

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Alzheimer's Disease (AD) merupakan kelainan neurodegeneratif yang ditandai dengan gangguan fungsi kognitif progresif dan hilangnya sinaps serta sel-sel saraf yang terlibat dalam proses belajar, memori dan kebiasaan (Ramezani *et al.*, 2020). Insiden AD terjadi pada 6% populasi berusia diatas 65 tahun (Abshenas *et al.*, 2020). Alzheimer onset dini (familial) terjadi pada rentang usia 40-60 tahun, sementara onset lambat (sporadik) biasanya terjadi setelah usia 70 tahun (Si and Wang, 2021). Pasien Alzheimer akan meninggal dalam 5-12 tahun setelah onset gejala Alzheimer (Bruni, Bernardi and Gabelli, 2020).

Risiko perkembangan AD meningkat 14 kali lipat antara usia 65-85 tahun dan hampir memengaruhi 47% orang berusia di atas 85 tahun. Menurut *World Alzheimer Report 2018*, ada sekitar 50 juta orang yang menderita demensia di dunia. Diperkirakan jumlah ini akan meningkat menjadi sekitar 82 juta pada tahun 2030 dan menjadi sekitar 152 juta pada tahun 2050.

Ada bermacam tipe demensia, diantaranya demensia vaskuler, demensia dengan *Lewy Body*, demensia frontotemporal dan 50% - 60% dari semuanya adalah kasus yang disebabkan oleh AD (Vasio, Barth and Schmidt, 2019). Patogenesis AD sangat kompleks, beberapa hal yang berperan diantaranya adalah faktor resiko (genetik, usia, vaskuler, jenis kelamin, riwayat keluarga dan lingkungan), *neuroinflammation*, pembentukan protein patogenik, gangguan neurogenesis, disfungsi mitokondria, dan akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS). Gambaran utama AD berupa hilangnya neuron, adanya plak amiloid (timbunan *Amyloid Beta* – A β) dan kekusutan serat-serat saraf (*Neurofibrillary Tangles* – NFT) terutama pada korteks dan hipokampus. Hipotesis kaskade amiloid menyatakan bahwa AD disebabkan oleh ketidakseimbangan dari produksi amiloid otak yang berlebih dan terlalu sedikitnya pembersihan amiloid (Katona, Cooper and Robertson, 2014). *Amyloid Beta* yang menumpuk sebagai deposit ekstra seluler yang tidak larut pada



plak senilis, membentuk kelainan neuropatologis yang khas pada pemeriksaan histologi Patologi Anatomi (Zhao *et al.*, 2020a).

Neuroinflamasi kronik juga merupakan salah satu faktor utama patofisiologi AD. Penyakit ini berhubungan dengan respon inflamasi sebagai akibat peningkatan kadar mikroglia dan astrosit teraktivasi, protein komplemen teraktivasi, sitokin dan *Reactive Oxygen* (RO). Aktivasi mikroglia dan pelepasan faktor inflamasi memberikan dampak terhadap kelainan neurodegeneratif kronis pada AD (Li, Guo and Ikehara, 2014).

Neurogenesis terjadi di dua bagian otak dewasa, zona subgranular di dentatus girus (DG) hipokampus dan zona subventrikular di ventrikel lateral. Penurunan neurogenesis erat kaitannya dengan disfungsi kognitif yang disebabkan oleh AD, peningkatan neurogenesis dapat memperbaiki memori spasial (Zheng, Zheng, Zhang, and He, 2016). Sel progenitor saraf dewasa pada girus dentatus memiliki sifat dasar yang sama dengan sel-sel glia radial dan sering disebut sebagai “*RG-like* (RGL) *cells*” atau “Sel tipe 1” (Moos *et al.*, 2016). Sel tipe 1 mengekspresikan Nestin, *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP), *Sex Determining Region Y-box 2* (SOX2), dan menghasilkan saraf-saraf granula dewasa (Potokar *et al.*, 2020).

Nestin merupakan protein filamen intermediet IV yang terekspresi di sel-sel progenitor syaraf dan juga merupakan marker proliferasi dan migrasi sel. Nestin terekspresi pada stadium awal selama diferensiasi saraf. Nestin memiliki peranan penting dalam perkembangan sistem saraf pusat dan menjaga bentuk sel (Bernal and Arranz, 2018). Ekspresi Nestin dipicu oleh kondisi patologis seperti luka, penyakit neurodegeneratif dan proses neoplastik (Szymańska-Chabowska *et al.*, 2021). Transplantasi sel punca mesenkimal di hipokampus menghasilkan sel saraf yang mengekspresikan Nestin dan MAP-2 memicu pelepasan asetilkolin, neurogenesis, aktivasi astrosit dan mikroglia, menghalangi apoptosis saraf dan ekspresi amiloid.

