

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Stroke merupakan kegawatdaruratan yang terjadi pada otak, dimana terjadi gangguan aliran darah karena sumbatan atau pecahnya pembuluh darah tertentu di otak, stroke dapat menyebabkan gangguan fungsi otak sebagian atau menyeluruh (Yayasan Stroke Indonesia, 2011). Sumbatan pada stroke dapat berupa trombus, embolus, atau tromboembolus yang dapat menyebabkan hipoksia sampai anoksia pada salah satu daerah percabangan pembuluh darah di otak (Bruno *et al.*, 2000). Pada seluruh kejadian stroke duapertiganya adalah stroke iskemik dan sepertiganya merupakan stroke hemoragik (Guyton & John, 2007).

Stroke menjadi penyebab utama kecacatan di seluruh dunia dan penyebab paling umum kedua dari demensia. Selain itu, stroke juga dilaporkan menjadi penyebab utama ketiga dari kematian (Deb *et al.*, 2010). Pada seluruh dunia, sekitar 15 juta orang mengalami stroke setiap tahun, dan sekitar 5 juta orang berakhir dengan kematian. Diperkirakan sekitar 25% dari orang yang berusia lebih dari 85 tahun akan terserang stroke (*American Heart Association*, 2010).

Di Indonesia, pada setiap 1000 orang, 8 orang diantaranya terkena stroke. Pada setiap 7 orang yang meninggal di Indonesia, 1 diantaranya meninggal karena stroke (Kementerian Kesehatan RI, 2011). Stroke menyumbang 11,8% dari total kematian di Indonesia dan merupakan penyebab utama kematian dan kecacatan, yang diprediksi beban penyakit maupun ekonomi akibat stroke akan semakin

meningkat pada tahun 2020 (Suryati, 2013). Besarnya angka kejadian, kematian dan kecacatan akibat stroke tersebut secara signifikan akan meningkatkan beban penyakit dan juga akan memperbesar biaya perawatan stroke yang dikeluarkan sehingga akan semakin meningkatkan beban keluarga maupun masyarakat secara keseluruhan (Aly *et al.*, 2009).

Stroke iskemik disebabkan adanya sumbatan (trombus atau emboli) pada pembuluh darah arteri yang menuju otak, mengakibatkan terhambatnya pasokan oksigen dan nutrisi ke otak sehingga mengakibatkan kematian neuron dan penurunan fungsi neurologis, beberapa menit setelah timbulnya iskemia, kerusakan jaringan terjadi di pusat cedera iskemik dimana aliran darah otak berkurang lebih dari 80%. Patofisiologi stroke iskemik sangat kompleks dan melibatkan berbagai proses, termasuk kegagalan pembentukan energi tanpa oksigen dan glukosa neuron tidak dapat membuat ATP yang menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan ion, eksitoksisitas, toksisitas dengan radikal bebas, sitotoksitas dengan sitokin, aktivitas komplemen, terjadi gangguan pada *blood brain barrier*, aktivasi sel glial dan infiltrasi leukosit. Mekanisme tersebut saling terkait dan selaras untuk mengakibatkan nekrosis di area *core*. Mekanisme secara seluler dari stroke iskemik adalah terjadinya kegagalan energi yang mengarah ke depolarisasi neuron. Aktivasi reseptor glutamat akan meningkatkan ion Ca^{2+} , Na^+ , dan K^+ di intraseluler kemudian dilepaskan ke dalam ruang ekstraseluler serta terjadi edema hasil dari pergeseran air ke ruang intraseluler. Peningkatan kadar intraseluler *messenger* Ca^{2+} mengakibatkan pelepasan enzim protease, lipase dan endonuklease, kerusakan pada mitokondria dan DNA serta kerusakan pada sel

membran yang dihubungkan dengan pembentukan radikal bebas serta produksi NO yang mengarah pada kematian sel dan hal ini meginduksi pembentukan mediator inflamasi (Woodruff *et al.*, 2011; *American Heart Association*, 2015). Inflamasi berperan penting dalam patogenesis stroke iskemik, yang melibatkan kaskade inflamasi yaitu sitokin (IL-1, IL-6, TNF- α dan TGF- β), molekul adhesi (selectin, integrin dan imunoglobulin) serta eikosanoid, yang diproduksi dalam beberapa jam setelah timbulnya iskemia dan berlangsung berhari-hari (Jin *et al.*, 2010). Inisiasi pada reaksi inflamasi berkontribusi terhadap kerusakan otak dan melibatkan interaksi antara sel endotel, astrosit, sel mikroglia dan leukosit (Vikman *et al.*, 2007; Pun *et al.*, 2009).

Morfologi nekrosis ditandai dengan *initial cellular* dan organel yang membengkak yang berikutnya terjadi gangguan pada struktur nukleus, organel dan membran plasma, serta adanya tekanan isi sel menyebabkan isi sel menuju ruang ekstraseluler. Wilayah yang berbatasan dengan *infarct core* dikenal sebagai *penumbra* iskemik, terdiri dari setengah total volume lesi pada tahap awal iskemia, dan merupakan wilayah untuk target pengobatan pasca stroke (Amantea *et al.*, 2008; Woodruff *et al.*, 2011).

