

STROKE ISKEMIK
dari Patofisiologi Sampai Kematian Sel
(Nekrosis Dan Apoptosis)
dan Astrosit Sebagai Target Neuroprotektor

Penulis :

I Made Oka Adnyana

Editor :

Agha Bhargah
Ida Bagus Amertha Putra Manuaba



PT. Intisari Sains Medis

STROKE ISKEMIK

dari Patofisiologi Sampai Kematian Sel (Nekrosis Dan Apoptosis)
dan Astrosit Sebagai Target Neuroprotektor

Penulis :

I Made Oka Adnyana

Editor :

Agha Bhargah

Ida Bagus Amertha Putra Manuaba

Layout dan Desain Sampul :

Wayan Iwan Suryawan

Penerbit :

PT. Intisari Sains Medis

Redaksi :

Jl. Batanghari IIC, No. 9

Kelurahan Panjer, Denpasar Selatan

Denpasar - Bali

Distributor Tunggal

PT. Intisari Sains Medis

Jl. Batanghari IIC, No. 9

Kelurahan Panjer, Denpasar Selatan

Denpasar - Bali

Cetakan pertama : Juni 2020

2019, viii + 53 hlm, 15 x 23 cm

ISBN : 978-602-52786-6-2

Hak cipta dilindungi undang-undang

Delarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan dengan
cara apapun tanpa ijin tertulis dari penerbit

Kata Pengantar



Stroke merupakan defisit neurologis fokal yang terjadi secara mendadak akibat gangguan aliran darah di otak. Insiden stroke terus meningkat terutama di negara berkembang. Stroke merupakan kasus kedua sebagai penyebab kematian setelah penyakit jantung. Sebanyak 20-40% penderita stroke akan mengalami gejala sisa sehingga mengakibatkan penurunan produktifitas. Keadaan ini akan mengakibatkan menjadi beban bagi individu, keluarga, masyarakat maupun negara.

Patofisiologinya sangat kompleks dan banyak faktor yang berperan. Otak manusia dalam keadaan normal memerlukan darah sebanyak 50-60ml/100 gram jaringan otak, dan apa bila aliran darah otak menurun pada batas bawah 10ml/100 gram jaringan otak, dan batas atas 25 ml/100 gram jaringan otak daerah tersebut disebut iskemik penumbra. Pada daerah aliran darah dibawah 10ml/100gram jaringan otak maka daerah tersebut akan mengalami kematian melalui mekanisme nekrosis. Daerah iskemik penumbra adalah merupakan peralihan daerah yang mengalami kematian dan yang masih hidup. Secara anatomi daerah ini masih hidup tetapi fungsi sel neuron yang mengalami gangguan, sehingga target terapi ditujukan terhadap daerah iskemik penumbra ini. Bila tidak diberikan terapi atau terapinya tidak memadai maka sel di daerah iskemik penumbra ini akan mengalami kematian melalui mekanisme apoptosis.

Kematian sel otak pada stroke melibatkan mekanisme yang multipel seperti eksitotoksik, respon mitokondria, efek pelepasan radikal bebas, respon mitokondria, reaksi inflamasi, aktivasi sel glia, seperti mikrogila dan astrosit. Reaksi inflamasi, aktivasi sel glia, disamping berefek merugikan juga berefek menguntungkan.

Monograf ini akan membahas patofisiologi stroke disertai dengan factor yang berperan dalam kematian sel otak, terutama astrosit disamping mempunyai efek merugikan juga sangat banyak perannya dalam perbaikan, sehingga untuk masa depan penelitian ditujukan terhadap peran astrosit sebagai neuroprotektor

Denpasar, 10 Oktober 2019

Penulis

Daftar Isi



KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR SINGKATAN	viii
1. Patofisiologi Stroke Iskemik	1
Eksitotoksik	3
Peran reseptor NMDA pada stroke iskemik.....	3
Peran Ca ²⁺ dalam kerusakan neuron (otak)	5
Mekanisme eksitotoksik.....	6
Mekanisme non eksitotoksik.....	7
Mitokondria	8
Stres oksidatif.....	9
Pembentukan ROS saat iskemik serebri.....	11
Pembentukan ROS saat iskemik penumbra.....	12
Pembentukan ROS di mitokondria	12
Protein misfolding	13
Peran oligodendrosit dalam patofisiologi stroke.....	14
2. Iskemik penumbra	15
Iskemik penumbra sebagai target biokemikal	18
Iskemik penumbra sebagai target plastisitas otak.....	19
3. Peran inflamasi pada stroke	20
Mediator inflamasi pada stroke	21
Peran inflamasi dalam resolusi dan perbaikan jaringan.....	25
4. Peran mikroglia pada patofisiologi stroke	27
Fenotipe mikroglia.....	27

Aktivasi mikroglia selama stroke iskemik.....	21
Peran mikroglia dalam iskemik serebri.....	32
Efek menguntungkan mikroglia setelah stroke	34
Efek merugikan mikroglia pada iskemik serebri.....	34
Hubungan mikroglia dan neuron selama iskemik serebri	36
5. Astrostrosit sebagai target terapi neuroproteksi pada stroke iskemik akut	39
Peran astrosit pada stroke	39
Peran astrosit dalam neurogenesis	41
Peran astrosit sebagai anti eksitotoksik.....	42
Astrosit sebagai sumber antioksidan	43
Peran astrosit sebagai neuroprotektor	45
Peran astrosit dalam angiogenesis	45
Reaktivasi astrosit dalam regenerasi.....	46
Peran astrosit dalam metabolisme.....	47
6. Kematian sel pada stroke: nekrosis dan apoptosis	52
Nekrosis.....	52
Apoptosis.....	53
Peran mitokondria dalam apoptosis intrinsik.....	55
<i>Bcl-2 family</i>	56
Kaspase.....	58
DAFTAR PUSTAKA	61

Daftar Gambar



Gambar 1.	Patofisiologi stroke	2
Gambar 2.	Pembentukan ROS saat iskemik dan reperfusi	10
Gambar 3.	Fungsi ganda mikroglia	33
Gambar 4.	Proses apoptosis.....	55

Daftar Singkatan



- ACIs: *Acid-sensing ion channels*
ADC: *apparent diffusion coefficient*
ADO: *aliran darah otak*
ADP: *adenosine diphosphate*
ADPR: *adenosine diphosphoribose*
AIF: *apoptosis inducing factor*
AMP: *adenosine monophosphate*
AMPA: **α -amino-3-hydroxy-5 methyl-4-isoxazole** *propionic acid*
Ang 2: *angiotensin 2*
Apaf-1: *apoptosis protein activator-1*
ATP: *adenosine triphosphate*
Bad: *Bcl-2 antagonist cell death*
BDNF: *brain-derived neurotrophic factor*
bFGF: *basic fibroblast growth factor*
Bid: *BH3 interacting domain death agonist*
Bik: *Bcl-2 interacting killer*
Bim: *Bcl-2 interacting mediator cell*
Bmf: *Bcl-2 modifying factor*
Ca²⁺: *kalsium*
CAD: *caspase activated DNA-ase*
CAMs: *celuler adhesion molecules*
CBV: *cerebral blood volume*
CDK5: *cyclin-dependent kinase 5*
CK2: *casein kinase 2*
CMRO₂: *cerebral metabolic rate of oxygen*
CNTF: *ciliary neurothrophic factor*

CX43: *Connexin-43*
DISC: *death-inducing signaling complex*
DMPs: *damage associated molecule patterns*
DNA: *deoxyribonucleic acid.*
DRD2: *astrocyte dopamine D 2 receptor*
DWI: *diffusion-weighted imaging*
EAATs: *excitatory amino acid transporter*
EPCs: *endothelial progenitor cell*
FADD: *Fas-associated protein death dominant*
GDNF: *glial cell-derived neurotrophic factor*
GFAP: *glial factor activator protein*
GLAST: *glutamateaspartate transpoter*
GM-CSF: *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*
GS: *glutamine synthase*
GT-1: *glutamate transported-1*
HGF: *hepatocyte growth fctor*
HGMB1: *High-mobility group box 1*
HrK: *protein hara kiri*
IAPs: *inhibitor of apoptosis proteins*
ICAM-1: *intracelluler adhesion molecule-1*
IFN- γ : *interferon γ*
IL-1: *interleukine 1*
IL-4: *interleukin 4*
IRE 1: *inositol requiring enzyme 1*
IRF-1: *interferon regulator factor-1*
K⁺: *kalium*
MAGUKs: *postsynaptic densities*
MerTK: *Mer receptor tyrosine kinase*
MGF-E8: *Milk fat globule-EGF factor 8 protein*
MMPs: *matrix metalloproteinase*
mPTP: *mitochondrial permeability transtition pore*
MR-PWI: *magnetic resonance perfusion-weight imaging*
Na⁺: *natrium*

NADPH: *nicotinic adenin dinucleotide phosphat dehydrogenase*

NCS: *neural stem cells*

NCX: *Na⁺/Ca⁺ exchanges*

NF-kB: *nuclear factor-kappaB*

NGF: *nerve growth factor*

NK: *natural killer*

NMDA: *N-Methyl-D-Aspartate*

nNOS: *neuronal nitrix oxide synthase*

NO: *nitrix oxide*

NOS: *NADPH-oxidase*

NPC-Astros: *NPC-astroglial cells*

NR1: *NMDA resseptor 1*

NrF2: *nuclear factor erythroid 2-factor 2*

NT-3: *neurotrophin-3*

OEF: *oxygen extraction*

OGD/R: *oxygen glucose deprivation/reperfusion*

OGD: *oxygen-glucose deprivation*

Oligo2pC-astros: *Oligo2PC-astroglial cells*

OPCs: *oligodendrocyte precursor cells*

PDZ: *post-synaptic density-95/disc large/zonula occludens-1*

PERK: *protein kinase-like ER kinase*

PET: *positron emission tomography*

PGF: *platelet growth factor*

PGn: *plasminogen*

PI3K: *phospotidylinositol 3-kinase*

PPAR γ : *peroxisome proliferator activated receptor γ*

PSD: *protein synaptic density*

PSD95: *post-synaptic density 95*

PSDs: *postsynaptic densities*

Puma: *promoter upregulated modulator of apoptosis*

RE: *retikulum endoplasma*

RNS: *reactive nitrogen species*

ROS: *reactive oxygen species*

RTP: *transient receptor potential*
S100b: *calcium binding protein B*
SERCA: *sarcoplasmic/ER calcium ATPase*
sFKN: *soluble fractalkine*
Shh: *sonic hedgehog*
Smac/Diablo: *second messenger activator of caspase/direct IAP protein with low pI*
SOD: *superoksid dismutase*
SSP: *sistem saraf pusat*
STAT: *signal transducer and activator of transcription*
STAT3: *signal transducer and activator of transcription-3*
SVZ: *subventricular zone*
T reg: *T regulator*
TGF-1 β : *transforming growth factor-1 β*
Th-1: *T helper 1*
THBS: *thrombospondin*
TIM-4: *mucin domain-containing molecule-4*
TLR: *toll-like receptor*
TNF-p55R: *TNF- α -TNF-receptor 1*
TNF- α : *tumor necrosing factor- α*
VCAM-1: *vascular adhesion molecule-1*
VEGF: *vascular endothelial growth factor*
 β -arr 1: *β -arristin*

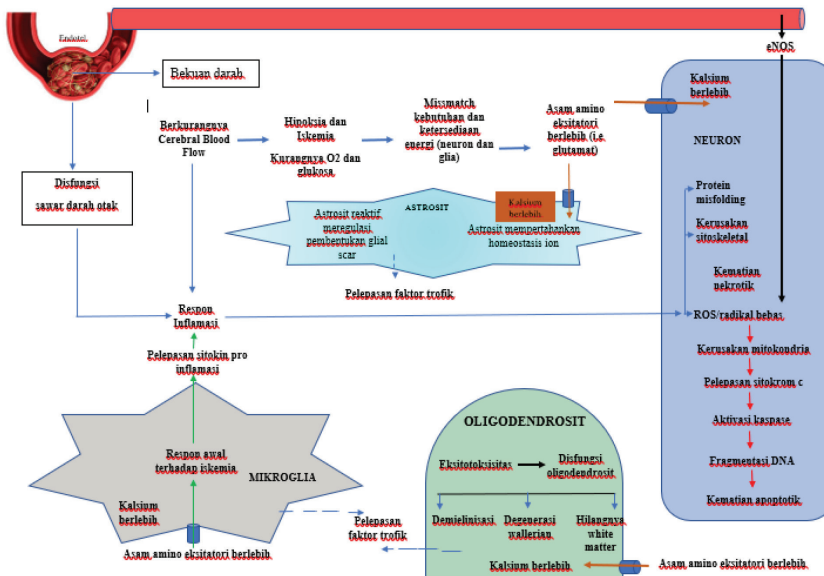
Patofisiologi Stroke Iskemik



Stroke iskemik disebabkan oleh penurunan yang menetap atau sesaat dari aliran darah di arteri serebri, yang umumnya disebabkan oleh emboli atau trombus. Sebanyak 75% dari kasus emboli berasal dari arteri ke arteri atau dari jantung. Emboli mengakibatkan penyumbatan arteri yang besar, dan kerusakan yang terjadi tergantung dari kolateral di bagian distal penyumbatan. Trombosis biasanya mengenai arteri kecil sehingga mengakibatkan infark lakuner atau ensefalopati sub-kortikal. Mikroangiopati menyebabkan trombosis dan hialinisasi terjadi pada 20% kasus.

Oksidasi-fosforilasi adalah sumber utama energi di otak. Otak adalah organ dengan tingkat konsumsi oksigen dan glukose sangat tinggi serta tidak mempunyai cadangan energi, sehingga sangat rentan terhadap iskemik. Aliran darah otak (ADO) dalam keadaan normal adalah 50-60 ml/100 gram/menit jaringan otak, bila ADO menurun antara 10-25 ml/100 gram/menit maka akan terjadi aliran listrik yang senyap. ADO dibawah 10 ml/100 gram/menit maka akan terjadi kematian sel melalui mekanisme nekrosis, daerah tersebut dikenal sebagai inti infark. Daerah antara inti infark dan sel normal, penurunan ADO tidak begitu berat seperti daerah inti infark dan masih ada perfusi dari pembuluh darah kolateral, sehingga untuk pemeliharaan fungsi sel energinya tidak seperti sel normal. ADO di daerah ini antara (10-25 ml/100 gram/menit), ini

disebut iskemik penumbra, yang sangat potensial untuk dilakukan intervensi, dan merupakan target dari obat neuroprotektan. Pemberian terapi pada daerah ini akan menyelamatkan sel otak dan bila tidak diberikan terapi maka akan terjadi kematian sel lewat mekanisme apoptosis



Gambar 1. Patofisiologi stroke

Mekanisme yang multiple seperti eksitotoksik, respon mitokondria, pelepasan radikal bebas, *misfolding* protein, reaksi inflamasi, aktivasi sel glia (mikroglia dan astrosit) mengakibatkan kematian neuron, tetapi beberapa jalur ini juga berperan dalam penyembuhan. Faktor yang mempengaruhi perbaikan maupun kerusakan neuron adalah keseimbangan antara faktor yang merugikan dan menguntungkan. Inflamasi pada awalnya akan mengakibatkan kerusakan sel neuron/jaringan dengan melepaskan sitokin dan radikal bebas, tetapi juga berefek memperbaiki sel neuron dengan cara remodeling sinaptik. Sel glia juga berperan

ganda, saat fase penyembuhan adalah memperbaiki sawar darah otak, menstimuli angiogenesis dan sinaptogenesis, tetapi juga saat pembentukan jaringan parut mencegah plastisitas neuron, seperti gambar dibawah.

Eksitotoksik

Iskemik serebri mengakibatkan defisiensi glukose dan oksigen, sehingga neuron tidak mampu memelihara keseimbangan ion dalam keadaan normal. Depolarisasi dari neuron ini akan mengakibatkan pelepasan glutamat yang berlebihan. Glutamat adalah neurotransmitter utama eksitotoksik. Dalam jumlah kecil glutamat diperlukan untuk fungsi neuron, seperti transmisi signaling. Bila jumlahnya berlebihan akan mengakibatkan toksik pada sel neuron yang disebut eksitotoksik. Metabolisme energi di otak sangat tinggi dan simpanan energi sangat terbatas, dan sangat tergantung pada metabolisme aerob, sehingga sel otak sangat rentan terhadap keadaan iskemik. Penurunan aliran darah ke otak akan mengakibatkan menurunnya pembentukan energi (ATP). Berkurangnya ATP akan mengakibatkan terganggunya fungsi pompa ion seperti *Na-K-ATP ase*, yang merupakan transport ion utama di otak untuk menjaga konsentrasi ion K^+ (155 mmol/l) yang tinggi di intra seluler dan konsentrasi ion Na^+ (12 mmol) yang rendah di intra seluler. Hilangnya fungsi pompa ion akan mengakibatkan terganggunya gradien ion transmembran, sehingga Na dan Ca masuk kedalam sel dalam jumlah yang berlebihan sehingga terjadi depolarisasi membran, terbukanya *voltage-sensitive ion channel* dan kaskade kematian sel.

Peran reseptor NMDA pada stroke iskemik

Glutamat berperan dalam perkembangan neuron, trasmisi sinap eksitotori dan plasitisitas. Glutamat akan terakumulasi di sinap segera setelah iskemi, akan segera mengaktifkan reseptor glutamat

yang menyebabkan toksik terhadap neuron. Glutamat mengaktifkan 3 reseptor yaitu reseptor ionotropik *N-Methyl-D-Aspartate* (NMDA), *α -amino-3-hydroxy-5 methyl-4-isoxazole proprionic acid* (AMPA) dan reseptor kainate. Semua reseptor glutamat terlibat dalam eksitotoksik, dan reseptor NMDA adalah yang paling penting. Reseptor NMDA tergantung dari kadar Ca^{2+} ekstraseluler yang akan masuk ke intra seluler melalui *receptor gate ion channel*. Reseptor AMPA sangat tidak permiabel terhadap Ca^{2+} . Ion Ca^{2+} masuk secara tidak langsung melalui *voltaged-gated Ca^{2+} channels*, *Ca^{2+} permeable acid-sensing ion channels*. Meningkatnya jumlah Ca^{2+} akan memicu terjadinya reaksi yang bersifat fatal.

