2.3.1	Definisi malnutrisi	27
2.3.2	Rehabilitasi nutrisi pasca malnutrisi	30
2.4	<i>Docosaheksanoat Acid</i> (DHA)	30
2.4.1	Metabolisme DHA	30
2.4.2	Pengaruh DHA terhadap astrosit	32
2.4.3	Peran FABP7 dalam metabolisme DHA	34
2.4.4	Peran DHA dalam memori melalui jalur PPARs	39
2.4.5	Peran DHA dalam memori melalui jalur BDNF	42

2.4.6	Efek gangguan metabolisme asam lemak akibat malnutrisi	46
2.5	Sel Induk	49
2.5.1	Peran sel induk dalam fungsi kognitif	49
2.5.2	Pengaruh DHA terhadap neurogenesis	56
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1	Kerangka Konseptual	59
3.2	Hipotesis Penelitian	63
BAB 4	METODE PENELITIAN	
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	64
4.2	Unit Eksperimen, Replikasi dan Randomisasi	65
4.2.1	Unit eksperimen	65
4.2.2	Replikasi	65
4.2.3	Kriteria inklusi	66
4.2.4	Kriteria eksklusi	66
4.2.5	Kriteria putus uji	66
4.2.6	Randomisasi	66
4.3	Variabel Penelitian	67
4.3.1	Klasifikasi variabel	67
4.3.2	Definisi operasional variabel	67
4.4	Bahan dan Alat Penelitian	70
4.4.1	Bahan	70
4.4.2	Alat	71
4.4.3	Prosedur eksperimen dan pengamatan	71
4.5	Protokol Penelitian	79
4.5.1	Alur pelaksanaan penelitian	75
4.5.2	Prosedur pelaksanaan penelitian	80
4.6	Tempat Penelitian	82
4.7	Waktu Penelitian	82
4.8	Pengumpulan dan Penyajian Data serta Analisis Statistik	82
4.9	Kelayakan Etik	83
BAB 5	HASIL PENELITIAN	
5.1	Pengaruh DHA terhadap Ekspresi FABP7	86
5.2	Pengaruh DHA terhadap Ekspresi PPAR γ	89
5.3	Pengaruh DHA terhadap Ekspresi GFAP	91
5.4	Pengaruh DHA terhadap Kadar BDNF	93
5.5	Pengaruh DHA terhadap Ekspresi Tuj-1	95
5.6	Pengaruh DHA terhadap Memori Spasial	97
5.7	Analisis Jalur Mekanisme Perbaikan Memori Spasial oleh DHA Pada Tikus Model Malnutrisi Protein	99
BAB 6	PEMBAHASAN	
6.1	Pengaruh DHA terhadap Ekspresi FABP7	102
6.2	Pengaruh DHA terhadap Ekspresi PPAR γ	106
6.3	Pengaruh DHA terhadap Ekspresi GFAP	108
6.4	Pengaruh DHA terhadap Kadar BDNF	113
6.5	Pengaruh DHA terhadap Ekspresi Tuj-1	115

6.6	Pengaruh DHA terhadap Memori Spasial	118
6.7	Analisi Jalur Mekanisme Perbaikan Memori Spasial oleh DHA	123
6.8	Kebaruan Penelitian	124
6.9	Keterbatasan Penelitian	125

BAB 7 PENUTUP

7.1	Kesimpulan	126
7.2	Saran	126

DAFTAR PUSTAKA
LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Area otak yang berperan dalam <i>learning</i> dan <i>memory</i>	10
Tabel 2.2 Ekspresi berbagai tipe dari gen FABP	36
Tabel 4.1 Definisi operasional variabel penelitian	67
Tabel 5.1 Kadar protein darah pada sampel tikus malnutrisi	84
Tabel 5.2 Berat badan tikus sebelum <i>probe test</i>	86
Tabel 5.3 Perbedaan rerata berat badan tikus pada analisis LSD	86
Tabel 5.4 Rerata ekspresi FABP7 di astrosit	87
Tabel 5.5 Rerata ekspresi PPAR γ di astrosit	91
Tabel 5.6 Rerata ekspresi GFAP di hipokampus	93
Tabel 5.7 Perbedaan rerata ekspresi GFAP di hipokampus pada analisis LSD	93
Tabel 5.8 Rerata kadar BDNF hipokampus	94
Tabel 5.9 Rerata ekspresi Tuj-1 di gyrus dentatus hipokampus	97
Tabel 5.10 Rerata nilai memori spasial	98
Tabel 5.11 Perbedaan rerata nilai memori spasial pada analisis LSD	98

