

seluruh keluarga besar RS PHC Surabaya yang telah banyak membantu dan memberikan dorongan. Saya menyampaikan terima kasih yang tidak terhingga.

Saya sampaikan rasa hormat dan kasih sayang dari lubuk hati yang paling dalam kepada : orang tua saya Bapak (Alm) Soedarminto, drs. dan Ibu Istilah yang telah mengasuh, membesarkan dan mendidik serta mengayomi dengan penuh kasih sayang. Mertua saya (Alm) Bapak Imam Hasan, drs. dan Ibu Lilik Fauziati yang telah mendampingi dan membimbing dalam menjalani kehidupan ini. Kepada kakak-kakak dan adik-adik, saya sampaikan terima kasih yang tak terhingga atas dukungannya selama ini.

Akhirnya pada kesempatan ini saya sampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada suami saya tercinta Roslan Yusni, dr., Sp.BS dan anak-anak saya tercinta Maharani Kartika Anggraeni dan Narendra Lintang Yudhisthira atas dukungan, semangat, kasih sayang, pengertian, pengorbanan, kesabaran dan doa sehingga pendidikan ini bisa diselesaikan. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan rahmat dan hidayahNya kepada kami sekeluarga.

Terima kasih saya sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yangtelah memberi motivasi dan bantuan hingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi saya, kemajuan ilmu pengetahuan di bidang kedokteran khususnya Ilmu Kesehatan Mata dan bagi pasien-pasien glaukoma sehingga ada harapan untuk dapat melihat dunia kembali. Semoga Allah SWT melimpahkan taufik dan hidayahNya kepada kita semua dalam menjalani hidup ini.

Aamiin Yaa Robbal Alamiin.

RINGKASAN

PENURUNAN APOPTOSIS DAN PENINGKATAN JUMLAH SEL GANGLION RETINA PASCA PENURUNAN TEKANAN INTRA OKULER PADA MODEL HEWAN GLAUKOMA AKUT SETELAH TRANSPLANTASI SEL PUNCA MESENKIMAL SUMSUM TULANG PRAKONDISI HIPOKSIA

Glaukoma merupakan kelompok penyakit yang khas ditandai adanya kerusakan papil saraf optik (*glaucomatous optic neuropathy/GON*), diikuti dengan penyempitan lapang pandangan dan peningkatan tekanan intra okular (TIO) sebagai faktor resiko utama. Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) glaukoma adalah penyebab utama kedua kebutaan di dunia setelah katarak. Glaukoma juga menjadi penyebab kebutaan kedua di Indonesia sesudah katarak, tetapi merupakan penyebab utama kebutaan permanen

Transplantasi sel punca merupakan salah satu pilihan terapi saat ini yang diharapkan dapat menghentikan progresifitas kerusakan papil saraf optik akibat glaukoma yang akhirnya akan menyebabkan kebutaan yang permanen. Tujuan utama transplantasi sel punca atau sel progenitor pada terapi glaukoma diharapkan bermanfaat untuk regenerasi disfungsi sel ganglion retina (SGR) dan sebagai neuroproteksi di mana sel-sel yang ditransplantasikan melindungi SGR endogen. Saat ini hanya sebagian kecil sel yang ditransplantasikan dapat berintegrasi ke dalam retina host. Salah satu strategi yang dapat dilakukan untuk meningkatkan keberhasilan sel punca yang ditransplantasikan di lingkungan iskemia adalah memanipulasi sel donor *in vitro* dengan memprakondisikan sel donor sebelum ditransplantasikan. Prakondisi hipoksia (PH) sel punca merupakan salah satu manipulasi sel donor dengan mengkondisikan hipoksia secara *in vitro* sebelum sel punca tersebut ditransplantasikan.