Terlibatnya reseptor NMDA dalam fungsi neuronal dan kematian sel neuron, ditentukan oleh letaknya reseptor NMDA. Bila terletak di sinap akan bersifat neuroprotektif, signal homeostasis, sedangkan bila terletak ekstra sinaps maka akan merangsang signal kematian sel. Perbedaan ini disebabkan karena perbedaan sirkuit gen dan induksi dari *counteracting signaling pathways* untuk plasititas dan kehidupan sel. Gangguan dari keseimbangan aktivitas reseptor NMDA di sinap dan ekstra sinap berkontribusi dalam disfungsi neuron pada stroke dan penyakit neurodegeneratif. Akumulasi Ca^{2+} akibat stimulasi reseptor NMDA berlebihan akan menyebabkan kerusakan sel, seperti pada stroke. Reseptor NMDA terdiri dari 3 sub-famili, yaitu NMDA reseptor 1 (NR1) yang mengandung glutamat, NR2 yang mengandung glisin (sub unit A-D) dan NR3 berperan dalam pertumbuhan otak (sub unit A-B). Penelitian pada tikus dengan iskemik global sesaat dengan menghambat reseptor NMDA yang mengandung NR2A menyebabkan kematian sel neuron, dan menghambat reseptor NMDA yang mengandung NR2B, akan memberikan efek proteksi, sehingga disimpulkan efek eksitotoksik berhubungan dengan reseptor NR2B, sehingga reseptor sub units NR2B saat ini menjadi fokus penelitian kasus dengan stroke.

Pada otak yang matur reseptor NMDA yang berlokasi di

sinaps sebagian besar terdiri dari NR2A, sedangkan yang ekstra sinaps sebagian besar NR2B. Stimuli reseptor NMDA di sinaps akan mengekspresikan protein pro-survival seperti *brain derive neuro factor* (BDNF), sedangkan stimuli reseptor NMDA ekstra sinaps akan mengekspresikan protein pro-apoptosis dan menekan jalur untuk bertahan hidup. Di sinaps reseptor NMDA ditemukan berlokasi bersama *electron dense structure* yang disebut *postsynaptic densities* (PSDs). PSDs adalah multiprotein kompleks yang disebut *membrane associated guanylate kinase* (MAGUKs), yang terdiri dari *post-synaptic density-95/disc large/zonula occludens-1* (PDZ). Protein yang utama dalam PDZ adalah PSD 95, yang akan berpasangan dengan reseptor NMDA untuk proses signaling enzim dan protein. PSD-95 terdiri dari 3 domain PDZ. PDZ 1 dan 2 berinteraksi dengan gugusan C terminal sub NR2B dari reseptor NMDA. Reseptor NMDA berikatan dengan *neuronal nitric oxide syntase* (nNOS) melalui PDZ 1 dan 2 dari PDS. Aktifasi nNOS oleh reseptor NMDA menghasilkan *nitric oxide* (NO) yang berlebihan yang akan menjadi sumber terbentuknya peroksinitrat yang sangat reaktif sehingga menyebabkan kematian sel.

Peran Ca²⁺ dalam kerusakan neuron (otak)

Glutamat yang meningkat di ekstra seluler setelah iskemik, akan mengaktifkan reseptor NMDA, yang akhirnya mengakibatkan peningkatan Ca²⁺ masuk kedalam sel. Ca²⁺ sangat berperan dalam reaksi eksitotoksik. Efek sitotoksik Ca²⁺ telah diketahui sejak 3 dekade yang lalu, tetapi mekanisme yang pasti masih belum diketahui dengan pasti dan mekanismenya bervariasi. Teori paling awal adalah *calcium overload*. Sitotoksik Ca²⁺ tergantung dari konsentrasi didalam sel yang melebihi nilai normal. Teori ini berdasarkan bukti pada penyakit neurodegeneratif terjadi kelebihan Ca²⁺ didalam sel. Teori sekarang adalah *source specificity hypothesis*. Teori ini menyatakan toksisitas Ca²⁺, tidak hanya karena peningkatan jumlah Ca²⁺ didalam sel, tetapi cara masuknya

kedalam sel dan *second messenger pathway* yang diaktifkan. Teori saat ini yaitu perbedaan cara masuknya yang menjelaskan efek neurotoksisitasnya.

Mekanisme eksitotoksik

Efek Ca^{2+} dalam keadaan fisiologis, seperti plastisitas sinap, ekspresi gen tergantung dari jalur signal yang diaktifasi tempat masuknya Ca^{2+} . Jalur utama adalah *voltage ion channel*, tetapi yang utama adalah melalui reseptor glutamat. Reseptor glutamat ada 3 yaitu NMDA, AMPA dan kainate. Aktivasi reseptor ini akan mengakibatkan perubahan permeabilitas dari Na^+ , K^+ dan Ca^{2+} . Resptor NMDA adalah yang paling berperan dalam neurotoksik, melalui ikatan dengan PSD95 yang akan memproduksi nNOS. Aktivasi nNOS akan meningkatkan pembentukan radikal bebas yang akan menyebabkan kematian sel.

Reseptor AMPA mempunyai struktur tetraheteromerik. Terbentuk dari kombinasi subunit reseptor GluR1-R4, permeable terhadap ion Na^+ dan K^+ . Dalam keadaan normal tidak permeabel terhadap Ca^{2+} . Dalam keadaan fisiologis hanya sedikit yang permeabel terhadap Ca^{2+} , terutama terdapat di neuron piramid hipokampus. Pada keadaan iskemik reseptor AMPA permeabel terhadap Ca^{2+} , melalui reseptor GluR2a.

Reseptor kainate terdiri dari subunit yang homolog dari transmembran topologi dan *stoichiometri* subunit reseptor AMPA dan NMDA. Reseptor kainate terdiri dari 2 grup yaitu KA1 yang mempunyai afinitas yang kuat dengan GluR5-7 dan KA2 yang mempunyai ikatan rendah dengan GluR5-7. KA2 mempunyai ikatan dengan PSD95/SAP102, PSD yang berperan dalam regulasi dan lokalisasi reseptor kainate yang ikut berperan dalam proses eksitotoksik, yang akhirnya menyebabkan kematian sel.

Mekanisme non eksitotoksik

Banyak studi menyebutkan neurotoksisitas terjadi tidak selalu tergantung pada eksitotoksik, atau bersamaan dengan eksitotoksik. *Transient Receptor Potential* (TRP) adalah salah satu mekanisme yang terlibat dalam mekanisme yang tidak tergantung pada eksitotoksik. Superfamili TRP terdiri dari 20 anggota yang kebanyakan permiable terhadap Ca^{2+} . Famili TRP yang berhubungan dengan kematian sel akibat anoksia, stres oksidatif, dan stroke adalah TRPM2 dan TRPM7. TRPM2 adalah *non selective cation channels permiable* terhadap Na^+ , K^+ dan Ca^{2+} dan diaktifkan oleh *adenosine diphosphoribose* (ADPR). TRPM2 berhubungan dengan stres oksidatif yang akan mengakibatkan kematian sel. TRPM7 diaktifkan oleh ikatan bivalent ekstra seluler yang rendah, ROS dan perubahan PH yang semuanya terjadi pada keadaan iskemia. Kanal TRPM tidak hanya berhubungan dengan kematian sel neuron setelah iskemia tetapi juga mempunyai efek neuroprotektif terhadap neuron, terutama TRPC3 dan TRPC6, yang mempunyai efek neuroprotektif terhadap sel granula serebelum. TRPC3 dan TRPC6, diperlukan oleh BDNF supaya bisa berefek sebagai neuroprotektor. Peningkatan ekspresi TRPC3 dan TRPC6 akan meningkatkan ekspresi gen CREB, yang bisa mencegah apoptosis.

Peningkatan Ca^{2+} intra seluler tidak hanya tergantung dari reseptor NMDA tetapi juga *voltage-dependent calcium channels* dan *Na^+/Ca^+ exchanges* (NCX). NCX adalah membran ion dua arah untuk transport ion. Dalam keadaan depolarisasi atau pembukaan kanal Na, akan mentransport Na keluar sel dan Ca^{2+} kedalam sel. NCX adalah regulator utama Ca^{2+} , aktivasi NCX mengakibatkan peningkatan Ca dan kerusakan sel neuron. Di otak terdapat 3 isoform NCX yaitu NCX1, NCX2 dan NCX3. NCX3 sangat aktif mengatur homeostasis Ca^{2+} intra seluler, dan bersifat preventif terhadap membran potensial mitokondria. Keadaan iskemik NCX3 tidak aktif sehingga efek proteksi terhadap membran mitokondria hilang.

Acid-sensing ion channels (ASICs), juga berperan dalam peningkatan ion Ca^{2+} selama iskemik serebri. ASICs diaktifkan oleh keadaan PH yang rendah, asam laktat, asam arahkinodant, dan kadar Ca^{2+} yang rendah di ekstra seluler. Semua keadaan ini dijumpai pada keadaan setelah iskemik, sehingga ASICs merupakan suatu target dari obat neuroprotektor. Studi oleh Xiong *et al* (2004), menyebutkan dengan memblok ASICs, akan terjadi hambatan masuknya Ca^{2+} ke dalam sel saat asidosis. Saat asidosis penghambatan ASICs adalah sangat lemah sehingga diperlukan penghambat ASICs untuk mengurangi efek neurotoksisitas.

Mitokondria

Mitokondria memegang peranan penting dalam homeostasis energi sel, dan akan terlibat selama iskemik ketika keseimbangan energi terputus dan sintesis ATP terganggu. Mitokondria merupakan sumber meningkatnya Ca^{2+} saat iskemik. Ca^{2+} ditransfer ke matriks mitokondria melalui mekanisme gradien proton elektrokemikal dari *electron transport chain* yang akan menimbulkan depolarisasi mitokondria. Masuknya Ca^{2+} yang berlebihan akan mengakibatkan penurunan gradien elektrokemikal yang akan mengakibatkan penurunan produksi ATP. Penurunan produksi ATP akan mengganggu fungsi *electron transport chain* mitokondria, akan mengakibatkan peningkatan terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS). Produksi ROS yang berlebihan akan mengakibatkan neurotoksisitas. ROS akan mengakibatkan peningkatan Ca^{2+} yang akan mengakibatkan disfungsi mitokondria yang selanjutnya akan terbukanya *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP), sehingga protein pro-apoptosis keluar dari mitokondria, akhirnya menyebabkan kematian sel melalui mekanisme nekrosis dan apoptosis.

Fungsi mitokondria saat iskemik fokal mengalami perubahan, sebagai akibat kegagalan transport glukose dan oksigen ke jaringan,

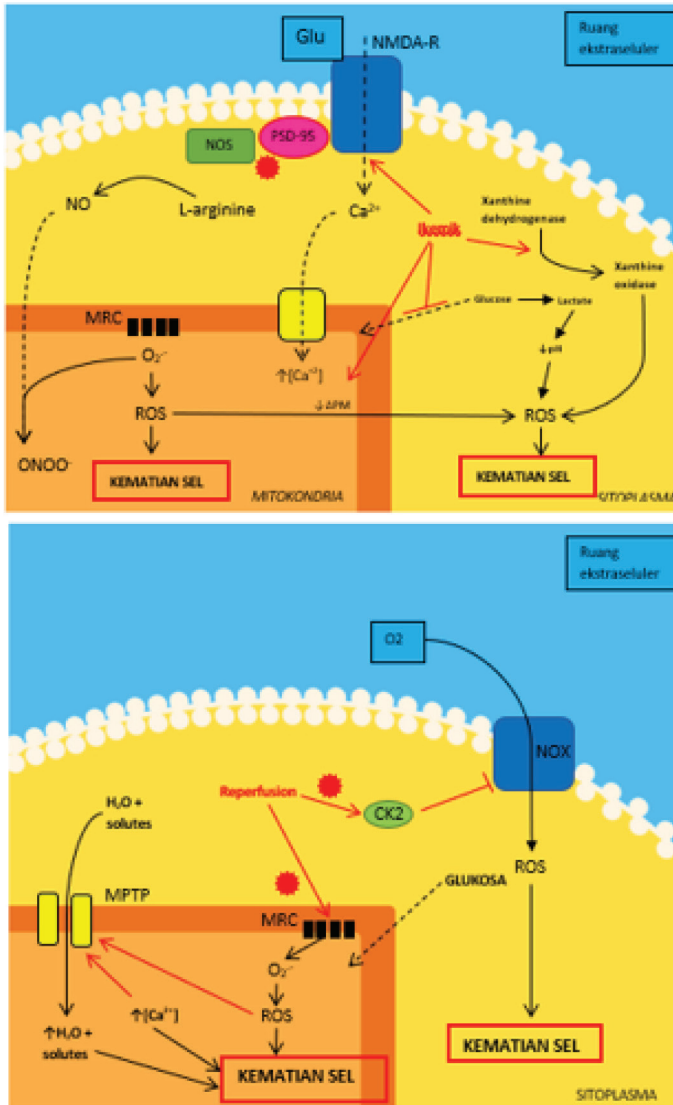
yang selanjutnya akan merubah peran mitokondria selama iskemik maupun saat reperfusi, seperti terbatasnya kemampuan mitokondria untuk membentuk ATP, sehingga akan merubah respon sel kearah jalur kematian.

Pada inti infark penurunan yang sangat berat dari oksigen dan glukose mengakibatkan tidak seimbangannya antara penggunaan dan produksi ATP. Glukosa dan ATP menurun terjadi dalam 5 menit setelah oklusi. ATP stabil dalam nilai 15-30% pada daerah tidak iskemik selama 2 jam setelah iskemik fokal. Penurunan yang cepat dari ATP berhubungan dengan redistribusi ion yang sangat banyak ke membran plasma sel. Energi adenilat yang dihitung berdasarkan keseimbangan intra seluler antara ATP, ADP, dan AMP juga menurun sangat cepat yaitu sebanyak 0,4-0,5 pada awal iskemik fokal. Nilai ini sangat rendah jika dibandingkan dalam keadaan normal (0,93). Fosfokreatin yang merupakan cadangan energi di otak yang bersifat sementara, memungkinkan terbentuknya ATP dari ADP untuk mencapai keseimbangan yang baru yang dikatalisis oleh kreatin kinase. Fosfokreatin juga mengalami penurunan seperti ATP sampai 30% dari nilai normal. Karena kekurangan oksigen maka pada inis infark terjadi metabolisme anaerob, sehingga terjadi peningkatan asam laktat. Kadar laktat meningkat 10 kali dibandingkan dengan sel yang normal.

Stres oksidatif

Stres oksidatif adalah kondisi terganggunya keseimbangan antara oksidan dan antioksidan, dimana terbentuk zat oksidan berlebihan, yang akan mengakibatkan kerusakan jaringan. Radikal bebas yang diproduksi berlebihan pada stroke iskemik merupakan salah satu mekanisme kerusakan sel neuron. Saat iskemik akut persediaan oksigen tidak mencukupi untuk memelihara oksidasi metabolisme seluler, mengakibatkan perubahan metabolisme dan kematian sel. Jaringan otak sangat kaya dengan asam lemak tidak jenuh,

dan sangat kurang enzim antioksidan seperti katalase dan glutathion peroksidase, sehingga memudahkan terbentuknya radikal bebas.



Gambar 2. Pembentukan ROS saat iskemik dan reperfusi

Stroke iskemik di tandai dengan penurunan aliran darah ke otak akibat oklusi pembuluh darah, sehingga terjadi penurunan

penghantaran nutrisi ke daerah yang mengalami oklusi. Keadaan ini mengakibatkan sel mengalami kegagalan fungsinya, yang salah satunya adalah mengeluarkan produk yang bersifat toksik. Akumulasi produk yang bersifat toksik seperti ROS dan *reactive nitrogen species* (RNS) akan mengakibatkan efek yang buruk terhadap sel otak. Saat reperfusi baik karena spontan maupun karena efek terapi, setelah aliran darah kembali, dan pembentukan ATP, bisa mengakibatkan reaksi kaskade yang merugikan yaitu terbentuknya ROS yang lebih banyak. Aktifitas sel menghambat pembentukan ROS adalah dengan 1) mengatur produksi ROS, 2) menetralkan ROS dengan enzim oksidan endogen, 3) memperbaiki protein, lipid dan DNA yang kena pengaruh efek ROS. Sekali sel mengalami iskemik, enzim yang menetralkan ROS seperti super oksid dismutase, katalase, glutathion jumlahnya berkurang dan proses perbaikan sel tidak berfungsi sehingga sel akan mengalami nekrosis atau apoptosis. Efek penghambatan pembentukan ROS ini sebagai dasar untuk terapi pada stres oksidatif. ROS terbentuk saat iskemik maupun reperfusi seperti terlihat pada gambar 2.

Pembentukan ROS saat iskemik serebri

Saat iskemik terjadinya kekurangan oksigen sehingga reaksi oksidasi fosforilasi di mitokondria terganggu, yang akan mengakibatkan depolarisasi membran mitokondria bersamaan dengan peningkatan asam laktat akibat metabolisme anaerob, sehingga terbentuk anion super oksid (O_2^-) yang selanjutnya akan dikonversi menjadi ROS lainnya. Aktivasi reseptor NMDA oleh glutamat akan meningkatkan masuknya Ca^{2+} ke dalam sel yang diperantarai oleh *protein synaptic density* (PSD)-95 dari *neuronal nitric oxide synthase* (nNOS) yang juga akan memproduksi ROS. NO akan bereaksi dengan O_2 , membentuk peroksinitrit (ONOO). Saat iskemik xantine dehydrogenase di konversi menjadi xantine oxidase. Dalam reaksi ini juga terbentuk ROS. Sumber ROS lainnya adalah aktivasi *nicotinic adenin dinucleotide phosphat*

dehydrogenase (NADPH), disfungsi mitokondria, *cyclooxygenase* (COX), auto-oksidasi katkolamin, metabolisme asam lemak bebas terutama yang dilepaskan oleh asam arachidonat, migrasi leukosit dan neutropil.