SOX2 adalah komponen dari jaringan pengatur transkripsi inti yang mempertahankan totipotensi sel selama periode pra-implantasi embrionik, pluripotensi sel punca embrionik, dan multipotensi sel punca saraf. Ekspresi SOX2 sangat menurun di otak tikus transgenik Alzheimer serta di otak pasien AD.



Penurunan SOX2 pada AD berkorelasi positif dengan tingkat keparahan penyakit (Feng and Wen, 2015). Sel punca mesenkimal Wharton Jelly mengekspresikan karakteristik protein sel punca saraf seperti Nestin dan SOX2 yang berperan dalam potensi neurogenik (Hernández *et al.*, 2020).

The US Food and Drug Administration hanya menyetujui lima jenis obat-obatan untuk pengobatan klinis AD, diantaranya *inhibitor kolinesterase tacrine*, galantamine, donepezil, rivastigmine, dan *antagonis reseptor glutamate memantine* (Lopez-Toledano *et al.*, 2010; Si and Wang, 2021). Namun, kelima agen farmakologi ini hanya dapat meringankan gejala AD, tetapi mereka tidak menghentikan atau mengurangi patologi otak AD dan juga tidak menghentikan perkembangan penyakit. Uji klinis obat saat ini berupa "satu obat, satu mekanisme". Sementara, patogenesis AD sangat rumit dan jika hanya menargetkan satu fitur patologis seperti A β , Tau atau *neuroinflammation* tidak mungkin akan mencapai keberhasilan klinis (Hu and Wang, 2022).

Secara umum, belum ada obat yang mampu membalikkan atau mengubah arah perjalanan AD. Dengan demikian, diperlukan strategi pengobatan AD dengan mengembangkan agen baru. Agen terapi ini harus mencakup target terapi spesifik yang terletak langsung di dalam jalur seluler yang terlibat dalam disfungsi saraf dan kematian yang mendorong patologi AD, serta juga harus berpotensi memperlambat atau menghentikan perkembangan AD (Lopez-Toledano *et al.*, 2010).

Sel punca mesenkimal (MSCs) merupakan sel punca dewasa dengan kemampuan memperbaharui diri dan berdiferensiasi menjadi berbagai jaringan mesenkimal, seperti tulang, kartilago, adiposa, dan jaringan hematopoietik. Sel ini dapat berdiferensiasi menjadi sel-sel non-mesoderm seperti sel glia dan sel saraf (Yao *et al.*, 2020). Sel punca diyakini memiliki efek terapi melalui efek parakrin (Hu and Wang, 2022). Terapi MSCs menunjukkan peningkatan sekresi faktor neurotropik dan angiogenik melalui jalur parakrin, terutama *glial cell derived neurotrophic factor* (GDNF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), and *insulin growth factor* (IGF) (Walker and Jucker, 2015; Duncan and Valenzuela, 2017; Guo *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020; Liu, Zhang and Ma, 2021).

Mekanisme penting lainnya dari terapi MSCs adalah modulasi neuroinflamasi. Neuroinflamasi memiliki peranan penting dalam patogenesis AD. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa MSCs dapat mengubah mikroglia dan astrosit dari fenotip proinflamasi M1 dan A1 menjadi fenotip antiinflamasi M2 dan A2 (Wei *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018; Qin, Li and Wang, 2021).

Pada model hewan coba, sel punca berfungsi untuk dapat meningkatkan kadar asetilkolin, dengan memperbaiki fungsi kognitif dan memori (Park, Y. Yang, *et al.*, 2013). Selain itu, sel punca dapat menyekresi faktor neurotropik untuk memodulasi neuroplastisitas dan neurogenesis (Enciu *et al.*, 2011; Park, G. Yang, *et al.*, 2013). Terapi sel punca tidak hanya memiliki potensi untuk menghasilkan neuron baru, namun juga mengganti neuron rusak dan komponen lain untuk memodulasi sistem kekebalan tubuh (Yue *et al.*, 2015).