Tujuan penelitian ini adalah mengungkap mekanisme penurunan proses apoptosis sel ganglion retina dan peningkatan jumlah sel ganglion retina pasca peningkatan tekanan intra okuler setelah dilakukan transplantasi sel punca mesenkimal sumsum tulang prakondisi hipoksia. Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap yaitu secara *invitro* dan *invivo*. Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental* yang dilakukan di laboratorium. Rancangan penelitiannya menggunakan rancangan *pre test and post test control group design*. Pada penelitian *invitro*, kultur sel punca mesenkimal sumsum tulang dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kondisi normoksia (O_2 21%) dan kelompok yang diberikan perlakuan hipoksia (O_2 1% selama 24 jam). Pada penelitian *invivo* ada 24 tikus jenis Sprague Dawley yang dibagi secara random menjadi empat kelompok yang dinaikkan tekanan intra okulernya 100 - 120 mmHg selama 60 menit kemudian diturunkan untuk membuat model hewan glaukoma akut. Kelompok KG 0 (kelompok preperlakuan) digunakan sebagai kelompok preperlakuan untuk kelompok KG1, KG2 dan KG3. Kelompok KG1(kelompok kontrol 1 bulan) merupakan kelompok yang tidak ditransplantasikan sel punca mesenkimal sumsum tulang dan ditunggu sampai 5 minggu pasca penurunan TIO. Kelompok KG2 (kelompok SC normoksia) ditransplantasikan sel punca mesenkimal sumsum tulang yang normoksia (O_2 21%) dan kelompok KG3 (kelompok SC hipoksia)

ditransplantasikan sel punca mesenkimal sumsum tulang prakondisi hipoksia (O_2 1% selama 24 jam) setelah satu minggu peningkatan TIO dan diterminasi setelah 4 minggu pasca transplantasi. .

Pada penelitian invitro, karakterisasi sel punca mesenkimal sumsum tulang diperiksa menggunakan metode imunositokimia dan *flowcytometry*. Sel punca mesenkimal sumsum tulang diperiksa ekspresi HIF-1 α , VEGF-A, VEGF-A165b dan Hsp27 dengan menggunakan metode imunositokimia. Sel punca mesenkimal sumsum tulang yang ditransplantasikan dilabeling menggunakan PKH 26. Pada penelitian invivo jaringan retina diperiksa sel yang mengekspresikan VEGF-A165b, VEGFR-2 pada Brn3b (sel ganglion retina), Hsp27, TGF β -1 pada mikroglia (CD11b), apoptosis dan Brn3b (sel ganglion retina) menggunakan metode imunohistokimia.

Hasil penelitian invitro karakterisasi sel punca mesenkimal sumsum tulang menggunakan metode imunositokimia CD45 didapatkan sebagian kecil sel yang positif sedangkan sebagian besar negatif, sedangkan pada CD 105 didapatkan sebagian besar positif dan sebagian kecil negatif baik pada sel punca mesenkimal sumsum tulang normoksia dan hipoksia 1% tidak didapatkan perbedaan jumlah perpendaran fluoresensi. Pada hasil karakterisasi sel punca mesenkimal sumsum tulang menggunakan metode *flowcytometry* didapat jumlah sel yang mengekspresikan CD45 negatif, CD 34 negatif dan CD 105 positif pada normoksia 86.940% sedangkan yang hipoksia 92.83%. Jumlah sel yang mengekspresikan CD 45 negatif, CD 34 negatif dan CD 90 positif pada normoksia 76.153% sedangkan yang hipoksia 75.310%.

Pada hasil penelitian invitro imunositokimia sel punca mesenkimal sumsum tulang terjadi peningkatan jumlah sel yang mengekspresikan HIF-1 α , Hsp 27 dan VEGFA-165b pada hipoksia 1% selama 24 jam dibandingkan dengan normoksia. Tidak terjadi peningkatan ekspresi dari VEGF-A pada hipoksia 1% dan normoksia.

Pada hasil penelitian invivo didapatkan peningkatan yang signifikan dengan $p < 0,05$ pada ekspresi VEGF-A165b, Hsp 27, dan sel ganglion retina (Brn3b) dan penurunan apoptosis pada kelompok yang ditransplantasikan sel punca mesenkimal sumsum tulang hipoksia 1% dibandingkan dengan semua kelompok yang lain. Terjadi peningkatan yang signifikan $p < 0,05$ jumlah sel yang mengekspresikan VEGF-R2 pada sel ganglion retina (Brn3b) dan TGF- β 1 pada mikroglia (CD11b) dibandingkan dengan kelompok preperlakuan dan SC normoksia. Terjadi peningkatan yang signifikan $p < 0,05$ jumlah sel ganglion retina pada semua kelompok dibandingkan dengan preperlakuan.