Pembentukan ROS saat iskemik penumbra

Sama seperti saat iskemik, setelah aliran darah kembali oleh karena reperfusi spontan atau karena efek terapi, rantai respirasi mitokondria pulih kembali, tetapi konversi xanthine dehydrogenase ke xanthine oxidase bersifat ireversibel, sehingga akan terbentuk ROS yang berlebihan terutama di kompleks 1 rantai respirasi. Stres oksidatif dan peningkatan Ca^{2+} akan menyebabkan terbukanya *mitochondrial permeability transitional pore* (mPTP) yang menyebabkan masuknya air dari sitoplasma masuk ke dalam sel menyebabkan edem mitokondria dan rusak. Pembentukan ROS juga terjadi di sitoplasma melalui aktivasi *NADPH-oxidase* (NOX). Saat reperfusi terjadi hambatan terhadap enzim *casein kinase 2* (CK2), sehingga terjadi aktivasi NOX yang akan membentuk ROS lagi. Stres oksidatif yang melebihi kemampuan antioksidan untuk menetralkan akan mengakibatkan kematian sel

Pembentukan ROS di mitokondria

Mitokondria menggunakan O_2 sebanyak 1-2%, untuk reaksi rantai respirasi guna pembentukan ATP. Saat reaksi rantai respirasi akan terbentuk ROS yaitu anion superoksid (O_2^-) dalam jumlah sangat sedikit. ROS terbentuk terutama di rantai respirasi I dan III. Anion super oksid dibentuk dengan menambahkan satu elektron ke molekul oksigen. Reaksi ini diperantarai oleh enzim *adenine dinucleotide phosphate oxidase* (NOX) dan xanthin oksidase, dan proses non enzim yaitu ketika satu electron di transfer ke oksigen saat reaksi rantai respirasi. Anion super oksid akan bereaksi dengan nitrik oksid (NO) membentuk peroksinitrit ($ONOO^-$) yang

merupakan radikal oksidatif sangat kuat dan akan mengakibatkan nitratisasi.

Anion superoksid akan dikonversi menjadi H_2O_2 oleh enzim superoksid dismutase (SOD) yang selanjutnya dirubah menjadi air (H_2O) oleh enzim katalase. Bila H_2O_2 tidak dimetabolisme dan jika tersedia ion metal (Fe) akan terjadi reaksi Fenton maka akan terbentuk radikal hidroksil ($OH\cdot$) yang sangat toksik terhadap sel.

Produksi ROS yang berlebihan di mitokondria akan mengakibatkan terganggunya transport elektron sehingga terjadi penurunan produksi ATP, perubahan homeostasis Ca^{2+} , yang selanjutnya mengakibatkan disfungsi mitokondria. Disfungsi mitokondria mengakibatkan peningkatan permeabel membrane luar mitokondria, sehingga terjadi pelepasan protein pro-apoptosis.

Protein misfolding

Retikulum endoplasma (RE) adalah tempat penyimpanan Ca yang paling banyak dan organelnya adalah tempat untuk sintesis protein dan merspon terhadap protein *misfolding*. Peroses ini akan berdampak saat terjadi stres pada RE oleh iskemik. Saat terjadi eksitotoksik di sel neuron terjadi kegagalan *sarcoplasmic/ER calcium ATPase* (SERCA) karena kekurangan energi, yang selanjutnya terjadi kematian. Meningkatnya jumlah protein *misfolding* akan memicu jalur *protein kinase-like ER kinase* (PERK), yang akan mengaktifkan eIF-2 $_{\alpha}$ kinase yang akan menghentikan sintesis protein baru. Fosforilasi eIF-2 $_{\alpha}$ yang akan merubah kerusakan sel/jaringan pada iskemik serebri. *Inositol requiring enzyme 1* (IRE 1) protein yang terlibat dalam misfolding protein juga menginduksi jalur apoptosis saat ER stress. *Chaperones* yang dalam keadaan normal menuntun sintesis protein, juga mengalami perubahan pada saat iskemik. Peningkatan ekspresi *chaperones* akan mengurangi apoptosis dan kerusakan sel neuron saat iskemik.

Peran oligodendrosit dalam patofisiologi stroke

Oligodendrosit berasal dari *oligodendrocyte precursor cells* (OPCs), yang merupakan sumber pembentukan selubung mielin sel saraf, dan juga berperan dalam reparasi kerusakan substansia alba setelah iskemik serebri. Pada studi binatang coba maupun manusia, saat hipoksia/iskemik serebri terjadi peningkatan OPCs untuk peningkatan remielinisasi. Proliferasi, peningkatan dan migrasi dan difrensiasi OPCs juga terlihat di daerah peri infark. Lesi hipoksik/iskemia akan mengakibatkan unit neurovaskuler bereaksi terhadap iskemik/hipoksik. Reaksi ini akan membuat lingkungan mikro kurang baik terhadap oligodendrosit untuk perbaikan neuron, remodeling vaskuler dan remielinisasi. Oligodendrosit bekerja sama dengan makrofag dan mirkogleia dalam aktifitas perbaikan sel neuron.

Iskemik Penumbra



Konsep iskemik penumbra berawal dari proposal yang diajukan oleh Astrup *et al.* (1981) yang menekankan pentingnya hubungan antara waktu dan terjadinya perkembangan iskemik fokal pada jaringan otak yang mengalami kerusakan. Konsep penumbra adalah perbedaan area didaerah otak yang mengalami iskemik yang akan berkembang kearah kematian otak yang ireversibel dengan berjalannya waktu. Perkembangan ini merupakan masalah yang sangat kritis karena berhubungan dengan penurunan aliran darah otak yang berat. Iskemik penumbra adalah penurunan aliran darah pada satu area serebri tanpa adanya cetusan elektrik spontan atau yang menginduksi potensial listrik untuk memelihara homeostatis ion dan potensial listrik transmembran. Iskemik penumbra adalah area yang mengalami penurunan pasokan aliran darah yang digunakan untuk memelihara energi metabolisme, sehingga penurunan aliran darah pada batas bawah antara 10-15 ml/100 gram jaringan otak/menit dan batas atas 25 ml/100 gram jaringan otak/menit adalah area jaringan iskemik penumbra. Inti iskemik adalah bila aliran darah dibawah batas bawah ambang aliran darah. Patofisiologi yang berhubungan dengan penurunan aliran darah otak (ADO) dengan aktifitas metabolik di jaringan yang mengalami iskemik adalah

sangat penting tetapi tidak mudah menghubungkannya dengan status neurologi pasien stroke.

Definisi iskemik penumbra selanjutnya difokuskan pada perubahan molekul akibat penurunan ADO. Sejumlah efek seluler terjadi pada daerah iskemik penumbra seperti penurunan sintesis protein yang digunakan untuk sintesis ATP, induksi asidosis, pelepasan neurotransmitter eksitotoksik, peningkatan nitrik oksid, interleukine 1 (IL-1), *transforming growth factor-1 β* (TGF-1 β), *tumor necrosing factor- α* (TNF- α), *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*, dan *hypoxic inducible factor (HIF)*. Molekul lainnya seperti *matrix metalloproteinase (MMPs)* dan signal NMDA berperan ganda yaitu memdiasi injuri iskemik sesaat setelah iskemik dan berperan dalam pemulihan pada fase selanjutnya.

Definisi yang relevan dari iskemik penumbra adalah berdasarkan tehnik *imaging*. Pemeriksaan untuk menilai penurunan aliran darah di otak dengan *magnetic resonance perfusion-weight imaging (MR-PWI)* telah diterima secara luas, tetapi tidak bisa melihat pusat lesi. Pemeriksaan dengan *MR diffusion weight imaging (DWI)* bisa melihat daerah yang mungkin bisa diselamatkan. Kombinasi pemeriksaan PWI dan DWI bisa saling melengkapi kekurangan masing-masing pemeriksaan tersebut. Para peneliti saat ini menggunakan *MR spectroscopy* untuk melihat hemodinamik didaerah iskemik penumbra, mengetahui penurunan aliran darah, dengan menilai peningkatan ekstrasi oksigen, depolarisasi anoksik. Masing-masing pemeriksaan itu tidak bisa membedakan secara jelas daerah inti infark, iskemik penumbra, daerah otak yang normal, sehingga diperlukan kombinasi semua pemeriksaan tersbut. Pemeriksaan dengan *positron emission tomography (PET) scan/single photon emision CT* bisa mengukur aliran darah otak dan metabolisme glukosa di daerah tertentu dari otak sehingga merupakan standar baku untuk menilai daerah iskemik.

Studi imaging mengenai penumbra pada binatang maupun

manusia banyak dikerjakan dengan *positron emission tomography* (PET) scan. Studi PET memungkinkan peneliti mengevaluasi secara *invivo* hubungan antara ADO dengan parameter metabolik seperti *cerebral metabolic rate of oxygen* (CMRO₂) dan *rate oxygen extraction* (OEF) di jaringan otak. Dalam keadaan normal CBF, CMRO₂ hubungannya bersifat sejajar dan OEF sama seluruh jaringan otak. Pada iskemik fokal di otak ada 4 jenis gambaran PET.

1. Terjadi peningkatan *cerebral blood volume* (CBV) untuk memelihara CBF dalam merespon kondisi fisiologi atau sesuai kebutuhan (autoregulasi).
2. Peningkatan OEF untuk merespon penurunan CBF, sehingga CMRO₂ terpelihara (tetap), keadaan ini disebut oligemia
3. Peningkatan OEF di daerah otak yang mengalami penurunan CBF dan CMRO₂ untuk mencoba memelihara metabolisme jaringan otak sebanyak mungkin, dan pola ini disebut iskemik jaringan dengan penumbra
4. CBF dan CMRO₂ sangat rendah dengan OEF sangat jelek dan pola ini merepresentasikan lesi iskemik ireversibel atau inti infark

Modalitas imaging lain yang digunakan adalah *diffusion-weighted imaging* (DWI) dan *perfusion weighted MRI* (PWI) yang bisa memberikan informasi mengenai karakteristik jaringan otak yang lesi dan aliran darah di mikrosirkulasi. Abnormalitas dari *apparent diffusion coefficient* (ADC) pada daerah otak yang iskemik pada DWI dan perfusi jaringan pada PWI sudah bisa dideteksi dalam hitungan menit setelah awitan stroke pada binatang coba dan pada kebanyakan pasien stroke jika dikerjakan pada fase awal. Pada daerah otak yang iskemik mengalami penurunan perfusi pada PWI dan hiperintens pada DWI maka daerah tersebut adalah mengalami infark, sedangkan daerah dengan PWI abnormal dan DWI normal maka daerah tersebut disebut penumbra. Keadaan ini disebut DWI-PWI *mismatch*, yang dipakai di klinik untuk membedakan daerah infark dan penumbra.

Iskemik penumbra sebagai target biokemikal

Definisi iskemik penumbra dengan tehnik imaging masih menjadi masalah. Kaskade molekuler dicoba dipakai sebagai dasar pembuatan definisi. Dasar terjadinya iskemik adalah penurunan aliran darah yang mengakibatkan penurunan pembentukan ATP dan kegagalan pompa Na^+/K^+ , sehingga terjadi peningkatan konsentrasi glutamat ekstra seluler dan aktivasi reseptor glutamat (NMDA/AMPA) yang akan meningkatkan kadar Ca^{2+} intra seluler. Peningkatan Ca^{2+} intra seluler akan meningkatkan pembentukan ROS melalui peningkatan aktivasi *nitric oxide synthetase* (NOS) yang akan membentuk *nitric oxide* (NO) yang akan bereaksi dengan anion superoksida membentuk peroksinitrit yang sangat toksik terhadap sel, sehingga terjadi kematian sel. Kematian sel akibat kaskade iskemik dimulai dari inti iskemik dan bila tidak mendapat terapi yang memadai maka kematian sel akan meluas ke daerah iskemik penumbra. Kematian sel di daerah iskemik penumbra terjadi melalui proses yang lebih lambat yaitu apoptosis. Saat terjadinya kaskade iskemik merupakan waktu yang tepat untuk mencegah kaskade tersebut dengan neuroprotektor.

Iskemik penumbra sebagai target plastisitas otak

Pasien stroke yang mendapatkan terapi reperfusi (rekanalisasi) jumlahnya sangat sedikit (5%), sehingga sebaiknya terapi stroke tidak hanya berdasarkan reperfusi. Pasien tanpa reperfusi daerah penumbranya masih bertahan hidup, sehingga terapi dimasa yang akan datang adalah dengan memperhatikan plastisitas otak.

Faktor pertumbuhan seperti *transforming growth factor- β* atau *fibroblast growth factor-2* dan *chemokine stromal cell-derived factor-1* ekspresinya berlebihan di daerah iskemik penumbra, yang berasal dari sumsum tulang belakang dan *neuronal stem cell* di samping sel yang mengalami kerusakan. *Stromal cell-derived factor-1* masih nampak 30 hari setelah stroke di daerah iskemik

penumbra dan bahkan lebih lama di daerah pusat infark bila terjadi pembentukan pembuluh darah yang baru. Ekspresi *stromal cell-driven factor-1* di daerah penumbra dihubungkan dengan astrosit perivaskuler yang rekatif, sehingga diduga *stromal cell-driven factor-1* berperan dalam palstisitas setelah iskemik.

Iskemik penumbra sebagai target neuroproteksi dan neuroreparasi

Daerah iskemik penumbra menjadi target untuk neuroproteksi maupun terapi neurorepar. Liposom adalah suatu *transporter* yang dipakai supaya obat sampai ke sel otak. Liposom bisa melewati sawar darah otak karena strukturnya yang lipofilik. Obat neuroproteksi atau neuroreparasi yang dimasukkan kedalam kapsul liposom, stabilitasnya akan meningkat sehingga efek terapinya juga meningkat. Pada percobaan bintang sitikolin yang dimasukkan kedalam kapsul liposom merupakan terapi yang efektif pada stroke.

Peran Inflamasi pada Stroke



Inflamasi berperan penting pada patogenesis stroke iskemik dan lesi otak iskemik lainnya. Respon inflamasi pada stroke seperti pedang bermata dua yaitu mengakibatkan bertambah berat kerusakan pada fase akut, tetapi berperan menguntungkan pada fase perbaikan kerusakan otak setelah stroke.

Iskemik serebri merubah keseimbangan antara respon pro inflamasi dan anti inflamasi. Studi preklinik inhibisi respon inflamasi akan mengurangi kerusakan otak dan memperbaiki luaran gejala klinis neurologi. Studi klinik mengindikasikan inflamasi sitemik mempengaruhi kerentanan pasien untuk menderita stroke yang akhirnya mempengaruhi prognosis.

Inflamasi di otak merupakan target terapi pada penyakit otak seperti stroke dan trauma. Setelah iskemik otak, respon inflamasi dimulai sebagai hasil dari beberapa unsur seperti terbentuknya ROS, nekrosis sel dan kegagalan homeostasis jaringan. Unsur ini akan mengakibatkan aktivasi sel inflamasi. Aktivasi sel inflamasi juga berperan dalam remodeling jaringan setelah kerusakan otak.

Stroke iskemik diakibatkan karena penurunan aliran darah otak, akan mengakibatkan penurunan aliran darah di daerah penumbra, yang selanjutnya akan mengakibatkan kaskade kompleks seperti eksitotoksik, stress oksidatif di daerah neuron yang iskemik. Kaskade ini akan mengaktifkan mikroglia dan melepaskan sitokin proinflamasi seperti $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, dan $IL-$

6. Sitokin ini berpotensi menimbulkan reaksi inflamasi dengan merekrut dan infiltrasi neutropil, monosit dan sel T ke tempat lesi. Pada daerah inti infark, sel mengalami kematian (nekrosis), dan akan melepaskan *damage associated molecule patterns* (DAMPs) yang selanjutnya akan terdeteksi oleh sel imun seperti sel *natural killer* (NK). Pada fase awal strokefrantalkine dilepaskan dari neuron yang iskemik dan merekrut sel NK ke daerah iskemik. Sel NK akan mempengaruhi neuron yang iskemik dengan melepaskan sitokin terutama TNF, yang akan meningkatkan pelepasan glutamat yang akan mengakibatkan hiperaktivitas neuron dan eksitotoksik yang selanjutnya akan mengakibatkan kematian sel. Sel NK juga melepaskan sitokin seperti interferon γ (IFN- γ) dan *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) yang akan mengaktifkan mikroglia dan makrofag dan astorsit. Astrofit akan mensekresi mediator inflamasi seperti IL-1 β , IL-6 dan NO. Eksitotoksik dan inflamasi yang diinduksi oleh mikroglia dan sel NK berkontribusi untuk terjadinya neurotoksisitas dan apoptosis.

Mediator inflamasi pada stroke

A. Mediator proinflamasi

Lesi otak akan diikuti dengan respon inflamasi yang diperantarai oleh aktivasi dan perekrutan mikroglia. Mikroglia adalah sel residen makrofag dari otak, dan diaktifkan dengan hebat saat terjadi kerusakan otak. Iskemik otak akan mengaktifkan mikroglia dan bertransformasi menjadi sel fagosit dan melepaskan beberapa substansi sitokin dan sitoprotektif. Dalam merespon iskemia, aktivasi mikroglia akan mengakibatkan aktivasi sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , IL-6, yang mempunyai efek neurotoksik seperti prostanoind, ROS dan NO. Pada awal aktivasi mikroglia berusaha untuk memproteksi neuron, tetapi bila aktivasinya berlebihan, maka inflamasi yang terjadi sangat merusak, sehingga meningkatkan kemungkinan kematian neuron.

Sawar darah otak berperan untuk melindungi sel otak terhadap pengaruh rekasi inflamasi dari monosit, neutrophil masuk ke otak, dan hanya mikroglia yang terlibat dalam proses inflamasi di otak. Pada stroke terjadi kerusakan sawar darah otak sehingga monosit dan neutrofil bisa masuk ke dalam otak, yang diatur oleh *celluler adhesion molecules* (CAMs) seperti *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) dan *signal* kemokin. Neutropilia dan limpositopenia dijumpai pada iskemi serebri pasien. Pada stroke iskemik terjadi nekrosis sel neuron dan jumlah sel imun yang berlebihan, sehingga disimpulkan inflamsi otak adalah proses yang kompleks dengan beberapa sel imun ikut terlibat.

Astrosit juga membawa faktor inflamasi seperti kemokin, sitokin dan NO. Beberapa sitokin yang dikirm dari perifer seperti limfosit T, leukosit mononuklear, sel NK, leukosit polimorfonuklear yang semuanya terlibat dalm reaksi inflamasi. Sel NK selama stroke infiltrasi ke daerah iskemik. Selama iskemik serebri fractalkine dilepaskan dari neuron yang iskemik, yang kemudian merekrut sel NK yang akan menentukan luasnya lesi. Sel NK juga akan memperluas infark serebri dengan cara meningkatkan inflamasi lokal dan hiperaktifitas neuron yang akhirnya akan mengakibatkan kematian sel.