Pada stroke iskemik mekanisme kematian sel (daerah *penumbra*) secara apoptosis dibagi menjadi dua jalur yaitu secara ekstrinsik dan instrinsik. Jalur ekstrinsik terkait dengan Fas ligand (FasL) yang disekresi oleh neuron, glia dan *inflammatory leukocytes* kemudian berikatan dengan resptor Fas. Pada keadaan stroke, respon *inflammatory* akan diinduksi, sel memiliki sistem imun bawaan atau adaptif yang diaktifkan termasuk mikroglia / makrofag, *polymorphonuclear cell*,

lymphocytes, *NK-cells* dan sel mast. Akumulasi dari sel tersebut disertai dengan perubahan ekspresi dari reseptor kematian meliputi TNF, FasL, RANKL, TRAIL dan TWEAK yang dimana berkontribusi terhadap kematian sel. Ikatan reseptor FasL dengan Fas akan mengaktifasi caspase 8 yang kemudian diikuti dengan pengaktifan caspase eksekutor yaitu caspase 3 serta memotong anggota famili Bcl-2, Bid. Kemudian Bid yang terpotong akan menginduksi inserasi Bax dalam membran mitokondria dan melepaskan sitokrom C. Pelepasan dari sitokrom C menginisiasi jalur apoptosis secara instrinsik. *Cytosol*, sitokrom C akan berkombinasi dengan Apaf-1, dATP dan procaspase, kombinasi ini disebut dengan apoptosome yang megaktifkan caspase 9, lalu caspase 9 akan meningkatkan caspase 3 yang berakibat pada kehancuran sel (Nguyen *et al.*, 2014; Hagberg *et al.*, 2016).

Anggota famili Bcl-2 yang telah diidentifikasi, dan dibagi ke dalam tiga grup berdasarkan strukturnya. Anggota grup pertama diwakili oleh Bcl-2 dan Bcl-xL yang berfungsi sebagai antiapoptosis. Anggota grup kedua diwakili oleh Bax dan Bak (*Bcl-2 associated killer*), sebagaimana anggota grup yang ketiga yaitu Bid dan Bad (*Bcl-2 associated death molecule*), merupakan molekul proapoptosis. Pada studi yang berkaitan dengan iskemik otak, famili gen Bcl-2 memegang peranan penting dalam mengontrol kematian neuronal, dalam penelitian iskemia dengan menggunakan tikus menunjukkan ekspresi dari agen proapoptosis seperti Bax meningkat di neuron (Nguyen *et al.*, 2014).

Pada 10 tahun terakhir, kemajuan luar biasa dalam pemahaman patofisiologi stroke telah dibuat, terutama pada stroke iskemik, yang merupakan 80% dari

semua kasus stroke. Kemajuan ini telah mengarah pada identifikasi lebih dari 1000 molekul dengan efek perlindungan terhadap otak dari model eksperimental dan diimplementasikan lebih dari 250 untuk uji klinis (Young *et al.*, 2007). Terlepas dari semua upaya ini, tidak ada strategi terapi yang efektif untuk mencegah kerusakan saraf yang terjadi setelah serangan stroke. Reperfusi stroke yang diinduksi oleh trombolisis, termasuk aktivator plasminogen jaringan (IV) intravena (tPA) dan intervensi endovaskular seperti mechanical thrombectomy (MT) adalah satu-satunya pengobatan farmakologis akut yang disetujui di seluruh dunia (Khandelwal *et al.*, 2016; Bhaskar *et al.*, 2018). Kedua perawatan ini menargetkan reperfusi vaskular dan terbatas hanya pada periode emas setelah serangan stroke iskemik (Whiteley *et al.*, 2016).

Alpha - Melanocyte Stimulating Hormone (α -MSH) merupakan keluarga peptida endogen yang berasal dari Pro-opiomelanocortin (POMC). Melalui ikatan dengan lima reseptor melanokortin (MCR), peptida ini memiliki pengaruh dan efek, termasuk efek anti-inflamasi, imunomodulator dan neuroprotektan. Distribusi luas dari setidaknya tiga sub tipe reseptor melanokortin (MC1R, MC3R dan MC4R) dalam sel-sel saraf, glial dan endotel menunjukkan bahwa reseptor ini dapat digunakan sebagai target farmakologis untuk terapi neuroprotektif. Melanokortin dapat mengurangi produksi agen proinflamasi dalam sel otak setelah terjadi cedera. Selama iskemia otak, α -MSH memiliki pengaruh perlindungan terhadap kerusakan sel-sel otak. Melanokortin menyelamatkan neuron yang menjadi sasaran eksitotoksik, mempercepat pemulihan neurofisiologis setelah cedera dan meningkatkan regeneratif kapasitas saraf dalam

perbaikan *post-lesion* (Catania, 2008). Selain itu, α -MSH yang berikatan pada MC4R diketahui dapat bertindak sebagai agen anti-apoptosis melalui regulasi pengaturan famili Bcl-2 (Lasaga *et al.*, 2008). Pada penelitian yang dilakukan oleh Zierath *et al* (2011) menunjukkan terdapat penurunan awal α -MSH pada plasma pasien dengan kondisi stroke berat. Peningkatan plasma α -MSH pada kondisi stroke ternyata menunjukkan peningkatan perbaikan hasil. Penelitian tersebut menjelaskan bahwa plasma α -MSH dapat digunakan untuk memprediksi perbaikan hasil dalam stroke iskemik.