Terdapat beberapa jaringan tubuh manusia yang bisa digunakan sebagai sumber MSCs, diantaranya jaringan adiposa, tali pusat, cairan amnion, membran plasenta dan sumsum tulang. Perbedaan karakteristik MSCs tergantung pada lokasi jaringan, kesehatan pendonor, dan sumbernya. Studi sebelumnya telah menunjukkan sumber jaringan MSCs yang berbeda menghasilkan proliferasi dan ekspresi gen yang berbeda secara signifikan. Bahkan dalam sumber MSCs yang sama, faktor-faktor tertentu seperti lingkungan dan sitokin memengaruhi fungsi imunomodulator mereka. Oleh karena itu, sumber dan lingkungan harus diperhitungkan saat menggunakan MSCs sebagai pengobatan (Wang *et al.*, 2016).

Jaringan adiposa adalah salah satu sumber terbaik untuk menghasilkan sel punca karena jaringan ini dapat diperoleh dari lemak hasil *liposuction* yang pada dasarnya adalah limbah medis (Chun *et al.*, 2019). Terapi dengan sel punca adiposa (AD-MSCs) dapat menggantikan sel yang hilang dan melindungi area akibat proses kerusakan degeneratif saraf (Torrent dan Polli, 2008). Terapi AD-MSCs juga meningkatkan neurogenesis endogen pada model tikus APP/PS1 (Qin *et al.*, 2022).

Sel punca mesenkimal yang diturunkan dari sumsum tulang (BM-MSCs) dapat berdiferensiasi menjadi sel saraf, menyekresikan neurotransmitter asetilkolin, memroduksi neurotrofin seperti *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) dan *nerve growth factor* (NGF). Sel punca ini juga dapat menghambat kematian sel



akibat A β dan tau protein. Terjadi peningkatan ekspresi sitokin antiinflamasi seperti IL-10 dan IL-4, sementara ekspresi sitokin proinflamasi seperti IL-1 dan TNF- α terjadi penurunan (Qin *et al.*, 2022). Sel ini dapat diperluas dengan cepat secara *ex vivo* untuk transplantasi autologus. BM-MSCs bersifat alogenik dan non-imunogenik, sehingga risiko penolakan dapat dihilangkan (Dharmasaroj, 2009).

Sel punca mesenkimal yang diisolasi dari *Wharton Jelly* (WJ-MSCs) bersifat primitif dan dapat diterima dibandingkan hasil isolasi dari jaringan lain. Untuk memperoleh WJ-MSCs tidak memerlukan prosedur invasif yang berpotensi menyakiti pendonor. Deuse T *et al.* menemukan bahwa WJ-MSCs memiliki potensi besar untuk imunoregulasi, karena kemampuan proliferasinya yang tinggi, imunogenitasnya rendah, dan mampu memproduksi faktor tolerogenik dalam jumlah besar. Karena jarang terpapar agen infeksius, WJ-MSCs juga dikategorikan sebagai donor yang aman (Deuse *et al.*, 2012).

Sel punca sumsum tulang (BM-MSCs) dan WJ-MSCs dapat dikultur untuk periode waktu yang lebih lama dan menunjukkan kemampuan ekspansi yang hebat, sementara sel punca adiposa (AD-MSCs) memiliki waktu kultur terpendek dan rasio pertumbuhan terendah. Pada kebanyakan BM-MSCs, pertumbuhan sel bisa hingga passase 22~24, pertumbuhan WJ-MSCs hingga passase 17~18, dan pada AD-MSCs proliferasi terhenti pada passase 11~12. Sebagai perbandingan potensi klonogenik dari sumber MSCs dengan jaringan berbeda, hasil analisa *colony forming unit-fibroblast* (CFU-F), menunjukkan bahwa pada passase 3, lebih banyak koloni dibentuk dari BM-MSCs dan WJ-MSCs daripada dari AD-MSCs (Wang *et al.*, 2016).

Nakanishi *et al.* menemukan bahwa terjadi peningkatan gen yang berhubungan dengan mitosis, inflamasi, dan respon terhadap stress pada AD-MSCs, sementara gen yang berhubungan dengan perkembangan organ, morfogenesis dan migrasi sel meningkat pada BM-MSCs. Interaksi membran sel antara MSCs dan sel-sel imun melalui molekul adhesi dan kemokin juga memiliki peranan yang krusial dalam kemampuan imunoregulasi MSCs. Baik WJ-MSCs dan AD-MSCs dapat meningkatkan efek imunoregulasi dengan peningkatan ligan kemokin



daripada pada BM-MSCs, sehingga menghasilkan peningkatan regulasi kemokin untuk memicu limfosit T (Nakanishi *et al.*, 2011).