Pada jaringan otak yang iskemik ROS menginduksi ekspresi gen proinflamasi seperti *nuclear factor-kappaB* (NF- κ B), *interferon regulator factor-1* (IRF-1), HIF 1 dan *signal transducer and activator of transcription-3* (STAT3). Faktor inflamasi ini akan meningkatkan ekspresi sitokin dan juga molekul adesi. Molekul adesi mengalami peningkatan regulasi dalam hari pertama dan bertanggung jawab terhadap migrasi leukosit melalui endotel serebri. Neutrofil juga melakukan infiltrasi ke otak karena kerusakan sawar darah otak, dan diperantarai oleh selektin, integrin dan immunoglobulin. Infiltrasi neutrophil ke daerah iskemik otak akan mengakibatkan pelepasan radikal bebas dan enzim proteolitik yang akan mengakibatkan

kerusakan jaringan otak.

Sitokin dan respon neuro inflamasi

Sitokin berperan dalam mekanisme inflamasi dan berkontribusi dengan lesi serebral. Selama iskemik sitokin pro-inflamasi nampaknya memperberat kerusakan serebral. Sitokin pro-inflamasi adalah TNF- α , IL-1 β , IL-6 dan kemokin, sedangkan sitokin anti-inflamasi adalah IL-10, dan TGF- β . Sitokin anti dan pro inflamasi disekresikan oleh sel berbeda di serebri, seperti mikroglia, astrosit, sel endotel, dan neuron. Pada studi binatang coba, terjadi peningkatan produksi sitokin pro-inflamasi dibandingkan dengan sitokin anti-inflamasi, dan hal ini berhubungan dengan meluasnya infark. Masuknya Ca²⁺ ke dalam sel karena aktifitas IL-1 di NMDRAs, akan mengakibatkan kematian sel, sehingga pemberian *recombinant IL-1 receptor antagonist* akan menurunkan nekrosis dan volume infark. Pemberian IL-1 β intraventrikuler pada binatang coba akan meningkatkan infiltrasi neutrofil ke serebri sehingga mengakibatkan edem serebri dan meluasnya infark.

Pada studi eksperimental iskemik serebri IL-6 meningkat dalam 3-3,5 jam setelah stroke, dan mencapai puncaknya dalam 12 jam dan masih berlangsung paling lama 24 jam. Kadar IL-6 berkorelasi dengan luasnya infark dan prognosis. IL-6 mempunyai efek ganda yaitu setelah stroke IL-6 signaling memperlihatkan efek antiinflamasi dengan cara menginduksi sintesis antagonis reseptor IL-1, menghambat TNF- α , dan menginduksi apoptosis neutrofil. Dalam perjalanan stroke IL-6 juga mempunyai efek *remodelling* dan penyembuhan yaitu dengan cara mengaktifkan faktor transkripsi yaitu *signal transducer and activator of transcription (STAT)*.

Beberapa studi memperlihatkan terdapat korelasi yang positif antara kadar TNF- α dengan derajat kerusakan jaringan otak. Pada studi binatang coba dengan menggunakan tikus dengan pemberian antibodi anti TNF- α dan *TNF- α binding protein* terjadi penurunan

luasnya infark. TNF- α menstimuli infiltrasi neutrofil ke serebri dengan cara menginduksi molekul adesi di sel endotel serebri, dan juga merusak sawar darah otak dan menstimuli ekspresi mediator inflamasi lainnya.

NF-kB adalah faktor transkripsi yang berhubungan dengan respon inflamasi selama iskemik, terlibat dalam aktivasi beberapa gen proinflamasi seperti TNF- α , ICAM-1, IL-6, iNOS dan siklooksigenase-2. Studi membuktikan inhibisi jalur NF-kB, akan mencegah pembentukan sitokin proinflamasi.

Matrix metalloproteinases (MMPs) adalah famili enzim proteolitik bertanggung jawab terhadap *remodelling* matriks ekstraseluler. Ekspresi MMPs meningkatkan respon sel neuron serebri terhadap trauma. Selama trauma serebri ekspresi MMPs terlihat pada beberapa sel seperti sel neuron, astrosit, mikroglia dan sel endotel. Studi eksperimental memperlihatkan MMP-9 dan MMP-2 berperan dalam rusaknya sawar darah otak sehingga mengakibatkan terjadinya transformasi hemoragik pada stroke iskemik. MMP-9 berhubungan dengan inflamasi neuron, sehingga inhibisi MMP-9 akan memberikan efek menguntungkan pada luaran stroke.

B. Mediator anti inflamasi

TGF- β dan IL-10 adalah sitokin imunomodulator pleiotropik yang berperan sebagai anti inflamasi dan perbaikan jaringan. Produksi sitokin ini distimuli oleh proses fagositosis dan terjadi selama proses pembersihan sel yang mati. Peningkatan regulasi TGF- β setelah iskemik terjadi di mikroglia dan makrofag, yang bersifat neuroproteksi, dan juga berefek pada sel imun. TGF- β menekan respon inflamasi dengan cara menghambat *T helper 1* (Th-1) dan Th-2, serta mempromosi berkembangnya sel T regulator (T reg). IL-10 sebagai sitokin immunoregulator, memproduksi beberapa sel seperti sel Treg, yang bersifat neuroprotektif dan antiinflamasi.

Pasca iskemik serebri produksi TGF- β dan IL-10, dapat memfasilitasi perbaikan jaringan dengan meresolusi respon inflamasi dan efek neurprotektif pada sel yang masih hidup di area iskemik.

IL-10 adalah sitokin antiinflamasi akan menghambat produksi sitokin pro-inflamasi dan sekresi kemokin dan mencegah pengiriman antigen oleh makrofag dan mikroglia. IL-10 juga dapat menetralkan efek buruk dari TNF- α dengan cara mencegah aktivasi jalur signal sel yang distimuli oleh TNF- α .

TGF- β , adalah suatu neuroprotektor bisa melawan efek neuroinflamasi, dan memberikan neuroprotektif terhadap sel neuron yang mengalami iskemik. Pemberian TGF- β pada binatang coba akan menurunkan jumlah neutrophil dalam sirkulasi, dan akan memperbaiki lesi neuron pasca iskemik.

Peran inflamasi dalam resolusi dan perbaikan jaringan

Inflamasi pasca iskemik adalah proses berjalan sendiri, dan bahkan mereda untuk persiapan reorganisasi struktural dan fungsional. Faktor yang berperan dalam resolusi inflamasi dan homeostasis jaringan belum diketahui dengan pasti, terutama di serebri. Bukti-bukti menunjukkan resolusi inflamasi bukan proses yang pasif karena kurangnya signal untuk resolusi, tetapi diatur oleh sejumlah besar mediator yang secara aktif menekan respon inflamasi. Sebagai proses ini adalah fagositosis sel yang mati, munculnya mediator inflamasi, dan terbentuknya faktor-faktor untuk mempertahankan kehidupan sel.

Pembersihan sel yang mati dan penekanan inflamasi merupakan kunci perbaikan sel neuron serebri. Proses pembersihan ini diatur dengan signal "*find me*" "*eat me*". Signal "*find me*" menarik mikroglia dan makrofag melalui reseptor P2Y₂, sedangkan signal "*eat me*" termasuk UDP berikatan pada reseptor P2Y₂ sehingga menstimuli mikroglia untuk fagositosis, dan *phosphatidylserine* (PtdSer) berpindah lokasi ke lapisan

luar membrane sel yang mengalami apoptosis. PtdSer-binding protein terlibat dalam pembersihan sel yang mati seperti *milk fat globule epidermal growth factor 8 protein* di mikroglia dan sel T immunoglobulin, dan *mucin domain-containing molecule-4* (TIM4) di makrofag. Immunoglobulin yang secara langsung melawan antigen di SSP juga menstimuli untuk peroses fagositosis dengan cara menarik reseptor Fc di sel fagosit. Fagositosis menstimuli sekresi IL-10, TGF- β , yang selanjutnya mensupresi antigen dan menstimuli terbentuknya Treg dan menghambat ekspresi molekul adhesi dan produksi sitokin proinflamasi. TGF- β , dan IL-10 disamping mempunyai efek neuroprotektif juga berperan dalam perbaikan sel neuron serebri. Faktor pertumbuhan seperti *nerve-growth factor* (NGF), BDNF, iGF-1, VEGF yang diproduksi oleh sel endotel, astrosit, neuron, astrosit, oligodendrosit dan mikroglia adalah berperan dalam reorganisasi jaringan dan perbaikan sel neuron serebri.

Mikroglia dan makrofag adalah sel fagosit yang berperan dalam pembersihan sel yang mati dan sisa jaringan setelah stroke. Signal *find me* yaitu pelepasan purin dari sel yang rusak, penarikan mikroglia dan makrofag dari sekitar sel yang rusak. Peran sel fagosit adalah pada signal "*eat me*" untuk sel yang mati. Resolusi inflamasi dan pembersihan sel yang mati adalah kunci dari perbaikan sel neuron serebri.

Peran mikroglia pada patofisiologi stroke



Inflamasi berperan penting dalam lesi pasca iskemik. Aktivasi mikroglia, yang merupakan sebagian besar sel imun di otak merupakan kunci dari respon sistem imun. Sekali teraktivasi mikroglia berkembang menjadi makrofag yang mempunyai kemampuan fagositosis, produksi sitokin, antigen dan pelepasan MMPs yang bisa memperlemah sawar darah otak, sehingga leukosit bisa migrasi ke otak.

Fenotipe mikroglia

Fenotipe mikroglia ada 3 yaitu: Keadaan istirahat (resting state), aktivasi klasik, dan aktivasi alternatif.

Keadaan istirahat

Mikroglia saat istirahat ada pada otak yang sehat, dan dikenal sebagai *surveying microglia* yang secara konstan memanjang dan memendek percabangannya dalam usahanya memelihara lingkungan mikro di sistem saraf pusat (SSP). Mikroglia di otak mengontrol jumlah sinaps dan remodeling dalam perkembangan otak dan mencegah akumulasi sisa sel yang rusak pada otak yang sehat. Bentuknya berbeda tergantung dari lokasi, ekspresi proteinnya, dan

morfologinya. Bentuknya yang heterogen dan lokasinya tergantung dari responnya terhadap trauma dan aktivitasnya. Sebagian besar mikroglia dijumpai substansia grisea dan dengan percabangan yang bersifat radial dibanding dengan yang dijumpai substansia alba yang lebih banyak dengan percabangan longitudinal. Pada daerah penumbra bentuk mikroglia lebih banyak dalam bentuk dengan bercabang yang lebih panjang, (istirahat) sedangkan pada daerah inti iskemik lebih banyak berbentuk amoboid dengan percabangan yang lebih banyak (bentuk aktif). Mikroglia saat istirahat tidak berarti mikroglia dalam keadaan tidur, tetapi dalam keadaan seimbang untuk merespon stimuli gangguan lingkungan SSP karena perubahan fenotipe dan fungsi.

Aktivasi mikroglia

Mikroglia yang aktif dapat memfagosit organisme asing seperti pada lesi otak. Pada stroke iskemik aktivasi mikroglia terjadi pada fase awal neuroinflamasi, dan dapat dideteksi 2 jam setelah iskemik dan berlangsung sampai 1 minggu. Aktivasi mikroglia adalah berdasarkan ekspresi signal protein dalam peran mikroglia merespon trauma SSP. Mikroglia dapat berubah pola migrasi, ekspresi sel permukaan dan fungsi dalam merespon kerusakan atau disfungsi jaringan. Respon yang cepat ini untuk merubah homeostasis parenkim otak, dalam waktu beberapa menit, yaitu dengan meningkatkan motilitas mikroglia menuju daerah kerusakan pada SSP.

Tipe aktivasi mikroglia

Respon mikroglia terhadap perubahan lingkungan di SSP dapat diklasifikasikan menjadi M1 (klasik) dan M2 (alternatif). Tipe M1 berasal dari Th-1 berhubungan dengan respon proinflamasi seluler yang akan meningkatkan sintesis mediator proinflamasi seperti IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-6, CXCL10, ROS dan produksi NO dan enzim proteolitik yang akan mengakibatkan bocornya sawar darah otak,

yang semuanya bisa mengakibatkan lebih lanjut yaitu kematian sel neuron. Aktivasi tipe M2 (alternatif) mikroglia berasal dari Th-2 dan melepaskan mediator anti inflamasi seperti IL-10, TGF- β , IL-4, IL-13, IGF-1, yang akan mengakibatkan peningkatan ekspresi gen untuk resolusi inflamasi, pembersihan debris dan homeostasis. Kadar IL-10, TGF- β , meningkat pada hari pertama setelah stroke dan mencapai puncaknya pada hari ke 4-6. TGF- β yang dilepaskan oleh mikroglia akan merangsang mediator inflamasi dan meningkatkan proliferasi dan neuroproteksi di daerah otak yang rusak. Pada proses penuaan dan progresifitas penyakit aktivasi mikroglia berubah dari M2 ke M1. Pada studi binatang aktivasi mikroglia terjadi 7 hari setelah dilakukan oklusi arteri serebri media menjadi penotipe M1.

Aktivasi mikroglia selama stroke iskemik

Aktivasi mikroglia adalah langkah awal terjadinya respon inflamasi di otak, diikuti dengan infiltrasi sel imun, seperti neutrofil, makrofag/monosit, *natural killer cells*, sel T dan aktivasi sel neuron lainnya. Aktivasi mikroglia terjadi dalam hitungan menit setelah trauma otak, dan akan memproduksi mediator inflamasi seperti iNOS, NO, sitokin proinflamasi seperti TNF- α , anti inflamasi seperti TGF- β , faktor pertumbuhan seperti *insulin-like growth factor* (IGF-1), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *platelet growth factor* (PGF), *nerve growth factor* (NGF), *brain-derived growth factor* (BDNF), *neurotrophin-3* (NT-3), NT 4,5 dan plasminogen (PGn). Mediator ini bisa memperberat atau mengurangi kerusakan otak selama iskemik, meskipun hal ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut. Contohnya pada TNF- α , pada percobaan bintang dengan oklusi arteri serebri media pemberian recombinant TNF- α akan memperberat kerusakan otak, tetapi studi dengan dengan TNF- α -TNF- α receptor 1 (TNF-p55R) dan TNF α receptor II memberi hasil yang berbeda. Pada tikus dengan kadar TNF- α -TNF- α receptor 1 (TNF-p55R yang lebih

rendah, maka infark ayng terjadi lebih luas dan luarannya lebih jelek dibandingkan dengan TNF α receptor II, sehinga efek neuroprotektif TNF- α terhadap iskemik serebri adalah melalui TNF- p55R.

Mikroglia membunuh sel neuron

Mikroglia membunuh sel neuron dengan beberapa mekanisme sperti:

1. Stimuli *phagocyte NADPH oxidase* (PHOX) untuk memproduksi superoksid dan derivat oksidan. Mikroglia dalam keadaan istirahat atau aktif mengekspresikan PHOX. Pada penotipe aktivasi klasik akan meningkatkan ekspresi PHOX akan meningkatkan produksi superoksid ekstra seluler atau fagosom yang akan dirubah menjadi hidrogen peroksida dan bereaksi dengan NO menjadi peroksinitrit yang akan mengakibatkan kematian sel neuron. Aktifasi PHOX mikroglia tidak mengakibatkan kematian sel neuron secara akut, tetapi akan menstimuli mikroglia untuk memproduksi TNF- α dan IL-6 dan iNOs.

2. Melepaskan glutamat dan glutaminase

Mikroglia, astrosit dan sel neuron mepelaskan glutamat pada kondisi iskemik. Glutamat melalui aktivasi respetor glutamat secara langsung bisa mengakibatkan toksik sel neuron. Glutamat yang berlebihan di ekstra seluler disertai dengan dengan depolarisasi neuron berkelanjutan tidak dapat menahan aktivasi reseptor NMDA akan mengakibatkan eksitotoksik dan kematian sel neuron. Pelepasan glutaminase akan meningkatkan sintesis glutamate dari glutamin.

3. Melepaskan mediator pro inflamasi.

Aktivasi mikroglia akan melepaskan mediator inflamasi yang akan meningkatkan respon inflamasi dan merekrut dan mengaktifkan mikroglia lainnya yang mempunyai efek patogen atau merusak sel neuron. TNF- α dan IL-1 β telah terbukti

mengakibatkan kematian neuron. TNF- α bisa mengakibatkan kematian sel melalui mekanisme apoptosis dengan berikatan dengan reseptor TNF, juga bisa mengakibatkan nekroptosis melalui ikatan dengan *receptor-interacting protein-1* (RIP-1), RIP3 dan *mixed ligand kinase-domain-loke protein 1* (MKL1).

4. Melepaskan enzim proteinase (cathepsin)

Cystein protease B-cathepsin B dilepaskan oleh mikroglia yang aktif memperlihatkan efek neurotoksik pada penyakit neurodegeneratif. Hal ini terlihat bila mikroglia distimuli dengan peptida kromogranin A akan melepaskan cathepsin B akan mengakibatkan apoptosis sel neuron, keadaan ini dapat dicegah dengan penghambat kaspase atau pemberian antibodi cathepsin B.

5. Mengekspresikan iNOS

iNOS dalam keadaan normal tidak terekspresikan di otak, tetapi mediator inflamasi seperti lipopolisakarida, dan sitokin mengakibatkan terjadi ekspresi iNOS di mikroglia dan astrosit. Sekali terekspresi mikroglia akan melepaskan iNOS dalam konsentrasi yang sangat tinggi. iNOS yang tinggi akan mengakibatkan kematian sel dengan cara menghambat oksidasi sitokrom c di mitokondria. iNOS menghambat sistem respirasi di mitokondria mengakibatkan depolarisasi neuron sehingga terjadi pelepasan glutamate yang akan mengaktifkan reseptor NMDA dan mengakibatkan eksitotoksik neuron.

