

**DISERTASI**

**ANALISIS EKSPRESI MICRORNA-21 DAN MICRORNA-221/222  
TERHADAP SITOKIN PROINFLAMASI (TNF- $\alpha$ ) DAN ANTIINFLAMASI  
(IL-10) DAN PERUBAHAN DERAJAT KLINIS DAN LUARAN KLINIS  
PADA PASIEN STROKE ISKEMIK**

***ANALYSIS OF MICRORNA-21 AND MICRORNA-221/222 EXPRESSION  
ON PROINFLAMATORY CYTOKINES (TNF- $\alpha$ ) AND ANTI-  
INFLAMMATORY CYTOKINES (IL-10) AND CHANGES IN CLINICAL  
SEVERITY AND CLINICAL OUTCOMES IN ISCHEMIC STROKE  
PATIENTS***



**ASHARI BAHAR**

**C013191031**

**PROGRAM STUDI DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN/SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

## DISERTASI

**ANALISIS EKSPRESI MICRORNA-21 DAN MICRORNA-221/222 TERHADAP SITOKIN PROINFLAMASI (TNF- $\alpha$ ) DAN ANTIINFLAMASI (IL-10) DAN PERUBAHAN DERAJAT KLINIS DAN LUARAN KLINIS PADA PASIEN STROKE ISKEMIK**

**ANALYSIS OF MICRORNA-21 AND MICRORNA-221/222 EXPRESSION ON PROINFLAMMATORY CYTOKINES (TNF- $\alpha$ ) AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES (IL-10) AND CHANGES IN CLINICAL SEVERITY AND CLINICAL OUTCOMES IN ISCHEMIC STROKE PATIENTS**

Disusun dan di Ajukan Oleh

**ASHARI BAHAR**

C013191031

*Telah dipertahankan di Hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasamuddin Pada Tanggal 3 Desember 2024 dan dinyatakan Telah Memenuhi Syarat Kelulusan*

Menyetujui  
Tim Promotor

**dr. Muhammad Akbar, PhD, SpS(K), DFM**

NIP. 19620921 198811 1 001

Co-Promotor

**Prof. Dr. dr. Andi Kurnia Bintang, SpS(K), MARS**  
NIP. 19640502 199103 2 001

Co-Promotor

**Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, PhD, SpMK(K)**  
NIP. 19670910 199603 1 001

Ketua Program Studi S3  
Ilmu kedokteran

**Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes**  
NIP. 19671103 199802 1 001

a.n. Dekan  
Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan,

**Prof. dr. Agus Salim Bukhari, M.Clin.Med, PhD, Sp.GK(K)**  
NIP. 19700821 199903 1 001

## ABSTRACT

ASHARI BAHAR. *An Analysis of MicroRNA-21 and MicroRNA-221/222 Expression on Proinflammatory Cytokines (TNF- $\alpha$ ) and Anti-inflammatory cytokines (IL-10) and Changes in Clinical Severity and Clinical Outcomes in Ischemic Stroke Patients* (supervised by Muhammad Akbar, Andi Kurnia Bintang, and Muhammad Nasrum Massi)

The aim of this study is to analyze the expression of microRNA-21 and microRNA- 221/222 in relation to pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ ), anti-inflammatory cytokines (IL-10), and the changes in severity and clinical outcomes of ischemic stroke patients. This research used a case-control design with subjects of acute ischemic stroke with an onset of less than seven days and controls, conducted from January to June 2024. Quantification of microRNA-21, microRNA-221/222 express on using real-time PCR and cytokines TNF- $\alpha$ . IL-10 using ELISA. The results show that sixty-four subjects with acute ischemic stroke and 22 controls are obtained. There are 48 cases and 14 control subjects of the expression of microRNA-21, while there are 34 cases and 6 control subjects of microRNA- 221/222. Mann-Whitney test show a significant difference ( $p=0.001$ ) in serum microRNA-21 expression in cases with average of 5.01 ( $\pm 9.27$ ) pg/dl compared to controls at 0.21 ( $\pm 0.38$ ) pg/dl, whereas serum microRNA-221/222 is not significant ( $p=0.91$ ) with an average of 1.05 ( $\pm 27.73$ ) pg/dl in cases and 4.29 ( $\pm 6.37$ ) pg/dl in controls. The Spearman correlation test with TNF- $\alpha$ , microRNA-21 expression ( $p=0.931$ ), and microRNA-221/222 ( $p=0.46$ ) show no significant correlation, and with serum IL-10 ( $p=0.058$  and  $p=0.235$ ) show the same. Changes in clinical severity ( $p=0.118$  and  $p=0.657$ ) and in clinical outcomes ( $p=0.88$  and  $p=0.697$ ) also show no significant correlation. ROC analysis on microRNA-21 expression with clinical severity indicates a sensitivity of 25% and specificity of 94.74% and clinical outcomes sensitivity of 76.47% and specificity of 35.48%. MicroRNA-221/222 expression with clinical severity indicates a sensitivity of 66.67% and specificity of 58.33% and clinical outcomes sensitivity of 91.57% and specificity of 43.48%.