Sel punca mesenkimal mengekspresikan sejumlah besar molekul permukaan sel, termasuk integrin dan molekul adhesi yang bertanggung jawab terhadap interaksi seluler melalui ikatan dengan reseptor pada sel T. Protein adhesi *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 dan *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1 secara umum dianggap sebagai marker MSCs, dan diyakini berperan dalam mekanisme *homing* MSCs pada perbaikan jaringan. Analisis RT-PCR menunjukkan bahwa MSCs mengekspresikan molekul ini, dalam kadar berbeda pada jaringan yang berbeda (Wang *et al.*, 2020).

Penelitian oleh Ma (2013) menggagas tentang potensi AD-MSCs sebagai terapi AD yang dapat memperbaiki gejala defisit neurologis yang terjadi. Penelitian tersebut menjelaskan bahwa terapi AD-MSCs memiliki potensi untuk memperbaiki kemampuan belajar dan memori pada model APP/PS-1 (Ma *et al.*, 2013). Mengenai potensi BM-MSCs dalam pengobatan AD, Lee *et al.* (2009) menemukan bukti bahwa transplantasi intraserebral dari BM-MSCs dapat menurunkan deposit plak A β melalui aktivasi mikroglial pada tikus Alzheimer yang diinduksi akut dengan menyuntikkan A β ke dentate gyrus (DG) dari hipokampus tikus C57BL/6.

Penelitian Bodart-Santos *et al.*, WJ-MSCs dapat menurunkan akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS) setelah paparan syaraf hipokampus terhadap A β . Sel punca ini juga mencegah penurunan protein sinaptik dan densitas sinaps yang diinduksi oleh A β pada hipokampus. WJ-MSCs memerantarai mekanisme neuroproteksi parakrin terhadap A β yang diakibatkan oleh stress oksidatif syaraf dan kerusakan sinaps (Bodart-Santos *et al.*, 2019).

Pemberian MSCs dapat meningkatkan kelangsungan hidup, meningkatkan aktivitas metabolisme dan membantu menyelamatkan sel model tikus Alzheimer secara *in vitro*. Transplantasi MSCs dari manusia dan tikus dapat mengurangi deposisi A β , meningkatkan memori dan untuk meringankan patologi AD pada model tikus Alzheimer (S. S. Choi *et al.*, 2014). Pemberian MSCs secara signifikan meningkatkan ekspresi GFAP, Ki67, HuD c, Nestin dan SOX2 (Bali *et al.*, 2017). Jumlah sel-sel Nestin menunjukkan peningkatan secara signifikan di DG hipokampus pada grup AD dibandingkan dengan grup kontrol. Yu, Hei dan Liu



(2017) melaporkan bahwa setelah transplantasi BM-MSCs pada tikus Alzheimer terdapat peningkatan ekspresi gen Nestin (Yu, Hei and Liu, 2018). Penelitian oleh Zeng, et al mendapatkan bahwa terdapat penurunan Nestin yang signifikan secara statistik di dentatus gyrus pada grup dengan Alzheimer dibandingkan dengan kontrol (Zeng *et al.*, 2016).

Zhang, *et al* juga melaporkan bahwa pemberian sel punca sumsum tulang dan adiposa pada model tikus berbeda menunjukkan ekspresi Nestin yang signifikan pada model tikus tersebut (Zhang *et al.*, 2014). Tondreau *et al* melaporkan bahwa BM-MSCs mengekspresikan Nestin sebelum berdiferensiasi secara *in vitro* (Tondreau, Lagneaux and Dejenefle, 2004). Penelitian Wiese, *et al* menunjukkan bahwa terdapat peningkatan Nestin pada *Endothelial Stem/Progenitor Cell* (ESPCs) yang dapat berkembang menjadi jalur neuroektodermal, endodermal, dan mesodermal (Wiese, Rolletschek and Kania, 2004). Mendez-Ferrer *et al* mendapatkan hasil bahwa BM-MSCs dapat diidentifikasi melalui Nestin (Mendez-Ferrer, Michurina and Ferraro, 2010). Nes⁺ MSCs pada sumsum tulang mengandung keseluruhan aktivitas progenitor mesenkimal (*fibroblastic colony-forming units*, CFUFs) dan memiliki potensi untuk memperbaharui diri sendiri dan berdiferensiasi (Xie *et al.*, 2015).