6. Fagositosis neuron yang stres

Inflamasi akan mengaktifkan mikroglia dan dapat menfagosit sel neuron yang stres tetapi masih bisa bertahan, sehingga akhirnya akan mengakibatkan kematian neuron lewat fagositosis. Keadaan ini terjadi karena aktivasi *toll-like receptor* (TLR), yang mengaktifkan mikroglia melepaskan oksidan mengakibatkan neuron terekspose dengan fosfatidil serine sesaat. Fosfatidil serine adalah fosfolipid yang dalam keadaan

normal berada dalam lapisan dalam plasma membrane, tetapi peningkatan kalsium, oksidan dan aktivasi kaspase, mengakibatkan pospatidil serine berada dilapisan luar plasma membran. Aktivasi mikroglia juga melepaskan opsonin *Milk fat globule-EGF factor 8 protein* (MFG-E8) yang akan berikatan dengan pospatidilserine dan mengaktifkan pagositosis melalui reseptor vitronectin yang diekpresikan oleh mikroglia.

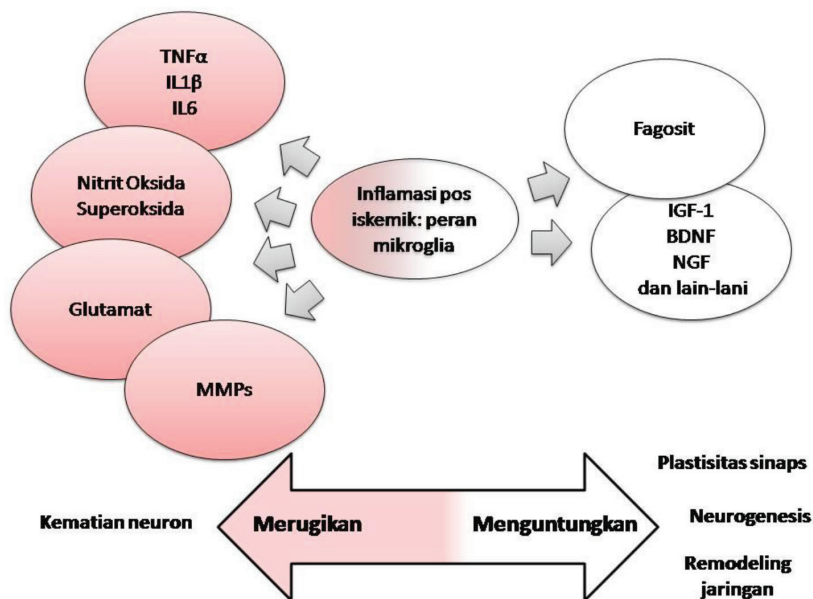
7. Penurunan pelepasan faktor nutritif (BDNF, IGF-1)

Aktivasi mikroglia dapat membunuh atau mengembalikan patogen, tetapi juga bisa sel neuron, seperti dibuktikan pada percobaan sel kultur. Mikroglia dalam keadaan normal berperan untuk memproteksi neuron seperti membunuh organisme patogen, mengembalikan debris dan beta amiloid dan memberi faktor nutritif seperti IGF-1 dan BDNF. Neuron akan mati jika mikroglia tidak bisa menyediakan faktor nutritif seperti BDNF dan IGF-1. Pada binatang yang diberikan lipopolisakarida terjadi penurunan IGF-1, sehingga mengakibatkan sel neuron mengalami kematian, jika tidak ada faktor nutritif lain terbentuk.

Peran mikroglia dalam iskemik serebri

Mikroglia di susunan saraf pusat akan menjadi makrofag, ketika terjadi perubahan homeostasis di sel. Mikroglia memegang peranan penting dalam respon inflamasi setelah iskemik serebri. Beberapa menit setelah iskemik serebri mikroglia akan berubah bentuk menjadi lebih amuboid sehingga sukar dibedakan dengan makrofag. Dalam keadaan aktivasi mikroglia migrasi dan menumpuk di daerah inti infark dan penumbra, yang memicu terjadinya respon inflamasi dan infiltrasi limfosit. Mikroglia masih tetap aktif dalam beberapa minggu setelah injuri dan puncaknya terjadi dalam 48-72 jam. Aktivasi mikroglia di daerah iskemik serebri menyebabkan neurotoksik dan memperberat kerusakan sel otak. Aktivasi mikroglia bersifat ganda seperti terlihat pada gambar 3, yaitu,

memproduksi sitokin pro-inflamasi ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$), ROS dan NO dan sitokin anti inflamasi seperti *glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF), *brain-driven neurotrophic factor* (BDNF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), IGF, $\text{TGF-}\beta$, VEGF.



Gambar 3. Fungsi ganda mikroglia

Pada perubahan menjadi makrofag, ada dua penotipe aktivasi mikroglia yaitu aktivasi klasik (M1) dan alternatif (M2). Hal ini menandakan mikroglia mengadopsi program fungsional yang berbeda dalam merespon lingkungan mikrovaskuler. Stimuli dengan liposakarida dan interferon- γ akan mengakibatkan aktivasi M1, yang berhubungan dengan pelepasan mediator pro-inflamasi. Interleukin 4 (IL-4) dan IL-10, mengaktifkan M2 yang akan melepaskan mediator anti inflamasi dan neuroprotektor, yang akan meningkatkan aktifitas fagosit dan menurunkan produksi mediator inflamasi. Peran aktifasi mikroglia pada iskemik serebri belum dimengerti dengan baik. Saat fase akut dari iskemik fentotipe

M2 lebih berperan dan perlahan bergeser ke M1 di sekitar lesi. Hal ini sesuai dengan proses fagositosis debris sel yang mati dan sekresi neurotropik faktor yang memulai proses penyembuhan dan rekonstruksi sel neuron.

Efek menguntungkan mikroglia setelah stroke

Mikroglia mendukung neuron bertahan hidup melalui pembersihan debris sel melalui fagositosis dan memproduksi faktor neurotropik dan sitokin anti inflamasi, untuk memicu perbaikan dan regenerasi sel di tempat lesi. Proliferasi mikroglia adalah sangat penting untuk luaran setelah iskemik serebri. Sekresi faktor pertumbuhan bersifat neuroprotektif dan menghambat efek neurotoksik neutrofil seperti terlihat pada sel otak yang mengalami kekurangan oksigen dan glukosa. Fagositosis sel yang mati oleh mikroglia akan memicu produksi sitokin imunomodulator seperti TGF- β yang akan menekan inflamasi dengan menghambat sel T helper dan memicu perkembangan sel T regulator dan IL-10, yang beresifat anti inflamasi dan neuroprotektif.

Fase akut iskemik serebri aktifitas yang berlebihan dari mikroglia mengakibatkan efek buruk pada sel neuron. Perkembangan selanjutnya setelah berkurangnya respon inflamasi peran mikroglia akan berubah menjadi neuroprotektif melalui aktifitas fenotipe M2 yang meningkatkan peran fagositosis, penurunan mediator inflamasi pelepasan faktor neuroproteksi seperti GDNF, BDNF, bFGF, IGF-1, TGF- β dan VEGF.

Efek merugikan mikroglia pada iskemik serebri

Efek merugikan mikroglia pada iskemik serebri berhubungan dengan fenotipe M1. Aktifasi disekitar lesi akan melepaskan produk sitotoksik seperti sitokin pro-inflamasi (IL-1 β , TNF α), ROS (anion superoksid, hidrogen peroksida, nitrik oksid), MMPs dan glutamat.

Anion superoksida diproduksi melalui aktivasi NOX. Efek sitotoksik dari superoksida adalah karena akan bereaksi dengan ROS lainnya membentuk peroksinitrit dan radikal hidroksil yang sangat toksik terhadap neuron.

Mikroglia adalah sumber utama MMPs yang dilepaskan mengikuti kaskade iskemik serebri terutama MMP3 dan MMP9. MMP akan mengakibatkan rusaknya sawar darah otak, yang selanjutnya akan mengakibatkan kerusakan sekunder sel otak. Mikroglia akan melepaskan glutamat ke ekstra seluler karena saat iskemik karena proses ambilan kembali terganggu sehingga terjadi peningkatan glutamat akan menyebabkan kematian sel neuron (nekrosis atau apoptosis).

Efek merugikan mikroglia masih menjadi perdebatan, tetapi beberapa studi membuktikan aktivasi mikroglia yang berhubungan dengan iskemik akan mengakibatkan kematian neuron. Studi akhir-akhir ini mendapatkan aktivasi mikroglia dengan aktifitas fagositnya akan mengakibatkan kematian sel lebih lambat. Efek fagositosis mikroglia berhubungan dengan *Milk fat globulin EGF-like factor 8* (MGF-E8) dan *Mer receptor tyrosine kinase* (MerTK) pada hari ke 3 sampai ke 7. Pada studi binatang dengan memblokir efek fagositosis mikroglia dengan cara menghilangkan efek MGF-E8 atau MerTK akan mengurangi kematian neuron dan atrofi otak. Studi ini juga menunjukkan bahwa MGF-E8 atau MerTK memediasi aktifitas fagositosis mikroglia secara spesifik pada sel neuron yang sehat dan yang sedang berkembang. Hubungan mikroglia dan neuron adalah proses yang kompleks, sehingga studi lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui peran fenotipe mikroglia pada iskemik serebri, untuk melakukan penelitian tentang terapi yang berhubungan dengan aktivasi mikroglia pada stroke iskemik.

Hubungan mikroglia dan neuron selama iskemik serebri

Neuron mengontrol aktivasi mikroglia

Neuron dapat mengontrol aktifitas mikroglia dengan signal "On" dan "Off". Signal "On" ditemukan terutama pada kondisi patologis, seperti peningkatan ekspresi chemokine, purin, glutamate dan MMP-3. Signal "Off" terutama terjadi pada otak yang sehat dimediasi dengan pelepasan CX3CL1, CD22, neurotransmitter dan neurotropin dari neuron, yang berikatan dengan reseptor pada mikroglia dan membantu mikroglia menjalankan fungsi fisiologisnya. Interaksi antara neuron dan mikroglia sangat kompleks dan melibatkan variasi ligand dan reseptor. Dua ligand dan reseptor yang banyak diteliti dan terlibat dalam mengontrol aktivasi mikroglia adalah CD200/CD200 reseptor dan CX3CL1/CX3CR1. CD200 diekspresikan oleh neuron sedangkan CD200R diekspresikan terutama oleh mikroglia di otak. Defisiensi CD200 atau penghambatan CD200R pada binatang coba akan mengakibatkan peningkatan aktivasi mikroglia dan perburukan gejala, sehingga disimpulkan CD200/CD200R berperan dalam memelihara aktivasi mikroglia. CX3CL1/CX3CR1 juga menghambat aktivasi mikroglia. CX3CL1 diekspresikan di neuron sedangkan CX3CR1 hanya diekspresikan di mikroglia otak. Pada percobaan binatang dengan tidak adanya CX3CR1 akan meningkatkan efek neurotoksik mikroglia dan menyebabkan kematian sel neuron pada model binatang dengan penyakit Parkinson dan *amyotrophic laterosclerosis (ALS)*.

Neuron mempengaruhi fungsi mikroglia

Setelah stroke iskemik sejumlah besar sel neuron mati karena berkurangnya aliran darah otak dan terjadi penurunan energi yang tajam. Sel yang mati atau sel yang sedang mati melepaskan *damaged-associated ligands* dan glutamat yang bersifat eksitotoksik, akan memperberat kerusakan neuron. Studi akhir ini menunjukkan lesi neuron mengakibatkan polarisasi mikroglia menjadi fenotipe

protektif melalui pelepasan lipocalin-2. Pada sel kultur neuron manusia atau otak tikus lipocalin-2 diekspresikan sangat tinggi. Terapi dengan lipocalin-2 menginduksi mikroglia melepaskan IL-10 dan bentuknya berubah dari banyak cabang cabang berkurang bentuk memanjang, dan meningkatkan kapasitas fagositosisnya. Media yang mengandung mikroglia diterapi dengan lipocalin-2 akan meningkatkan ekspresi sintosin dan *post-synaptic density 95* (PSD95) dan mencegah kematian neuron dari stres karena *oxygen-glucosa deprivation* (OGD). Kerusakan neuron yang diinduksi oleh iskemik akan melepaskan IL-4 yang akan meningkatkan ekspresi reseptor IL-4 di mikroglia sehingga mengakibatkan mikroglia mengalami polarisasi ke fenotipe M2. IL-4 mengaktifkan *peroxisome proliferator activated receptor γ* (PPAR γ) di mikroglia akan meningkatkan kapasitas fagositosis mikroglia terhadap neuron yang mengalami apoptosis. Glutamat yang dilepaskan akibat stress neuron akan meningkatkan kapasitas mikroglia untuk membersihkan sisa sel neuron yang mengalami kerusakan dengan mengeluarkan *soluble fractalkine* (sFKN) akan menstimuli mikroglia untuk berperan sebagai proteksi dan membantu neuron untuk bertahan hidup dalam kondisi iskemik.

Mikroglia mempengaruhi fungsi neuron

Dalam keadaan patologis mikroglia berfungsi sebagai pengaturan imunologi, dan akan berefek terhadap perkembangan penyakit melalui pengeluaran sisa jaringan yang rusak, melepaskan sitokin pro dan antiinflamasi dan memproduksi factor pertumbuhan. Mikroglia berperan penting dalam pertumbuhan dan memelihara homeostatis otak yang sehat termasuk modulasi sirkuit neuron melalui interaksi yang spesifik dengan sinap neuronal. Mikroglia secara langsung kontak dengan sinap neuron melalui proses pemanjangan bentuknya setiap 5 menit dalam 1 jam, sehingga mikroglia dapat mencapai daerah peri infark, sehingga bisa kontak dengan neuron lebih lama sampai 1 jam setelah iskemik. Kontak

yang lebih lama ini akan mengakibatkan hilangnya beberapa presinap boutons, sehingga diduga mikroglia memonitor fungsi sinap. Mikroglia akan memfagosit sel neuron dalam beberapa jam. Mikroglia berperan dalam remodeling jaringan yang rusak dengan jalan membersihkan sel yang mati atau yang sedang mati, bila kemampuan membersihkan sisa jaringan yang rusak kurang maka akan mengakibatkan kegagalan perbaikan jaringan yang rusak setelah iskemik serebri fokal. Pada studi binatang coba mikroglia otak membersihkan sisa sel neuron yang mengalami kerusakan pada hari 1 dan mencapai puncaknya hari ke 2, sedangkan mikroglia yang berinfiltrasi ke otak akan melakukan pembersihan sisa sel neuron yang rusak pada hari ke 4 setelah oklusi serebri media.

Astrostit Sebagai Target Terapi Neuroproteksi pada Stroke Iskemik Akut



Peran astrosit pada stroke iskemik

Mekanisme kematian sel neuron pada iskemik penyebabnya sangat banyak, seperti pembentukan radikal bebas yang berlebihan. Kematian sel juga akan menyebabkan kematian astrosit, tetapi kematian astrosit dan neuron mekanismenya berbeda. Penurunan aliran darah secara total, menyebabkan kematian semua jenis sel termasuk neuron dan astrosit pada inti iskemik, tetapi di daerah iskemik penumbra, astrosit bisa bertahan dalam jangka waktu yang lebih lama. Hal ini dibuktikan pada kultur sel, astrosit lebih tahan terhadap *oxygen glucose deprivation* (OGD) dibandingkan sel neuron. Satu jam setelah OGD mengakibatkan kematian sel neuron secara bermakna, tetapi tidak pada kultur astrosit. Astrosit lebih tahan terhadap hipoksia asal tersedia glukosa. Hal ini membuktikan kemampuan astrosit menggunakan glukose untuk pembentukan ATP. Peningkatan glikolisis akan meningkatkan pembentukan asam laktat yang akan mengakibatkan asidosis dan astrosit adalah lebih sensitif terhadap asidosis dibandingkan neuron, meskipun hal ini masih menjadi perdebatan. Studi *in vivo* mendapatkan astrosit lebih sensitif dibandingkan dengan neuron pada iskemik serebri, tetapi

hal ini tergantung dari sub tipe astrosit. Pada sub tipe protoplasmic, astrosit sangat rentan terhadap kematian pada stroke. Peneliti lainnya mendapatkan astrosit lebih lama bertahan dibandingkan neuron selama iskemia. Astrosit dan neuron berbagi sensitivitas terhadap stimuli yang merusak, dan astrosit lebih sensitif terhadap asidosis, tetapi lebih tahan terhadap efek eksitotoksik glutamat, dan neuron tidak dapat hidup tanpa astrosit, sehingga terapi dibidang neurologi dimasa depan tidak akan sukses kalau hanya ditujukan terhadap neuron.

Pada keadaan iskemik, terhentinya aliran darah ke otak sehingga mengakibatkan terjadi kekurangan oksigen dan glukosa dengan akibat terjadi penurunan energi. Peroses ini akan mengakibatkan akumulasi ion yang berlebihan dan disregulasi jalur beberapa signal, dan beban astrosit sebagai bufer berlebihan, yang akan mengakibatkan peroses katabolik yang dimediasi oleh protease, lipase, dan nuklease, sehingga mengganggu fungsi neuron dan akhirnya akan terjadi kematian neuron.

Astrosit kurang peka terhadap eksitotoksik oleh glutamate pada saat stroke, dan bisa menginduksi proliferasi dan peningkatan ekspresi *glial factor activator protein* (GFAP). Pada keadaan ini astrosit disebut dalam keadaan reaktif. Astrosit yang reaktif akan mengalami proliferasi dalam 3-5 hari setelah kerusakan korteks serberri dan setengahnya akan mengalami siklus kembali sampai 1 minggu berikutnya. Astroglia yang reaktif berhubungan dengan perubahan patologi di susunan saraf. Astrosit yang reaktif sering dijumpai disekitar lesi fokal yang berat, dan akan membentuk *scar glia*. Scar glia akan menghambat regenerasi akson, seperti fenomena maladaptif sehingga akan mengakibatkan neurotoksik, inflamasi, nyeri kronis. Keadaan ini didukung dengan lepasnya faktor pro inflamasi seperti, IL1- β , IL-6, IFN- γ , TGF- β , ROS, NO, glutamate, *calcium binding protein B* (S100b).