Eritropoietin (EPO) adalah suatu glikoprotein dengan komposisi 165 asam amino dan berat molekul 34 kDa yang fungsi utamanya mengontrol produksi sel darah merah, EPO akan berikatan dengan reseptor pada permukaan sel prekursor eritroid untuk menstimulasi proliferasi, diferensiasi dan kelangsungan hidup sel selama hematopoiesis (Hoke, 2006). EPO adalah molekul multifungsi yang dihasilkan dan digunakan oleh berbagai jaringan. Selain eritropoiesis, EPO juga terlibat pada respon biologis memperbaiki kerusakan jaringan akut dan subakut. EPO juga memiliki efek proteksi otak dengan mengurangi eksitotoksisitas neuron (stimulasi neurotransmitter glutamat berlebih), mengurangi inflamasi, menghambat apoptosis neuron dan merangsang neurogenesis dan angiogenesis pada penelitian eksperimental cedera iskemia, hipoksia dan cedera toksik. EPO juga memperbaiki *outcome* neurologik dan fungsi mental (Fuadi & Bisri, 2015). EPO diduga dapat menjadi neuroprotektan dengan meningkatkan resistensi sel melalui aktivasi *phosphatidylinositol-3-kinase / Akt* dan jalur NF κ B

mengakibatkan regulasi dari protein antiapoptosis dan memblokir aktivasi protease sel yang mengarah ke apoptosis (Sharawy *et al.*, 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Dey *et al* (2016) menunjukkan EPO ternyata dapat meregulasi ekspresi POMC di hipotalamus melalui aktivasi pensinyalan STAT3, yang pada akhirnya dapat mempengaruhi stimulasi α -MSH. Selain itu, penelitian tersebut juga menjelaskan adanya penurunan ekspresi α -MSH yang merupakan produk pecahan dari POMC pada mencit dengan reseptor EPO terbatas, peneliti menentukan regulasi fungsi dan respon neuron POMC di hipotalamus terhadap pensinyalan EPO/EPOR. Pada kondisi stroke terjadi penurunan α -MSH, dimana peningkatan α -MSH merujuk pada adanya perbaikan kondisi patologis. Pemberian EPO diharapkan dapat meningkatkan α -MSH pada kondisi stroke iskemik.

Berdasarkan uraian di atas, maka diperlukan adanya penelitian mengenai potensi EPO terhadap peningkatan α -MSH pada kondisi stroke iskemik yang berhubungan dengan keparahan stroke, yang pada akhirnya dapat menurunkan terjadinya inflamasi dan apoptosis sel. Selain itu, belum pernah ada penelitian sebelumnya yang menjelaskan hubungan antara pemberian EPO dengan sistem melanokortin pada perbaikan kondisi stroke. Pembuktian hal tersebut dilakukan dengan pengujian pada mencit yang dikondisikan menderita stroke iskemik dengan menggunakan model eksperimental *right unilateral common carotid artery occlusion* (RUCCAO), metode ini adalah metode penginduksian stroke dengan cara mengikat atau memblok karotid arteri kanan yang mengalirkan darah

menuju otak, metode ini akan menghasilkan kondisi hipoksia pada jaringan otak (Mentari *et al.*, 2018).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh pemberian EPO terhadap fungsi kognitif mencit model stroke iskemik ?
2. Apakah pemberian EPO menghambat kematian sel di daerah penumbra otak mencit yang mengalami stroke iskemik ?
3. Apakah mekanisme penghambatan EPO terhadap kematian sel otak pada mencit stroke iskemik melalui peningkatan konsentrasi α -MSH ?
4. Apakah terdapat perubahan mikroskopis pada jaringan otak mencit model stroke iskemik yang diberikan EPO ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk menganalisis pengaruh pemberian EPO sebagai neuroprotektan dalam memperbaiki kondisi stroke iskemik.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis pengaruh pemberian EPO terhadap fungsi kognitif pada mencit stroke iskemik.

2. Membuktikan pengaruh pemberian EPO terhadap penghambatan kematian sel di daerah penumbra otak mencit setelah mengalami stroke iskemik.
3. Menjelaskan mekanisme penghambatan EPO terhadap kematian sel otak melalui peningkatan konsentrasi α -MSH pada mencit stroke iskemik.
4. Membuktikan pengaruh pemberian EPO terhadap perubahan seluler pada jaringan otak mencit dalam kondisi stroke iskemik.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai peran EPO sebagai neuroprotektif dalam perkembangan terapi stroke iskemik.