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Struktur hipokampus beserta lapisan CA1 dan CA3	7
Gambar 2.2	Kejadian molekuler yang mendasari awal dan akhir LTP	12
Gambar 2.3	Perbandingan perkembangan otak tikus dan otak manusia	16
Gambar 2.4	Skema rangkuman fungsi astrosit pada sistem saraf pusat yang sehat	21
Gambar 2.5	Skema rangkuman pemicu dan regulasi molekuler pada astrosit reaktif	25
Gambar 2.6	Desaturasi, elongasi dan konversi balik dari <i>polyunsaturated fatty acids</i> (PUFA)	32
Gambar 2.7	Model internalisasi asam lemak di neuron	35
Gambar 2.8	Skema jalur <i>signalling</i> PUFA pada <i>neurogenic niche</i>	38
Gambar 2.9	Sintesis, perjalanan dan <i>signalling</i> reseptor dari BDNF	45
Gambar 2.10	Neuron dihasilkan pada zona subgranul <i>gyrus dentatus</i> Hipokampus	55
Gambar 3.1	Kerangka konseptual	59
Gambar 4.1	Rancangan penelitian	64
Gambar 4.2	Model <i>Morris Water Maze</i>	73
Gambar 4.3	Alur pelaksanaan penelitian	79
Gambar 4.4	Kerangka analisis jalur	83
Gambar 5.1	Rerata berat badan tikus sebelum uji <i>Morris Water Maze</i> dilakukan. (KN: tikus normal, KK: tikus malnutrisi + pakan standar, KP: tikus malnutrisi + pakan standard + DHA 1 mg; p=0,000)	85
Gambar 5.2	Rerata ekspresi FABP7 di astrosit hipokampus (KN: tikus normal, KK: tikus malnutrisi + pakan standar, KP: tikus malnutrisi + pakan standard + DHA 1 mg; p=0,159).	87
Gambar 5.3	Ekspresi FABP7 di astrosit pada hipokampus dengan pewarnaan imunofluoresensi, menggunakan CLSM, pembesaran 400x. Ekspresi FABP7 di astrosit ditandai dengan tanda panah (KN=Kelompok Normal, KK=Kelompok Kontrol, KP=Kelompok Perlakuan).	88
Gambar 5.4	Rerata ekspresi PPAR γ di Astrosit hippocampus (KN: tikus normal, KK: tikus malnutrisi + pakan standar, KP: tikus malnutrisi + pakan standard + DHA 1 mg; p=0,102).	89
Gambar 5.5	Ekspresi PPAR γ di astrosit pada hipokampus dengan pewarnaan imunofluoresensi, menggunakan CLSM, pembesaran 400x. Ekspresi PPAR γ di astrosit ditandai dengan tanda panah (KN=Kelompok Normal, KK=Kelompok Kontrol, KP=Kelompok Perlakuan).	90
Gambar 5.6	Rerata jumlah ekspresi GFAP (astrosit) pada hipokampus tikus setelah perlakuan (KN: tikus normal, KK: tikus malnutrisi + pakan standar, KP: tikus malnutrisi + pakan standard + DHA 1 mg; p=0,003).	91
Gambar 5.7	Ekspresi GFAP (astrosit) pada hipokampus dengan	92