Astrosit yang aktif juga mempunyai efek yang menguntungkan seperti berperan dalam perubahan tonus vaskuler dalam merespon

aktivitas neuron seperti mengembalikan kelebihan glutamat dari celah sinap, membatasi pelepasan neurotransmitter berlebihan, mencegah eksitotoksik, menjaga integritas sawar darah otak, merangsang sinaptogenesis, dan memberi respon terhadap pro dan anti inflamasi. Astrosit yang reaktif juga berperan memproteksi sel neuron di SSP. Pada studi binatang didapatkan astrosit yang reaktif berperan dalam memproteksi SSP melalui fungsi homeostasis dengan cara menginduksi neurogenesis, mengatur sistem imun, dan memelihara sawar darah otak.

Peran astrosit dalam neurogenesis

Neurogenesis pada otak mamalia dewasa terjadi pada dua daerah spesifik yaitu lapisan subgranular dari girus dentatus hipokampus dan *subventricular zone* (SVZ) pada dinding lateral ventrikel lateralis. Sumber utama dari daerah SVZ adalah dari daerah germinal lainnya dari otak dewasa yang telah diidentifikasi sebagai astrosit dan mengekspresikan GFAP. Beberapa dari sel ini berperan memelihara potensi neurogenik seperti *neural stem cells* (NCS). Sel ini bisa membagi diri dan membentuk neuron baru pada kondisi normal. Sel GFAP⁺ tipe D, berasal dari astrosit dan mungkin berfungsi untuk sementara dalam membentuk neuron yang baru, tetapi hal ini masih memerlukan penelaitan lebih mendalam.

Pada studi *in vitro* setelah iskemik otak astrosit bisa berperan sebagai *stem cell*, sedangkan *in vivo* masih kontroversial. Pada studi *in vitro* sejumlah astrosit setelah mendapatkan *neurosphere-forming ability* multipotent dan mempunyai kemampuan untuk berkembang. Suatu studi menyebutkan terdapat dua tipe sel astrosit sebagai progenitor yaitu *NPC-astroglial cells* (*NPC-Astros*) dan *Oligo2PC-astroglial cells* (*Oligo2pC-astros*). Ketika dilakukan penanaman di otak pada iskemik otak, maka Oligo2pC-astros memperlihatkan efek neuroproektif dan memperbaiki *behaviour*. Peneliitian lain mendapatkan stroke bisa menginduksi neurogenesis

dari ekspresi GFAP-progenitor cell di SVZ, dan bermigrasi ke neurovaskuler korteks didaerah peri infark. Astrosit yang reaktif bisa mengkonversikan sel multipoten NCs membentuk *neurosphere* pada percobaan ini. Astrosit juga memelihara neuron hipokampus dalam neurogenesis. Astrosit juga bisa memelihara integrasi sinaptik neuron hipokampus dan memungkinkan maturasi dendrit dan spini di hipokampus, yang diperlukan untuk fungsi integrasi neuron baru tumbuh yang tergantung pada resptor NMDA. Protein β -*arr* 1 (β -arr 1) yang dihasilkan oleh astrosit di girus dentatus berperan dalam neurogenesis hipokampus yang sedang berkembang. *High-mobility group box 1 (HMGB1)* yang dilepaskan oleh astrosit pada *oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)* juga berperan dalam neurogenesis, yaitu menstimuli proliferasi NCS melalui aktivasi signal *PI3K/protein kinase B*. Dari penelitian ini disimpulkan astrosit berperan dalam terbentuknya neuron yang baru, memelihara, dan menstimuli neuron setelah iskemik serebri, dan mungkin dalam kondisi fisiologi, sehingga hal ini merupakan ladang penelitian lebih lanjut.

Peran astrosit sebagai anti eksitotoksik

Pada keadaan normal astrosit berperan dalam sintesis, pengambilan kembali atau daur ulang neurotransmitter, sehingga astrosit dengan cepat akan bisa mengembalikan konsentrasi neurotransmitter yang dilepaskan di celah sinap. Fungsi ini memungkinkan astrosit berperan dalam menjaga aktifitas di sinap dan menjaga eksitabilitas neuron. Glutamat adalah salah satu neurotransmitter eksitosik di SSP. Konsentrasi glutamate yang berlebihan akan mengakibatkan toksik pada neuron. Astrosit berperan dalam pengambilan kembali glutamate yang berlebihan melalui aktifitas *glutamate transported-1 (GT-1)* dan *glutamateaspartate transpoter (GLAST)* pada silkus glutamat-glisin.

Pada stroke iskemik, penurunan aliran darah ke otak,

mengakibatkan penurunan oksigen dan glukosa, yang selanjutnya akan meningkatkan konsentrasi glutamate, yang bersifat eksitotoksik pada sel neuron dan akan berakhir dengan kematian. Pada stroke terjadi penurunan *regulasi glutamate transported-1* (GT-1) dan *glutamate aspartate transporter* (GLAST), sehingga memungkinkan glutamate mengakibatkan kondisi eksitotoksik. Inhibisi *glutamine synthase* (GS) pada astrosit akan mengakibatkan kegagalan ambilan kembali glutamat, sehingga terapi terhadap GS akan merupakan terapi dimasa depan sebagai neuroprotektan pada disfungsi neuron. Astrosit mempunyai *excitatory amino acid transporter* (EAATs) lebih banyak dari mikroglia, dan astrosit dapat menghambat EAATs, sehingga dapat mengurangi efek glutamat yang dilepaskan oleh mikroglia untuk melindungi neuron, dan dengan menjaga ekspresi transporter dalam kondisi fisiologis di astrosit merupakan terapi untuk iskemik serebri. Obat yang dapat meingkatkan ekspresi GLT-1 seperti carnosine dan septriaxon memperlihatkan efek protektif setelah iskemik serebri pada nukleus CA1 hipokampus.

Astrosit sebagai sumber antioksidan

Pada iskemik serebri terjadi peningkatan produksi radikal bebas seperti NO, superoksida, peroksinitrit. Otak adalah organ yang sangat rentan terhadap stres oksidatif karena memerlukan energi untuk metabolisme sangat tinggi, mengandung lemak tidak jenuh yang sangat tinggi sehingga sangat memungkinkan terjadi peroksidasi lipid yang menghasilkan radikal bebas. Pada percobaan binatang kadar NOS meningkat dalam 10 menit oklusi arteri serebri media dan menetap selama 1 minggu. Radikal bebas akan mengakibatkan kematian sel dengan mempengaruhi permeabilitas mitokondria, sehingga terjadi pelepasan sitokrom c yang mengaktifkan kaskade apoptosis. Radikal bebas juga bisa mengakibatkan kematian sel lewat nekrosis. Astrosit terlibat dalam melawan efek stres oksidatif. Pelepasan glutathione dan superoksid dismutase (SOD)

oleh astrosit memegang peranan penting untuk mempertahankan kehidupan sel neuron, sebelum asam askorbat berftindak sebagai antioksidan. Pada kultur neuron dengan astrosit memperlihatkan kadar glutathion yang lebih tinggi dibandingkan kultur neuron saja. Glutathion adalah antioksidan yang paling banyak terdapat di otak dan berperan dalam secara langsung sebagai antioksidan. Glutathion dibentuk aktivitas glutathion peroksidase dengan menggunakan NADPH sebagai donor elektron. Proses ini berperan dalam mempertahankan glutathion bila kadar glutathion menurun. NADPH lebih banyak terdapat di astrosit dibandingkan dengan neuron, dan astrosit mempunyai kapasitas lebih tinggi untuk menstimulasi jalur ini dalam merespon stress oksidatif. Astrosit juga melepaskan asam askorbat dalam merespon aktivitas glutamat. Asam askorbat diambil oleh neuron dan dimodifikasi sebagai metabolisme energi lokal dengan cara menghambat konsumsi glukosa dan peningkatan netralisasi laktat.

Astrosit juga mengekspresikan faktor neuroprotektif yang berperan dalam pembersihan radikal bebas, detoksifikasi xenobiotics, dan memelihara potensi redoks yaitu *nuclear factor erythroid 2-factor 2* (NrF2). Pada model stroke jalur NrF2 aktif baik in vitro maupun in vivo dan mengatur ekspresi enzim sitoprotektif di unit neurovaskuler seperti astrosit dan sel endotel, sehingga mendukung fungsi neuron dan kehidupan sel melalui interaksi antar sel.

Studi eksperimental menduga palsitisitas metabolisme astrosit lebih tinggi dibandingkan dengan neuron, seperti dalam merespon inhibisi respirasi mitokondria oleh NO. Astrosit akan merespon dengan cara meningkatkan metabolisme glukosa melalui aktifitas glikolitik sehingga penurunan kadar ATP sangat terbatas sehingga bisa mencegah apoptosis. Pada neuron keadaan ini tidak terlihat.

Peran astrosit sebagai neuroprotektor

Astrodit terlibat dalam banyak proses di sistem saraf seperti mengatur tonus pembuluh darah, mengembalikan kadar glutamat ke nilai normal di celah sinap sehingga aktivitas neuron tidak berlebihan, menstimuli sinaptogenesis, melepaskan faktor neurotropik, mensekresikan antioksidan, melepaskan anti dan proinflamasi. Astrodit juga berperan dalam mengatur aliran darah selama aktifitas neuron melalui pelepasan zat vasoaktif seperti NO, produk yang berasal dari aktivitas epoksigenase, ATP, siklooksigenase, aktifitas *phosphatidylinositol 3-kinase* (P3IK) dan propogasi gelombang calsiun dari neuron ke astrosit dan endotel sel pembuluh darah, juga mengatur regulasi ion K dari aktifitas sinap. Neuron melepaskan ion K setelah teraktivasi dan peningkatan ion K mengakibatkan hipereksitabilitas neuron. Astrodit bisa meningkatkan aktifitas *transporter potassium* (K) pada saat iskemik, sehingga konsentrasi ion K tidak berlebihan. Bersamaan dengan regulasi ion dan metabolisme oleh astrosit, sel astrosit juga melepaskan faktor neurotropik yang memfasilitasi kehidupan neuron dan angiogenesis. Faktor neurotropik ini mempunyai efek ke neuron dan sel endotel, mikroglia, leukosit, dan sel punca neuron.

Peran astrosit dalam angiogenesis

Astrodit mempunyai interaksi yang erat dengan neuron dan sel endotel yang bergabung dengan pembuluh darah. Interaksi ini berperan dalam beberapa membran protein seperti ion, kanal air, reseptor, faktor pertumbuhan dan sitokin. Astrodit dan sel endotel melepaskan neurotrophin, faktor pertumbuhan vaskuler, glukosa, asam amino untuk menjaga stabilitas sawar darah otak.

Pada iskemik serebri terjadi gangguan integritas sawar darah otak, defisit glukosa dan hipoksia yang memicu stres oksidatif pada astrosit dan sel endotel. Sel yang stres akan mengaktifkan kaskade apoptosis, dan interaksi antara astrosit, perisit, dan endotel terputus.

Astrosit yang reaktif melepaskan tissue plasminogen activator yang diperlukan untuk perbaikan neuron yaitu untuk remodeling dendritnya.

Dalam merespon sitotoksik astrosit mempunyai mekanisme berbeda seperti jika perlu menginduksi angiogenesis untuk menstabilkan sirkulasi darah setelah iskemik serebri. Mekanisme dengan cara mensekresikan beberapa agen kimia seperti *glial-driven factor* seperti TGF- β , GDNF, (bFGF), angiotensin-1 (Ang 1). Faktor pertumbuhan ini menstimuli pertumbuhan pembuluh darah baru dan proliferasi *endothelial progenitor cell* (EPCs). Astrosit yang reaktif juga bias melepaskan HMGB1, VEGF, angiotensin 1 (Ang 1) dan angiotensin 2 (Ang 2), yang akan menstimuli EPC memediasi remodeling neurovaskuler selama pemulihan stroke.

Reaktivasi astrosit dalam regenerasi

Reaktivasi astrosit adalah perubahan bentuk astrosit sebagai respon terhadap trauma atau penyakit. Prosesnya sangat kompleks dan terjadi segera setelah trauma/sakit dari perubahan yang minimal, proliferasi sampai pembentukan jaringan parut (*scar*). Perubahan yang minimal bisa segera pulih seiring berjalannya waktu, sedangkan perubahan yang lebih berat seperti terbentuknya jaringan parut akan permanen. Reaktivasi astrosit saat ini banyak diteliti. Efek yang menguntungkan bisa menstimuli perbaikan, dan efek yang merugikan bisa memperberat kerusakan. Proliferasi astrosit disamping mengakibatkan merugikan juga mempunyai efek menguntungkan seperti, pada astrosit yang baru berproliferasi di SVZ akan mengekspresikan konsentrasi *thrombospondin* (THBS) 4 yang sangat tinggi dan mengeluarkan matriks glikoprotein. Astrosit ini akan bermigrasi ke daerah peri-infark dikorteks, dan bila infark terbentuk saat otak belum matur, astrosit akan memelihara integritas pembuluh darah kecil. Keadaan ini sangat tergantung dari THBS 4, sehingga diduga astrosit yang mengalami proliferasi

mempunyai efek proteksi disamping pembentukan jaringan parut.

Astrofit yang reaktif mengekspresikan GFAP. Peningkatan ekspresi GFAP berhubungan dengan hiperkatifitas dan perubahan morfologi. *Connexin-43* (CX43) protein *gap-junction* juga merupakan penanda hiperaktifitas astrosit. Protein lain yang terlibat dalam aktifitas astrosit adalah *cyclin-dependent kinase 5* (CDK5), yang di ekspresikan sangat tinggi pasca mitosis neuron. Protein ini terlibat dalam neurogenesis, sinaptogenesis, transmisi sinap, oragnisasi dan stabilisasi sitoskeleton akson yang memungkinkan terjadi apoptosis fisiologis. CDK5 tidak hanya dijumpai di astrosit, tetapi juga ditemukan di neuron, sel endotel dan sel darah. Gangguan regulasi CDK5 saat peroses eksitotoksik dapat mengakibatkan perubahan tidak hanya pada neuron, tetapi juga pada unit neurovaskuler. Perubahan ini diatur oleh astrosit, yang bila meningkat akan terjadi peningkatan reaktivitas astrosit serta perubahan tiap-tiap komponen dan integritas unit neurovaskuler sehingga mengakibatkan disfungsi otak, dan bila sebaliknya, tidak akan terjadi disfungsi otak.

Efek neuroprotektif dan astrosit sebagai target neuroprotektor

Astrofit bisa berperan sebagai protektif ketika parenkim otak kehilangan integritasnya, dengan cara mengontrol reaktifitasnya, sehingga memungkinkan astrosit memelihara fungsi homeostasis neuron. Astrofit terlibat dalam beberapa proses di sistem saraf seperti mengatur tonus pembuluh darah, mengembalikan kelebihan glutamate di celah sinap sehingga membatasi aktivitas neuron, menstimuli sinaptogenesis, melepaskan faktor pertumbuhan, antioksidan, anti dan proinflamasi. Astrofit juga mengatur aliran darah selama aktivias neuron dengan cara melepaskan substansi vasoaktif seperti NO. Substansi yang dilepaskan oleh aktifitas epoksigenase seperti ATP, siklooksigenase, dan aktivasi *phosptidylinositol 3-kinase* (PI3K) dan gelombang kalsium dari

neuron ke astrosit dan endotel pembuluh darah dan mengatur homeostasis ion K^+ . Astrosit juga melepaskan faktor neurotropik yang memfasilitasi kehidupan neuron dan angiogenesis. Faktor neurotropik ini mempunyai efek bervariasi terhadap neuron, sel endotel, leukosit, dan sel punca.

Kematian sel neuron akibat eksitotoksik terjadi karena konsentrasi yang tinggi dari glutamate di ekstra seuler, mengakibatkan ion calsiun masuk ke dalam sel sangat berlebihan, sehingga mengakibatkan kematian sel. Saat iskemik serebri GLT-1, yang berperan dalam membuffer glutamate ekspresinya menurun, sehingga infark yang terjadi akan lebih luas.

Studi pada binatang, membuktikan astrosit mencegah meluasnya infark dengan melepaskan GLT-1. Tamoxifen salah satu *estrogen receptor modulator* bisa meningkatkan GLT-1, yang biasa digunakan pada kanker payudara. Pada oklusi serebri media secara sesaat, pemberian tamoxifen 3 jam setelah oklusi arteri serebri media, akan memperkecil ukuran infark sebesar 90% dan menurunkan defisit neurobehavior. Obat lain yang juga bisa meningkatkan ekspersi GLT 1 adalah riluzole yang digunakan pada trauma medulla spialis. Studi preliminasi menduga riluzole mungkin bisa digunakan pada stroke.

Suatu studi menyebutkan dengan menghambat proliferasi astrosit berhubungan dengan perbaikan. Setelah serangan iskemik protein ekstraseluler matirks yaitu *perlecan* memecah diri menjadi domain V. Penelitian pada binatang dengan oklusi arteri serebri media dengan pemberian domain V mengurangi ukuran infark dan memperbaiki fungsi behavior dan terjadi angiogenesis. Efek ini dimediasi oleh astrosit yang berikatan dengan domain V, sehingga proliferasi astrosit berkurang, perubahan morfologi astrosit, peningkatan migrasi astrosit dan melepaskan faktor pertumbuhan.

Astrosit merespon dan melepaskan molekul imun seperti sitokin dan kemokin, baik pro dan antiinflamasi. Pada percobaan

binatang dengan oklusi arteri serebri media terjadi pelepasan mediator inflamasi. *Astrocyte dopamin receptor* berperan dalam mengontrol neuroinflamasi. Astrosit mrngaktifkan *astrocyte dopamine D 2 receptor* (DRD2), yang akan menekan reaksi inflamasi didaerah lesi dengan menginduksi terbentuknya molekul αB *crystalline*. Hal ini dibuktikan pada astrosit yang kekurangan DRD2 terjadi peningkatan produksi sitokin disertai kerusakan sel neuron. Terapi dengan dopamin pada manusia hasilnya bervariasi. Pada tikus dopamine yang diberikan 2 hari setelah oklusi serebri media memperlihatkan perbaikan fungsi motorik disertai luas infark yang lebih kecil, yang diduga karena terjadi peningkatan ekspresi faktor neurotropik oleh sel glia dari astrosit yang terletak ditepi infark. Dari hasil ini diduga dengan menargetkan reseptor dopamin pada astrosit, merupakan suatu opsi dalam penanganan stroke, yaitu akan menurunkan neuroinflamasi dan peningkatan produksi faktor neurotropik.