Gen SOX2 memainkan peran penting dalam perkembangan dan homeostasis jaringan dewasa dari berbagai jaringan, terutama sistem saraf pusat (Feng and Wen, 2015). Gen ini adalah regulator yang penting selama proses perkembangan sel, serta memiliki peranan penting pada homeostasis jaringan dewasa dan regenerasi (Sarлак and Vincent, 2016).

Penelitian ini menggunakan hewan coba yaitu tikus putih jantan. Tikus memiliki beberapa kelebihan karena praktis, mudah didapat, pola makan tikus yang omnivora, lebih mirip manusia dibandingkan menggunakan kelinci. Tikus diinjeksi dengan *aluminium chloride* (AlCl₃) dosis 300 mg/kg BB tikus secara oral (Ali *et al.*, 2023). Berdasarkan penelitian terdahulu, diketahui *oral median lethal dose* pada tikus adalah 3.630 mg/BB tikus (Kumar, 2001). Aluminium (Al) adalah salah satu logam berat yang terlibat dalam perkembangan penyakit neurodegeneratif, seperti penyakit Parkinson dan Alzheimer. Pemilihan penggunaan AlCl₃ karena bahan ini dapat ditemukan pada makanan kemasan, pasta gigi, obat-obatan dan air minum

purifikasi. Model hewan tikus *Alzheimer-like disease* yang diinduksi $AlCl_3$ telah dilaporkan sebagai model hewan utama yang umum digunakan untuk menyerupai patologi Alzheimer pada manusia (Aboelwafa *et al.*, 2020). Karakterisasi MSCs dilakukan dengan alat *Flow Cytometri*. Analisis gen Nestin dan SOX2 menggunakan metode RT-PCR. Pemeriksaan preparat jaringan otak tikus Alzheimer dengan pewarnaan Congo Red.

Berdasarkan latar belakang diatas, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian mengenai analisis pengaruh pemberian sel punca mesenkimal dari adiposa, sumsum tulang dan *Wharton Jelly* terhadap ekspresi gen Nestin, SOX2 dan gambaran plak Amiloid pada tikus Alzheimer.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah diatas, dapat dibuat rumusan masalah sebagai berikut :

- 1.2.1 Apakah terdapat adanya pengaruh pemberian sel punca mesenkimal yang berasal dari adiposa, sumsum tulang, dan *Wharton Jelly* terhadap ekspresi gen Nestin pada tikus Alzheimer?
- 1.2.2 Apakah terdapat adanya pengaruh pemberian sel punca mesenkimal yang berasal dari adiposa, sumsum tulang, dan *Wharton Jelly* terhadap ekspresi gen SOX2 pada tikus Alzheimer?
- 1.2.3 Apakah terdapat adanya pengaruh pemberian sel punca mesenkimal yang berasal dari adiposa, sumsum tulang, dan *Wharton Jelly* terhadap gambaran plak amiloid pada tikus Alzheimer?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menganalisis pengaruh pemberian sel punca mesenkimal dari adiposa, sumsum tulang dan *Wharton Jelly* terhadap ekspresi gen Nestin, SOX2 dan gambaran plak Amiloid pada tikus Alzheimer.



1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Menganalisis pengaruh pemberian sel punca mesenkimal yang berasal dari adiposa, sumsum tulang, dan *Wharton Jelly* terhadap ekspresi gen Nestin pada tikus Alzheimer.

1.3.2.2 Menganalisis pengaruh pemberian sel punca mesenkimal yang berasal dari adiposa, sumsum tulang, dan *Wharton Jelly* terhadap ekspresi gen SOX2 pada tikus Alzheimer.

1.3.2.3 Menganalisis pengaruh pemberian sel punca mesenkimal yang berasal dari adiposa, sumsum tulang, dan *Wharton Jelly* terhadap gambaran plak amiloid pada tikus Alzheimer.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Ilmu Pengetahuan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi pada perkembangan ilmu pengetahuan tentang terapi sel punca mesenkimal dari adiposa, sumsum tulang dan *Wharton Jelly* mempunyai potensi untuk memperbaiki fungsi neurogenesis dan gambaran histologi pada tikus Alzheimer.

1.4.2 Praktisi

Pengelola kesehatan dapat menjadikan hasil penelitian ini sebagai dasar penelitian terapi sel punca mesenkimal dari adiposa, sumsum tulang dan *Wharton Jelly* pada manusia dengan AD.