Kesimpulan penelitian ini adalah transplantasi sel punca mesenkimal sumsum tulang prakondisi hipoksia pada pasca penurunan tekanan intra okuler model hewan glaukoma akut, memberikan hasil yang signifikan dalam menurunkan apoptosis dan meningkatkan jumlah SGR. Peningkatan jumlah SGR melalui mekanisme autokrin sehingga sel punca yang ditransplantasikan bisa bertahan hidup pada lingkungan iskemia dan melalui efek parakrin sehingga memberikan efek neuroproteksi terhadap SGR dan sel punca endogen, deaktifasi mikroglia sehingga menghasilkan *cytokine* antiinflamasi dan merangsang sel punca untuk proliferasi dan diferensiasi.

SUMMARY

APOPTOSIS REDUCTION AND RETINAL GANGLION CELLS ENHANCEMENT POST INTRA OCULAR PRESSURE REDUCTION ON ACUTE GLAUCOMA ANIMAL MODELS AFTER HYPOXIA PRECONDITIONS MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION

Glaucoma is a group of diseases which is characterized by typical damage the optic nerve (glaucomatous optic neuropathy / GON), followed by a narrowing of the visual field and increased intraocular pressure (IOP) as a major risk factor. According to the World Health Organization (WHO), glaucoma is the second leading cause of blindness in the world after cataract. Glaucoma is also the second leading cause of blindness after cataract in Indonesia, but it is a major cause of permanent blindness.

Stem cell transplantation is a treatment option at this time which is expected to halt the progressive damage to the optic nerve papil caused by glaucoma that eventually will lead to permanent blindness. The main purpose of stem cell transplantation in glaucoma therapy is expected to be useful for the regeneration of dysfunction retinal ganglion cells (RGCs) and as a neuroprotector in which the cells transplanted protect endogenous RGCs. Currently, only a small fraction of transplanted cells can integrate into the host retina. One of strategies that can be done to increase the success of transplanted stem cells in ischemic environment is manipulate the *in vitro* donor cells condition before the transplanted. Preconditions hypoxia (PH) stem cell is one of donor cell manipulation *in vitro* hypoxic condition before the stem cells are transplanted.

The purpose of this study is to reveal the mechanism of reduction RGCs apoptosis and an increased number of RGCs post an increase in IOP after transplantation of bone marrow-mesenchymal stem cell (BM-MSCs) hypoxia preconditions. This research was conducted in two stages: *in vitro* and *in vivo*. This type of research is conducted in the true experimental laboratory. The study design was used pre test and post test only control group design. In the *in vitro* study, BM-MSCs cultures were divided into two groups: normoxia conditions (O₂ 21%) and hypoxia conditions (1% O₂ for 24 hours). *In vivo* study, there are twenty four *Sprague dawley* rats that were randomly divided into four groups and induced by elevated intraocular pressure (IOP) 100-120 mmHg for 60 minutes, afterwards the IOP is being decreased to make acute glaucoma animal models. KG0 was used as pretreatment for KG1, KG2 and KG3. KG1 group is a group that was not transplanted with stem cells and waits until 5 weeks post an increase in IOP. KG2 was transplanted with normoxia BM-MSCs (O₂ 21%) and KG3 was transplanted with preconditi on hypoxia BM-MSCs (1% O₂ for 24 hours) one week post an increase in IOP and terminated after 4 weeks post-transplantation.

On *in vitro* study, the characterization of BM-MSCs examined using imunocytochemistry and flowcytometry methods. BM-MSCs expression of HIF-1 α , VEGF-A, VEGF-A165b and Hsp27 is examined by using the method immunocytochemistry. Labeling transplanted BM-MSCs are using PKH 26. *In vivo* study examined retinal tissue cells expressing VEGF-A165b, VEGFR-2 on

Brn3b (RGCs), Hsp27, TGF β -1 on microglia (CD11b), apoptosis and Brn3b (RGCs) using immunohistochemical methods.

The results of *in vitro* studies of BM-MSCs characterization using CD45 immunocytochemistry methods obtained a small fraction of positive cells, whereas most of the others are negative, while the CD 105 is obtained mostly positive and small fraction of negative both on BM-MSCs normoxia or 1% hypoxia did not found any differences in the amount of fluorescence. On the results of BM-MSCs characterization using flowcytometry method obtained the number of cells that express CD45 negative, CD 34 negative and CD 105 positive on normoxia 86,940% whereas 92,83% hypoxia. The number of cells expressing the CD 45 negative, CD 34 negative and CD 90 positive on 76,153% normoxia and 75,310% hypoxia.