Pada stroke terjadi kerusakan sawar darah otak dan berlangsung sampai 2 minggu setelah stroke. Astrosit mensekresikan *sonic hedgehog* (Shh) yang membantu pembentukan dan integritas sawar darah otak saat umur perkembangan sampai dewasa. Pada sel kultur astrosit akibat OGD, Shh yang disekresikan oleh astrosit memediasi terjadinya angiogenesis. Shh menginduksi peningkatan sekresi angiopentin 1, yang juga menginduksi *junction protein* di sel endotel, yang akan bisa memperbaiki permeabilitas sawar darah otak yang rusak. Angiopentin 1 diperlukan untuk maturitas pembuluh darah.

Astrosit juga berperan dalam pembentukan sinap baru yang mungkin diperlukan untuk pemulihan stroke. Thbs-4 yang disekresikan oleh astrosit berperan dalam stabilitas perbaikan neuron setelah stroke. Astrosit mensekresikan Thbs 1 dan 2 menstimuli sinaptogenesis, dan pada percobaan binatang dengan oklusi serebri media permanen sekeresinya meningkat.

Beberapa faktor neurotropik disekresikan oleh astrosit

seperti BDNF yang sudah nampak dalam 1 hari setelah stroke, dan kadarnya meningkat dalam 8 hari setelah stroke. Astrosit juga melepaskan GDNF yang memperlihatkan efek protektif pada jaringan kultur yang berhubungan dengan aktivasi astrosit pada reseptor adrenergic $\alpha 2A$, yang juga berperan dalam pemulihan setelah stroke. Pada oklusi arteri sereberi media yang sementara dan berlangsung lebih dari 2 minggu astrosit mensekresikan *ciliary neurothrophic factor* (CNTF) yang hanya disekresikan oleh astrosit. Dalam keadaan normal CNTF ditekan oleh ikatan astrosit dan neuron. Pada stroke ikatan astrosit dan neuron lepas, sehingga terjadi peningkatan ekspresi CNTF. Kehilangan ikatan antara astrosit dan neuron akan meningkatkan ekspresi CNTF yang selanjutnya menstimuli neurogenesis. Bila ada neuron yang baru kontak atau neuron yang dalam proses bertahan hidup bergerak ke daerah peri-infark maka CNTF akan ditekan lagi. Akibat regulasi ini CNTF kemungkinan berperan dalam pertumbuhan aksonal pada stroke. Saat ini implant CNTF sedang dicoba pada neuro optika skemik, sehingga CNTF merupakan target untuk terapi stroke.

Peran astrosit dalam metabolisme

Otak adalah organ dengan konsumsi energi sangat tinggi, efisien dalam menggunakan substrat energi seperti glukosa, laktat, piruvat, glutamat, dan glutamin. Astrosit dan neuron mempunyai perbedaan profil metabolisme, tetapi saling melengkapi. Astrosit mempunyai laju glikolitik sangat tinggi, yaitu enzim *6-phosphofructose-2-kinase/fructose-2,6 biphosphate-3* (Pfkfb3) yang berhubungan dengan aktivasi jalur glikolitik dengan melibatkan laktat sehingga hasilnya terjadi oksidasi glukosa. Enzim ini sangat tinggi di astrosit, tetapi tidak ada di neuron. Karakteristik astrosit yang lain adalah ekspresi yang rendah *aspartate/glutamate carrier* (AGC). Karakteristik lain astrosit adalah dalam metabolisme glikogen. Glikogen merupakan energi cadangan yang terbesar di otak yang bisa dimetabolisme dengan cepat dalam kondisi anaerobik. Glikogen dijumpai sangat

banyak terutama pada otak matur. Karakteristik yang khas ini merupakan interaksi antara astrosit dan neuron, yang mana astrosit merupakan cadangan glikogen untuk fungsi neuron, dalam kondisi energi yang terbatas, seperti hipoglisemia. Aktifitas metabolisme hubungan neuron dan glia terlibat mengontrol neurotransmitter dan fungsi neuron. Peran astrosit dalam merubah gliokogen menjadi asam laktat adalah pembentukan memori, yang secara *in vivo* menjaga *long-term potential* (LTP) di sinap otak mamalia. Penemuan ini membuktikan astrosit berperan dalam memelihara metabolisme neuron, yang secara langsung berhubungan dengan fungsinya.

Karakteristik lain dari astrosit adalah dalam sintesis, pengambilan kembali, daur ulang neurotransmitter. Astrosit dengan cepat mengembalikan neurotransmitter yang dilepaskan di celah sinap, bila konsentrasinya berlebihan. Fungsi ini menjamin efektivitas fungsi sinap dan menjaga esktabilitas neuron. Glutamat adalah neurotransmitter eksititoksik, yang bila terjadi stimuli glutamat berlebihan maka astrosit akan mengambil kembali glutamat tersebut melalui GLT-1 dan GLAST melalui siklus glutamat-glutamin. Astrosit bertanggung jawab untuk mencukupi glutamat di otak, dan hanya astrosit yang mengekspresikan piruvat karboksilase, suatu enzim yang terlibat dalam jalur anaplerotik di otak yang memungkinkan astrosit secara efektif mensintesis glutamat dari glukosa.

Berdasarkan peran astrosit dalam stroke iskemik seperti diuraikan diatas, maka dimasa depan penelitian dibidang efek yang menguntungkan astrosit akan memberikan harapan untuk perbaikan terapi stroke, sehingga memberikan hasil terapi yang lebih baik, sehingga kecacatan yang tersisa sangat minimal, sehingga kualitas hidup penderita stroke menjad lebih baik.

Kematian sel pada stroke: nekrosis dan apoptosis



Nekrosis

Pada stroke mekanisme kematian sel bisa terjadi secara nekrosis maupun apoptosis. Di daerah intik iskemik ADO menurun sampai dibawah 10-15 ml/100 gram jaringan otak, sehingga terjadi penurunan secara bermakna pada pembentukan ATP. ATP berperan sangat penting untuk memelihara potensial membran neuron melalui pompa Na^+/K^+ -ATP ase. Di daerah inti iskemik terjadi kegagalan pompa ini dan pengaturan dari konsentrasi ion Na^+ dan K^+ di dalam dan luar sel terganggu, sehingga Na^+ lebih banyak didalam sel sehingga terjadi edema sel. Jika keadaan ini berlanjut membran sel akan mengalami ruptur dan melepaskan semua isi sel keruangan ekstra seluler dan akhirnya nukleus mengalami degradasi. Degradasi nukleus dan pelepasan komponen sel ke ruang ekstra seluler mengakibatkan reaksi inflamasi disekitar sel yang mati. ROS yang berlebihan, peningkatan Ca^{2+} mengakibatkan edema di mitokondria yang akan mengakibatkan kematian sel neuron yaitu nekrosis. Nekrosis ditandai dengan perubahan morfologi sel yaitu vakuolisasi sitoplasma, putusnya integritas membran sel dan hilangnya isi sel dan lepasnya molekul proinflamasi disekitar sel yang mati. Nekrosis terjadi di intik iskemik, dan sel neuron sudah mengalami kematian,

sehingga tidak bisa dilakukan intervensi. Daerah sekitar inti infark adalah daerah iskemik penumbra dan kematian sel terjadi lebih lambat melalui mekanisme apoptosis, yang menjadi target untuk terapi pada stroke.

Apoptosis

Apoptosis atau program kematian sel berperan penting dalam mengeliminasi sel yang tidak diinginkan, sel yang rusak, infeksi pada organisme multiseluler, dan juga pada peroses biologis seperti pembelahan sel, dan proliferasi. Gangguan dalam peroses ini bisa mengakibatkan kondisi patologis seperti kanker, penyakit autoimun dan neurodegeneratif.

Pada stroke mekanisme kematian sel bisa terjadi secara nekrotik maupun apoptois. Proses nekrotik terjadi di inti infark, karena pengurangan aliran darah otak secara mendadak, yang terjadi dalam beberapa menit. Daerah sekitar nekrotik dikelilingi oleh daerah yang mengalami penurunan aliran darah, tetapi selnya masih hidup tetapi fungsinya terganggu. Daerah ini disebut iskemik penumbra, yang masih mungkin untuk diselamatkan, bila segera diberikan terapi dan bila terapi terlambat atau tidak memadai maka akan terjadi kematian sel lewat mekanisme apoptosis.

ROS memegang peranan dalam apoptosis ketika sel mengalami stres oksidatif. Signal apoptosis tidak secara langsung menyebabkan apoptosis, tetapi melalui regulasi beberapa protein yang mengawali apoptosis. Signal kematian sel menyebabkan apoptosis melalui jalur ekstrinsik maupun intrinsik

Jalur ekstrinsik

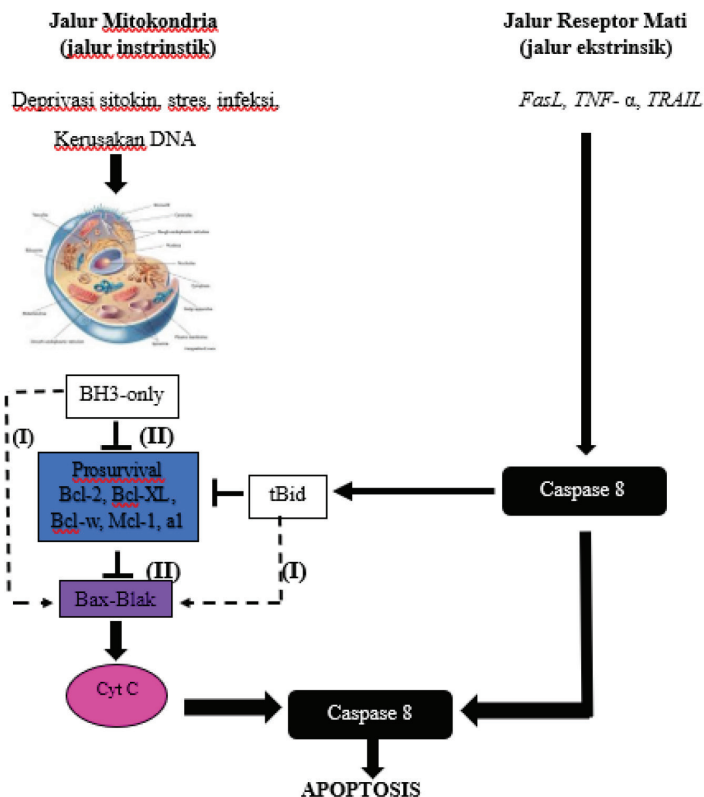
Apoptosis jalur ekstrinsik di mediasi oleh *death receptor* yang akan berikatan dengan reseptor ligand dan akan mengaktifkan kaspase. *Death receptor* terdiri dari *Fas receptor* (CD 95 atau APO-1), TNFR-

1 dan TRAIL-R1 juga disebut DR4 dan *TRAIL receptor-2* (TRAIL-R2) juga disebut DR5. *Death receptor* kemudian berikatan dengan ligands seperti FAS ligand, TNF α dan TRAIL. Ketiga reseptor ini berperan dalam menginduksi apoptosis dengan memberikan signal kematian sel dengan pembentukan *death inducing signal complex* (DISC). DISC merupakan kompleks reseptor dan ligand yang akan menginduksi pro-kaspase 8 dan pro-kaspase 10 dan regulator lainnya sebagai ko- faktor, dan kemudian akan mengaktifkan kaspase 3 dan 7 sebagai kaspase eksekutor.

Jalur intrinsik

Apoptosis jalur intrinsik melibatkan mitokondria setelah menerima stimulus dari anggota protein *BH3 only* seperti Bid, Bad dan Bim. Keadaan ini akan menyebabkan oligomerisasi anggota protein pro-apoptosis seperti Bax dan Bak yang terdapat dipermukaan membran mitokondria dan akan mengakibatkan permeabilitas *outer membran mitochondria* (OMM), yang akhirnya melepaskan mediator apoptosis seperti HtrA2/Omi (*mammalian serine protease*) *second nitochondrial activator of kaspase/direct IAP binding protein with low pl* (Smac/diablo) sitokrom c, *endonuclease G* (endo G) dan *apoptosis induction factor* (AIF). Sitokrom c dan APAF dan ATP/dioksi-ATP membentuk *apoptosome* yang akan mengaktifkan prokaspase 9 menjadi kaspase 9, yang selanjutnya mengaktifkan kaspase 3 sebagai eksekutor apoptosis. Peran Endo G dan AIF adalah tidak tergantung pada kaspase, tetapi langsung menyebabkan kondensi dan fragmentasi sel.

Inhibitor of apoptosis protein (IAP) berperan menghambat mediator apoptosis seperti HtrA2/Omi/ Smac/diablo yang akan berikatan dengan kaspase 3/7/9. Anggota BH3 only yaitu Bid diaktifkan oleh kaspase 8 yang akan membentuk *truncal Bid* (tBid), yang selanjutnya mengaktifkan Bax dan Bak. Hal ini memperlihatkan adanya hubungan antara mekanisme ekstrinsik dan intrinsik dalam proses apoptosis seperti disajikan pada gambar 4.



Gambar 4. Proses apoptosis

Peran mitokondria dalam apoptosis intrinsik

Mitokondria berperan sangat penting dalam pengaturan signal kematian akibat yang berasal dari dalam sel seperti stress oksidatif dan kerusakan DNA. Mitokondria merupakan pembentuk ROS yang utama saat stres oksidatif. Stres oksidatif akan mengakibatkan perubahan kesimbangan protein anti dan pro apoptosis yang dimiliki oleh mitokondria, dan konsentrasi protein pro apoptosis lebih tinggi dari protein anti apoptosis, sehingga protein pro apoptosis akan bergeser ke membran luar mitokondria dan membentuk pori, sehingga protein pro apoptosis seperti sitokrom c, *second messenger activator of caspase/Direct IAP proptein with low pI* (Smac/Diablo)

Htr2A/Omi, *apoptosis inducing factor* (AIF) dan endonuclease G akan keluar dari mitokondria dan mengaktifkan kaskade apoptosis. Mitokondria juga berperan dalam mengaktifkan kaskade apoptosis dari jalur ekstrinsik, yaitu kaspase 8 akan mengaktifkan BID menjadi tBID, sehingga mitokondria terpacu untuk melepaskan protein proapoptosis.

Protein apoptosis

Bcl-2 family

Bcl-2 family adalah protein yang merupakan regulator kunci dari apoptosis, yang meliputi pro dan anti-apoptosis. Semua anggota Bcl-2 mempunyai satu atau lebih *homology domain* dengan label Bcl-2 *homology* (BH 1,-2,-3 dan -4). Anti apoptosis Bcl-2 adalah Bcl-2, Bcl-*extra long* (Bcl-xl), A1, Bcl-w dan Bcl-2 *homology of ovary* (Boo) berisi ke empat *BH-domain* (BH1-4). Bcl-2 dan Bcl-_{xl} mempunyai domain di terminal karboksil hidrofobik transmembran sehingga membantu berada di lapisan luar membran mitokondria (OMM), dengan pengecualian pada Bcl-2 juga berada di nukleus dan retikulum endoplasmik dan akan bergeser ke OMM saat terjadi signal apoptosis. *Myeloid Cell leukemia factor-1* (Mcl-1) adalah anti-apoptosis yang mempunyai 3 domain BH (BH 1-3).

Bcl-2 pro-apoptosis terdiri atas dua sub grup tergantung pada domain BH seperti Bax, Bak dan Bax, yang memiliki BH 1-3, yang hanya memiliki domain BH-3 adalah Bid, Bim dan Bad, dengan pengecualian Bcl-_{xs} mempunyai BH-3 dan BH-4. Ada 8 anggota BH3 only protein yaitu hara kiri (HrK), *BH3 interacting domain death agonist* (Bid), *Bcl-2 interacting mediator cell* (Bim), *Bcl-2 modifying factor* (Bmf), p53, *promoter upregulated modulator of apoptosis* (Puma), Noxa (*named for "damage"*), *Bcl-2 antagonist cell death* (Bad) dan *Bcl-2 interacting killer* (Bik). Bid, Bad, dan Bim berlokasi di sitosol dekat mitokondria. *BH3 domain only* juga disebut *minimal death domain* yang dapat menetralkan atau menekan efek protein

anti apoptosis sehingga memungkinkan protein apoptosis seperti Bax/Bak merangsang terjadinya apoptosis.

Peran famil Bcl-2 dalam Apoptosis

Famili Bcl-2 anti Apoptosis

Telah terbukti setiap sel yang mempunyai nukleus paling tidak mempunyai satu anggota *Bcl-2 homolog* yang mengatur homeostasis pada sel mamalia dan jaringan. Ekspresi dari Bcl-2 di organ hemopoitik mengakibatkan ekspresi sel T dan B dan sel mieloid, yang memberi kesempatan sel progenitor untuk menghindari efek sitotoksik. Keadaan ini terlihat jika ekspresi gen *Bcl-2 pro-apoptosis* pada sel yang spesifik meningkat, disebabkan oleh rendahnya konsentrasi *BCL-2 homolog anti apoptosis* sehingga tidak bisa mengimbangi *Bcl-2 family proapoptosis*. Bcl-2 adalah membran protein integral, sedangkan Bcl-xl dan Bcl-w hanya berikatan secara kuat dengan membran setelah ada signal apoptosis yang merangsang perubahan struktur untuk melindungi sel. Famili anti-apoptosis Bcl-2 seperti Bcl-2 sendiri mencegah/menurunkan apoptosis dengan mencegah peningkatan permeabilitas OMM, yaitu dengan menetralkan aktifitas famili Bcl-2 pro-apoptosis (BH3 only protein dan yang lainnya). Jika Bcl-2 dan Bcl-xl tidak bisa mengaktifkan efek anti apoptosis, maka Bax mengalami oligomerisasi dan mengambil tempat tersebut sehingga terjadi proses.

Famili Bcl-2 pro-apoptotik

Protein anti-apoptotik seperti Bcl-2 berinteraksi dengan Bak dan Bax akan menghambat oligomerisasinya atau berikatan dengan *BH3 only* untuk memblokir apoptosis. Perubahan Bak menjadi bentuk ganda Bak atau Bax mengakibatkan fragmentasi mitokondria. Bak berhubungan Bax yang menyebabkan perubahan permeabilitas

membran luar mitokondria mengakibatkan kaskade apoptosis. Bak menyebabkan fragmentasi awal mitokondria, sedangkan Bax berperan dalam degenarasi membran luar mitokondria.