	pewarnaan imunohistokimia, menggunakan mikroskop Olympus BX 51 dan kamera Olympus DP71, pembesaran 400x. Astrosit ditandai dengan tanda panah (KN=Kelompok Normal, KK=Kelompok Kontrol, KP=Kelompok Perlakuan).	
Gambar 5.8	Rerata kadar BDNF hipokampus tikus setelah perlakuan (KN: tikus normal, KK: tikus malnutrisi + pakan standar, KP: tikus malnutrisi + pakan standard + DHA 1 mg; $p=0,514$).	94
Gambar 5.9	Rerata jumlah ekspresi Tuj-1 pada gyrus dentatus hipokampus (KN: tikus normal, KK: tikus malnutrisi + pakan standar, KP: tikus malnutrisi + pakan standard + DHA 1 mg; $p=0,258$).	95
Gambar 5.10	Ekspresi Tuj-1 (NPC) pada <i>gyrus dentatus</i> hipokampus dengan pewarnaan imunohistokimia, menggunakan mikroskop Olympus BX 51 dan kamera Olympus DP71, pembesaran 400x. NPC ditandai dengan tanda panah (KN=Kelompok Normal, KK=Kelompok Kontrol, KP=Kelompok Perlakuan).	96
Gambar 5.11	Rerata nilai memori spasial (<i>Probe test</i>). (KN: tikus normal, KK: tikus malnutrisi + pakan standar, KP: tikus malnutrisi + pakan standard + DHA 1 mg; $p=0,000$).	97
Gambar 5.12	Analisi jalur mekanisme perbaikan memori spasial oleh DHA pada malnutrisi protein	99

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Profil hewan coba (tikus) 144
Lampiran 2	Sarana dan prasarana pemeliharaan tikus 145
Lampiran 3	Dosis/cara pemberian DHA 146
Lampiran 4	Tabel kandungan pakan AIN-76A 147
Lampiran 5	Tabel kandungan pakan standar BR1 148
Lampiran 6	Produk DHA yang digunakan 149
Lampiran 7	Keterangan kelaikan etik 150
Lampiran 8	Uji hewan 151
Lampiran 9	Hasil pemeriksaan lab 152
Lampiran 10	Hasil pemeriksaan kadar BDNF pada hipokampus 153
Lampiran 11	Hasil Pengukuran Berat badan tikus (gram) saat usia 90 hari 155
Lampiran 12	Hasil pemeriksaan ekspresi FABP7 di astrosit hipokampus 156
Lampiran 13	Hasil pemeriksaan ekspresi PPAR γ di astrosit hipokampus 157
Lampiran 14	Nilai Rerata hasil pemeriksaan ekspresi GFAP (astrosit) pada hipokampus 158
Lampiran 15	Nilai rerata hasil pemeriksaan ekspresi Tuj-1 (jumlah <i>neural progenitor cells</i>) pada <i>gyrus dentatus</i> hipokampus 159
Lampiran 16	Perhitungan Statistik 160
Lampiran 17	Foto-foto penelitian 165

DAFTAR SINGKATAN

AA	<i>Arachidonic Acid</i>
AHN	<i>Adult Hippocampal Neurogenesis</i>
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
ALA	<i>α Linoleic Acid</i>
AMPA	<i>α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionate</i>
Ang-2	<i>Angiopoietin-2</i>
ARA	<i>Arachidonic acid</i>
ATP	<i>Adenosin Triphosphat</i>
BB	<i>Berat Badan</i>
BBB	<i>Blood Brain Barrier</i>
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>
BLBP	<i>Brain Lipid Binding Protein</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic protein</i>
β -AR	<i>β-Adrenergic Receptor</i>
CA	<i>Cornu Ammonis</i>
CaMK	<i>Calmodulin-dependent protein kinase</i>
CaMKII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CB	<i>Cannabinoid</i>
CBP	<i>CREB Binding Protein</i>
CCR1	<i>C-C Chemokine receptor type 1</i>
CCR2	<i>C-C Chemokine receptor type 2</i>
CCR5	<i>C-C Chemokine receptor type 5</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CNTF	<i>Cilliaris Neurotrophic Factor</i>
CREB	<i>Cyclic AMP Respon Binding Protein</i>
CRE	<i>Cyclic AMP Respon element</i>
DAB	<i>Diaminobenzidine</i>
DHA	<i>Decosaheptaenoic Acid</i>
EAAC	<i>Excitatory Amino Acid Corner</i>
EAAT	<i>Excitatory Amino Acid Transporter</i>
EET	<i>Epoxyeicosatrienoic Acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EPA	<i>Eicosapentaenoic Acid</i>
EphB1-B3	<i>Ephrin type-B1-B3 receptor</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FABP	<i>Fatty Acid Binding Protein</i>
FABP3	<i>Fatty Acid Binding Protein 3</i>
FABP5	<i>Fatty Acid Binding Protein 5</i>
FABP7	<i>Fatty Acid Binding Protein 7</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGF-2	<i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
eCBs	<i>Endocannabinoids</i>
GABA	<i>γ-Aminobutyric Acid</i>