In the result of immunocytochemistry BM-MSCs *in vitro* study, there is an increase in the number of cells that express HIF-1 α , Hsp 27 and VEGFA-165b at 1% hypoxia for 24 hours compared to normoxia. There is no increase in the expression of VEGF-A at 1% hypoxia and normoxia.

In the *in vivo* study result in significant improvement with $p < 0.05$ in expression of VEGF-A165b, Hsp 27, and RGCs (Brn3b) and a decrease in apoptosis in the group transplanted BM-MSCs hypoxia precondition compared to all other groups. There is a significant increase of $p < 0.05$ in expression of VEGF-R2 on RGCs (Brn3b) and TGF- β 1 in microglia (CD11b) in the group transplanted BM-MSCs hypoxia precondition compared to pretreatment group and SC normoxia group. There is a significant increase of $p < 0.05$ the number of RGCs in all groups compared with pretreatment.

The conclusion of this study is the hypoxia precondition transplantation of BM-MSCs in post IOP decreasing on animal models acute glaucoma yielded significant results in apoptosis decreasing and the number of retinal ganglion cells increasing through autocrine mechanisms so the transplanted BM-MSCs can survive in the ischemia environment, and through paracrine effects of thus provide neuroprotective effects to the RGCs and endogenous stem cells, microglia deactivation resulting in anti-inflammatory cytokines and stimulate stem cells for proliferation and differentiation.

ABSTRACT

APOPTOSIS DECREASING AND RETINAL GANGLION CELLS ENHANCEMENT POST DECREASING INTRA OCULAR PRESSURE ON ACUTE GLAUCOMA ANIMAL MODELS AFTER HYPOXIA PRECONDITIONS BONE MARROW-MESENCHYMAL STEM CELLS TRANSPLANTATION

Titiek Ernawati

Objective: The purpose of this study was to reveal the mechanism of apoptosis decreasing and retinal ganglion cells (RGCs) enhancement post decreasing intra ocular pressure (IOP) on acute glaucoma animal models after hypoxia preconditions bone marrow-mesenchymal stem cells (BM-MSCs) transplantation

Methods: The study were designed randomized pre test and post test control groups. In the *in vitro* study, BM-MSCs cultures were divided into two groups: normoxia conditions (O₂ 21%) and hypoxia conditions (O₂ 1% for 24 hours). BM-MSCs were characterised by using immunocytochemistry and flowcytometry and also cytokines expression. In the *in vivo* study, twenty four Sprague Dawley rats were divided into 4 groups and induced by elevated IOP 100-120 mmHg for 60 minutes to make acute glaucoma animal models. KG0 was used as pretreatment group. KG1 was not transplanted BM-MSCs and terminated 5 weeks after IOP elevation (= 1 month control group). KG2 was transplanted normoxia BM-MSCs (= SC-Normoxia group) and KG3 was transplanted hypoxia preconditions BM-MSCs (= SC-Hypoxia group) and terminated after 4 weeks post-transplantation. Retinal tissue were examined cytokines expression by immunohistochemistry and analysis of apoptosis by using TUNEL Assay.

Results: In the *in vitro* study, hypoxia BM-MSCs showed increasing expression of HIF-1 α , Hsp 27 and VEGFA-165b were compared to normoxia. In the *in vivo* study showed that significant improvement with $p < 0.05$ expression of VEGF-A165b, Hsp 27, RGCs (Brn3b) and apoptosis decreasing in the SC-Hypoxia group were compared to all other groups. There were significant increasing with $p < 0.05$ expression of VEGFR2 on RGCs (Brn3b) and TGF- β 1 on microglia (CD11b) in the SC-Hypoxia group compared to pretreatment group and SC Normoxia group.

Conclusion: This study demonstrated that hypoxia preconditions of BM-MSCs transplantation on acute glaucoma animal models showed significant results in apoptosis decreasing and RGCs increasing through autocrine and paracrine mechanisms. The transplanted hypoxia preconditions BM-MSCs could survive in the ischemia environment, and also could increase neuroprotective effects to the RGCs, anti-inflammatory cytokines and stimulate endogenous stem cells for proliferation and differentiation.

Keyword: Glaucoma, Intra Ocular Pressure, Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells, Hypoxia Preconditions Transplantation.