Dalam keadaan sehat Bak ada dalam bentuk tidak aktif di OMM, sedangkan Bax dalam keadaan dorman di sitosol. Bila terdapat signal apoptosis maka akan merangsang *BH3 only-protein-dependent translocation* dari Bax, diikuti oleh insersi ke OMM dan terbentuknya Bak atau Bax homo-oligomer. Setelah terbentuk Bak/Bax homo-oligomer maka akan terbentuk lubang di OMM, yang menyebabkan terjadi permeabilitas OMM dan pelepasan isi dari *intermembran space* (IMS) seperti Smac diablo, endo G dan sitokrome c ke dalam sitosol. Pelepasan protein ini akan mengaktifkan kaskade kaspase.

Kaspase

Kaspase adalah *Cystein Aspartic protease*s, yang berkontribusi terhadap terjadinya proses inflamasi, apoptosis dan proses vaskuler yang dominan pada stroke. Kaspase dibedakan menurut struktur, mekanisme aktifasinya, fungsi seluler dan jalur yang mengaktifkan apoptosis. Menurut strukturnya kaspase dibagi menjadi rantai panjang (*casps-1, casps-2, casps-8, casps-9 dan casps-11*) dan pendek (*casps-3, casps-6, casps-7*). Ukuran dan komposisinya ditentukan oleh perlu tidaknya pemecahan untuk aktifitasnya.

Mekanisme aksi kaspase

Kaspase dengan pro-domain yang panjang terdapat dalam bentuk zimogen monomer. Aktifasi terjadi saat dimerisasi, karena perubahan struktur di inter subunit yang lebih panjang memungkinkan bersentuhan dengan sisi katalitik yang aktif. Pemecahan ikatan proteolitik di inter subunit diperlukan secara absolut untuk terjadinya aktivasi.

Fungsi seluler kaspase

Secara umum fungsi kaspase adalah: inflamasi, inisiator dan eksekutor apoptosis. Kaspase -1 berperan dalam inflamasi pada stoke dengan mengaktifkan sitokin proinflamsi menjadi IL-1 β .

Struktur kaspase menentukan fungsinya sebagai inisiator atau eksekutor. Kaspase dengan domain pendek berfungsi sebagai eksekutor dan domain panjang sebagai inisiator, kecuali kaspase-2 bisa berperan sebagai eksekutor atau inisiator. Kaspase-2 sedikit berbeda meskipun mempunyai domain panjang tetapi bentuknya adalah dimer zimogen.

Jalur aktivasi kaspase

Kaspase berperan dalam apoptosis melalui kaskade *signal* kematian yaitu secara ekstrinsik dan intrinsik. Apoptosis jalur ekstrinsik tergantung pada terbentuknya *death-inducing signaling complex* (DISC), yang akan berikatan dengan ligand seperti *Fas-associated protein death dominant* (FADD) yang akan mengaktifkan kaspase 8, yang kemudian akan mengaktifkan kaspase 3 dan 7 yang bertindak sebagai eksekutor terjadinya apoptosis. Lewat jalur ekstrinsik kaspase 8 akan memecah Bid, menjadi tBid yang akan menyebabkan mitokondria melepaskan sitokrom c. Sitokrome c bersama dengan *apoptosis protein activator-1* (Apaf-1) dan prokaspase 9 membentuk apoptosome. Apoptosome akan mengaktifkan pro-kaspase 3, mejandi kaspase-3, yang akan bertindak sebagai eksekutor terjadinya apoptosis.

Apoptosis jalur intrinsik di dirangsang oleh stres oksidatif, sehingga terjadi permeabilisasi membran luar mitokondria yang dipicu oleh famili Bcl-2 pro-apoptosis yaitu Bax dan Bak. Dalam keadaan sehat Bak berada di membran luar mitokondria sedangkan Bax berada di sitosol. Bila terjadi *signal* kematian maka Bax akan bergerak ke membran luar mitokondria dan akan terjadi perubahan bentuk Bax dan Bak menjadi homo-oligomer, yang

akan merubah permeabilitas membran luar mitokondria, sehingga terjadi pelepasan sitokrome c, yang selanjutnya akan membentuk apoptosome dengan APAF dan prokaspase 9. Prokaspase 9 berubah menjadi bentuk kaspase 9 yang akan menstimulasi kaspase 3 sebagai eksekutor apoptosis. Mitokondria juga melepaskan protein inhibisi yang menghambat kaspase-9, kaspase-7, kaspase 3 yaitu *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs), terutama XIAPs. Protein lain yang dilepaskan oleh mitokondria yaitu Smac dan Diablo yang akan memblok fungsi penghambatan dari IAPs.

Mekanisme eksekusi oleh kaspase

Kaspase eksekusioner terdiri dari kaspase 3, 6, dan 7. Aktivasi dilakukan oleh kaspase inisiator. Kaspase 3 merupakan kaspase eksekusioner yang paling penting dan dapat diaktifkan oleh kaspase 8, 9, 10. Peran kaspase 6 belum diketahui dengan pasti. Kaspase 3 berperan dalam penghancuran struktur DNA. Bila kaspase 3 teraktivasi, maka akan bisa menghancurkan DNA dan sitoskeleton, mendegradasi inhibitor kaspase yaitu XIAP. Kaspase 3 mengaktifkan enzim *caspase activated DNA-ase* (CAD). Enzim CAD sangat berperan dalam mendegradasi DNA. Enzim CAD dalam keadaan normal berikatan dengan inhibitor CAD, sehingga berada dalam keadaan tidak aktif. Kaspase 3 mengaktifkan CAD dengan cara memecah ikatan dengan ICAD, sehingga CAD terlepas dari ikatan dengan ICAD dan menjadi aktif sehingga bisa memecah DNA. Kaspase 3 juga berperan dalam pemebelahan Bid menjadi tBid sehingga terjadi peningkatan permeabilitas membran mitokondria yang akan memicu kaskade apoptosis. Kaspase 3 juga dapat menghambat aktivasi enzim yang berperan dalam reparasi DNA yaitu poly ADP polymerase (PARP), sehingga proses reparasi DNA tidak terjadi, sehingga sel mengalami kematian (apoptosis).

Daftar Pustaka



- Ahmad M, Graham SH. 2010. Inflammation after stroke: mechanisms and therapeutic approach. *Transl. Stroke Res.* 1: 74-84.
- Akpan N, Troy, CM. 2013. Kaspase inhibitor: Prospective Therapies for stroke. *The Neuroscientist*; 19(2): 129-136.
- Astrup J, Siesjo BK, Symon L. 1981. Threshold in cerebral ischemia: the ischemic penumbra. *Stroke*; 12: 723-725.
- Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. 1997. Cortical evoked potential and extracellular K⁺, and H⁺ at critical level brain ischemia. *Stroke*; 8: 51-57.
- Azad N, Iyer AKV. 2014. Reactive Oxygen Species and Apoptosis. In: Laher I ed. *System Biology of Free Radical and Antioxidants*. Berlin; Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 113A-127
- Barreto G, White RE, Ouyang Y, Xu L, Giffard RG. 2011. Astrocyte: Targets for neuroprotection in stroke. *Central Nervous Agents in Medicinal Chemistry*; 11: 164-173.
- Becerra-Calixto A and Cardona-Gomez GP. 2017. The role of astrocyte in neuroprotection after brain stroke: potential in cell therapy. *Molecular Neuroscience*; 10: 1-12. Doi. 10.3389/fnmol.2017.00088.
- BeLanger M, Allaman I, Magistretti PJ. 2011. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron cooperation. *Cell Metab*; 14: 724-738.
- Belyev L, Lu Y, Bazan NG. 2012. Brain Ischemia and reperfusion: Cellular and Molecular Mechanisms in Stroke Injury. *Basic Neurochemistry*. 8th. edition: 621-641.
- Benner EJ, Luciano D, Jo. R, Abdi K, Paez Gonzales P, Sheng H, Warner DS, Liu C, Eroglu C, Kuo CT. 2013. Protective astrocytosis from the

- SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature*; 497: 368-373.
- Broughton et al, 2009. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*; 40: e331-339.
- Broussalis E, Trinkka E, Killer M, Harrer A, McCoy M, Kraus J. 2012. Currents therapies in ischemic stroke. Part B. Future candidates in stroke therapy and experimental studies. *Drug Discovery Today*; 13: 671-684.
- Brown GC, and Vilalta A. 2015. How microglia kill neurons. *Brain Research*; 1628: 288-297.
- Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Ore MV, Celador IL, Jossierand J, Degos V et al., 2013. Characterization of phenotype markers and neurotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun*; 32:70-85.
- Cipriani R, Domercq M, Matute C. 2014. Ischemia and Stroke. *Microglia in Health and Disease*, in Tremblay and Sierra eds. New York: Springer Science+Business Media. 413-435.
- Circu ML, Aw TY. 2012. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1823: 1767-1777.
- Circu M, Aw TY. 2010. Reactive Oxygen Species, Cellular redox System and Apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 48: 749-762
- Szepesi Z, Manouchehrian, Bachiller S, Deierborg T. 2018. Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain and disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. doi: 10.3389/fnrcel.2018.00323.
- Faiz M, Sachewsky N, Gascon S, Bang KWA, Morshead CM, Nagy A. 2015. Adult neural stem cells from the subventricular zone give rise to reactive astrocyte in the cortex after stroke. *Cell Stem*; 17: 624-634.
- Fernandes A, Miller-Fleming L, Pais TF. 2014. Microglia and inflammation: conspiracy, controversy or control. *Cell Mol Life Sci*; 71(20): 3969-3985.
- Gan Y, Liu Q, Wu W, Yin YJ, Bai XF, Shen R, Wang Y, Chen J, et al. 2014. Ischemic neurons recruit natural killer cells that accelerate brain infarction. *Proc Natl Acad Sci*; 111(7): 2704-2709.

- Gillies LA, Kuwana T. 2014. Apoptosis regulation at the mitochondria outer membrane. *Journal of Cellular Biochemistry*. 115: 632-640.
- Gleichman AJ, Carmichael ST. 2013. Astrocyte therapies for neuronal repair in stroke. *Neuroscience Letters*; 565: 47-52
- Gotz M, Sirko S, Beckers J, Imler M. 2015. Reactive astrocyte as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, in vitro potential, and genomi-wide expression analysis. *Glia*;63: 1452-1468.
- Graeber MB, Streit WJ. 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*; 119(1): 801-806.
- Hardingham GE, Bading H. 2010. Synaptis versus extra-synaps nMDA receptor signaling: Implication for neurodegenerative disorder. *Nature Review Sciences*; 11: 682-696
- Hayakawa K, Pham LD, Katusic ZS, Arai K, Lo EH. 2012. Astrocyte high mobility group box 1 promotes endothelial progenitor cell-mediated neurovascular remodelling during recovery stroke. *Proc natl Acad Sci USA*; 109: 7505-7510.
- Iadecola C, Anrather J. 2011. The immunology of stroke; from mechanisms to translation. *Nat Med*. 17: 796-808.
- Itoh K, Maki T, Lok J, Arai K. 2015. Mechanisms of cell-cell interaction in oligodendrogenesis and remyelination after stroke. *J Stroke Sci*;12: 1-8
- Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. 2013. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J of Cardiovasc Trans Res*; 6: 834-851.
- Jin R, Yang G, Li G. 2010. Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis*; 38(3): 376-385.
- Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol*; 2: 702-714.
- Kostandy BB. 2012. The role of glutamate in neuron ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci*;33-223-237.

- Kumar G, Goyal M, Sahota P, Jain R. 2010. Penumbra the basis of neuroimaging in acute stroke treatment: current evidence. *J Neurol Sci.* 288: 13-24.
- Li M, Sun L, Li Y, Xie C, Wan D Luo Y. 2014. Oxygen glucose deprivation/reperfusion astrocytes promotes primary neural stem/progenitor cell-proliferation by releasing high- mobility group complex-1. *Neurochem Res*; 39: 1440-1450.
- Liebl J, First R, Vollmar AM, Zahler S. 2011. Twice switch at birth: cell cycle-independent role of the neuron specific cycle-dependent kinase 5 (Cdk5) in non neural cell. *Cell Signal*; 23: 1698-1707.
- Liu W, Tang Y, Feng J. 2011. Cross talk between activation microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci*; 89: 141-146.
- Lindsberg PJ, Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML. 2010. Mast cell as early respon in the regulation of acute blood-brain barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*; 30: 689-702.
- Manzanero S, Santro T, Arumugan TV. 2013. Neuronal oxidative stress in acute ischemia stroke: Source and contribution to cell injury. *Neurochemistry International*; 62: 712-718.
- Mergenthaler P, Dirnagl U, Kunz A. 2013. Ischemic Stroke: *Basic Pathophysiology and Clinical Implication*. in Pfaff editor. Neuroscience in the 21st Century. Springer Sciences+Business Media. Berlin. 2543-2563.
- Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. 2010. The Science of stroke: mechanisms in search and treatment. *Neuron*; 67: 181-198.
- Neher JJ, Emrich JV, Fricker M, Mander PK, Thery C, Brown GC. 2013. Phagocytosis execute delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*; 110: E4098- E4107
- Niizuma K, Endo H, Chan PH. 2009. Oxidative stress and mitochondria dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem*; 109(1):133-8.
- Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, Kim GS, Jung JE, Katsu M. 2010. Mitochondria and apoptotic neuronal death signal pathways in cerebral ischemia. *Biochemica et biophysica Acta*; 1802: 92-99.

- Ola MS, Nawaz Ahsan H. 2011. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*; 351: 41-58.
- Olah M, Biber K, Vinet J, Boddeke HW. 2011. Microglia phenotype diversity. *CNS Neurol Disorder Drug Targets*; 10: 108-118.
- Pandya RS, Mao L, Zhou H, Zhou S, Zeng J, Popp J, Wang X. 2011. Central nervous system agents for ischemic stroke: Neuroprotection mechanisms. *Central Nervous System Agents In Medical Chemistry*; 11: 81-97.
- Parrish AB, Freel CP, Kornbluth S. 2013. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology*; 5(6): 1-7.
- Patel AR, Ritzel R, McCullough LD, Lu F. 2013. Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*; 5(2): 73-90.
- Pop C, Salvesen GS. 2009. Human caspases: activation, specificity and regulation. *J Biol Chem*; 284: 1777-1781.
- Racay P, Tatarkova Z, Chomova M, Hatok J, Kaplan P, Dobrota D. 2009. Mitochondrial calcium transport and mitochondrial dysfunction after global cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurochem. Res*; 19: 1469-1478.
- Ramos-Cabrera P, Campos F, Sobrino T, Castillo J. 2011. Targeting the Ischemic Penumbra. *Stroke*; 42 (suppl 1): S7-S11.
- Robel S, Buckingham SC, Boni JL, Campbell SL, Danbolt NC, Riedemann T. 2015. Reactive astrogliosis causes development of spontaneous seizure. *J Neurosci*; 35: 3330-3345.
- Roussel BD, Kruppa AJ, Miranda E, Crowther DC, Lomas DA, Marciniak SJ. 2013. Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol*; 12: 105-118.
- Shamas-Dien A, Kale J, Leber B, Andrews DW. 2013. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harbor Perspective Biol*; 5: a008714
- Shao W, Zhang SZ, Tang M, Zhang XH, Zhou Z, Yin YQ, Zhou QB, Huang YY, Liu YJ, Wawrousek E, Chen T, Li SB, Xu M, Zhou JN, Hu G, Zhou JW. 2013. Suppression of neuroinflammation by astrocyte

- dopamine D2 receptor via alphaB-crystallin. *Nature*; 494: 90-94.
- Shen SW, Duan CL, Chen XH, Wang YQ, Sun X, Zhang QW. 2016. Neurogenic effect of VEGF is related to increase of astrocyte transdifferentiation into new mature neuron in rat brain after stroke. *Neuropharmacology*; 108: 451-461.
- Sim NR, and Muyderman H. 2010. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1802: 80-91.
- Sofroniew MV, Vinters H.V. 2010. Astrocyte biology and pathology. *Acta Neuropathol*; 119: 7-35.
- Sultan S, Li L, Moss J, Petrilli F, Case F, Gebara F. 2015. Synaptic integration of adult-born hippocampal neurons is locally controlled by activation astrocytes. *Neuron*; 88: 957-972.
- Surace MJ, Block ML. 2012. Targeting microglia-mediated neurotoxicity: the potential NOX inhibitors. *Cell Mol Life Sci*; 69: 2409-2427
- Sutherland BA, Minnerup J, Balami JS, Arba F, Buchan AM, Kleinschnitz C. 2012. Neuroprotectant for ischemic stroke: Translation from bench to the bedside. *International Journal of Stroke*; 12; 1-8.
- Szydlowska K, Tymianski M. 2010. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*; 47: 122-129.
- Tu W, Xu X, Peng L. 2010. DAPKI interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediated brain damage in stroke. *Cell*; 140: 222-234.
- Vigano E, and Mortellaro A. 2013. Caspase-11: The diving factor noncanonical inflammasomes. *Eur J Immunol*. 43: 2240-2245.
- Vila N, Castillo J, Davalos A, Estve A, Planas AM, Chamorro A. 2003. Levels of anti-inflammatory cytokine and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke*; 34(3): 671-675.
- Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck, R.M. 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta*; 1813: 521-531.
- Woodruff TM, Thundyil J, Tang SC, Sobey CG, Taylor SM, Arumugam TV. 2011. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener*; 6(11): 11-19.

- Wuestefeld R, Chen J, Meller K, Brand-Saberi B, Theiss C. 2012. Impact of vegf on astrocytes: analysis of gap junctional intercellular communication, proliferation, and mortality. *Glia*; 60: 936-947.
- Xia YP, He QW, Li YN, Xhen SC, Huang M, Wang Y, Gao Y, Huang Y, Wang MD, Mao L, Hu B. 2013. Recombinant human sonic hedgehog proteins regulated the expression of ZO-1 and occluding by activating angiopoietin-1 stroke damage. *Plos ONE*; 8: e68891
- Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA. 2010. Microglia activation after stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics*; 7: 378-391.
- Zhang HY, Wang ZG, Lu XH, Kong XX, Wu FZ, Lin L, Tan X, Ye LB, Xiao J. 2014. Endoplasmic reticulum stress: relevance and therapeutics in central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*; 51: 1343-1352.