GDNF	<i>Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GFAP+	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein positif</i>
GLT	<i>Glutamate Transporter</i>
GLAST	<i>Glutamate Aspartat Transporter</i>
GLUT	<i>Glucose Transporter Protein</i>
GRO α	<i>Growth-regulated oncogene α</i>
GPR40	<i>G-Protein Receptor 40</i>
GRP	<i>Glial Radial Precursor</i>
GS	<i>Glutamine Sintetase</i>
GSNO	<i>Glutasion Nitrit Oxide</i>
HETE	<i>Hydroxyeicosatetraenoic Acid</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IEGs	<i>Immediate-Early Genes</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1β</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
iPLA2	<i>Independent Phosfolifase A2</i>
IUGR	<i>Intrauterine Growth Restriction</i>
I-TEC	<i>Interferon-inducible T-cell</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
kDA	kilo Dalton
KEP	Kurang Energi Protein
Kg	Kilo gram
KN	Kelompok Normal
KK	Kelompok Kontrol
KP	Kelompok Perlakuan
KVA	Kekurangan Vitamin A
LA	<i>Linoleic Acid</i>
LC-PUFA	<i>Long Chain-Polyunsaturated Fatty Acid</i>
LIF	<i>Leukemia Inactivated Factor</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LTM	<i>Long Term Memory</i>
LTP	<i>Long Term Potentiation</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MBD-1	<i>Methyl-CpG-Binding Domains-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MWM	<i>Morris Water Maze</i>
NAP-2	<i>Neutrophil Activating Peptide 2</i>
Ngn	<i>Neurogenin</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-Aspartat Acid</i>
NO	<i>Nitrit Oxide</i>
NPC	<i>Neural Progenitor Cells</i>
NSC	<i>Neural Stem Cells</i>

NSPCs	<i>Neural Stem/Progenitor Cells</i>
OD	<i>Densitas optic</i>
PA	<i>Patologi Anatomi</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline Tablets</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PDGF-AA	<i>Platelet Derived Growth Factor-AA</i>
PDGF-BB	<i>Platelet Derived Growth Factor-BB</i>
PDGFc	<i>Platelet Derived Growth Factor-c</i>
PEM	<i>Protein Energy Malnutrition</i>
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PLA ₂	<i>Phospholipase A₂</i>
PLC _g	<i>Phospholipase C gamma</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3 Kinase</i>
PPARs	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptors</i>
PPAR α	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptors Alfa</i>
PPAR β/δ	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptors Beta/Delta</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptors Gamma</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
RAM	<i>Radial Arm Maze</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted</i>
RBD	<i>Regional Basic Diet</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SGZ	<i>Subgranule Zone</i>
Shh	<i>Sonic hedgehod</i>
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solutions</i>
SVZ	<i>Subventricel Zone</i>
SSP	<i>Sistem Saraf Pusat</i>
STAT	<i>Signal Transducers And Activators of Transcription</i>
STAT3	<i>Signal Transducers And Activators of Transcription 3</i>
SSRI	<i>Selective Serotonin (5-HT) Reuptake Inhibitors</i>
TB	<i>Tinggi Badan</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TGF- β_1	<i>Transforming Growth Factor β_1</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TrKB	<i>Tropomyosin receptor Kinase B</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGF-C	<i>Vascular Endothelial Growth Factor C</i>