Keywords: microRNA-21, microRNA-221/222, acute ischemic stroke, TNF- $\alpha$ , IL-10, clinical severity, clinical outcome



024

## ABSTRACT

ASHARI BAHAR. *An Analysis of MicroRNA-21 and MicroRNA-221/222 Expression on Proinflammatory Cytokines (TNF- $\alpha$ ) and Anti-inflammatory cytokines (IL-10) and Changes in Clinical Severity and Clinical Outcomes in Ischemic Stroke Patients* (supervised by Muhammad Akbar, Andi Kurnia Bintang, and Muhammad Nasrum Massi)

The aim of this study is to analyze the expression of microRNA-21 and microRNA- 221/222 in relation to pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ ), anti-inflammatory cytokines (IL-10), and the changes in severity and clinical outcomes of ischemic stroke patients. This research used a case-control design with subjects of acute ischemic stroke with an onset of less than seven days and controls, conducted from January to June 2024. Quantification of microRNA-21, microRNA-221/222 express on using real-time PCR and cytokines TNF- $\alpha$ . IL-10 using ELISA. The results show that sixty-four subjects with acute ischemic stroke and 22 controls are obtained. There are 48 cases and 14 control subjects of the expression of microRNA-21, while there are 34 cases and 6 control subjects of microRNA- 221/222. Mann-Whitney test show a significant difference ( $p=0.001$ ) in serum microRNA-21 expression in cases with average of 5.01 ( $\pm 9.27$ ) pg/dl compared to controls at 0.21 ( $\pm 0.38$ ) pg/dl, whereas serum microRNA-221/222 is not significant ( $p=0.91$ ) with an average of 1.05 ( $\pm 27.73$ ) pg/dl in cases and 4.29 ( $+6.37$ ) pg/dl in controls. The Spearman correlation test with TNF- $\alpha$ , microRNA-21 expression ( $p=0.931$ ), and microRNA-221/222 ( $p=0.46$ ) show no significant correlation, and with serum IL-10 ( $p=0.058$  and  $p=0.235$ ) show the same. Changes in clinical severity ( $p=0.118$  and  $p=0.657$ ) and in clinical outcomes ( $p=0.88$  and  $p=0.697$ ) also show no significant correlation. ROC analysis on microRNA-21 expression with clinical severity indicates a sensitivity of 25% and specificity of 94.74% and clinical outcomes sensitivity of 76.47%d specificity of 35.48%. MicroRNA-221/222 expression with clinical severity indicates a sensitivity of 66.67% and specificity of 58.33% and clinical outcomes sensitivity of 91 57% and specificity of 43.48%.

Keywords: microRNA-21, microRNA-221/222, acute ischemic stroke, Ti F- $\alpha$ , IL-10, clinical severity, clinical outcome





KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN**  
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297  
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : **Ashari Bahar**  
NIM : C013191031  
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran  
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

**ANALISIS EKSPRESI MICRORNA-21 DAN MICRORNA-221/222 TERHADAP SITOKIN PROINFLAMASI (TNF- $\alpha$ ) DAN ANTIINFLAMASI (IL-10) DAN PERUBAHAN DERAJAT KLINIS DAN LUARAN KLINIS PADA PASIEN STROKE ISKEMIK**

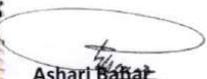
Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 3 Desember 2024



g menyatakan,

  
**Ashari Bahar**

## PRAKATA

*Bismillahirrahmanirrahim,  
Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh,*

*Alhamdulillahirabbil'alamin* penulis panjatkan puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan salawat serta salam senantiasa tercurah kepada junjungan kita Nabi Besar Muhammad SAW, beserta keluarga, sahabat, dan pengikutnya sampai akhir zaman, sehingga penulis dapat merampungkan sebuah disertasi yang berjudul “Analisis ekspresi microRNA-21 dan microRNA-221/222 terhadap sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) dan antiinflamasi (IL-10) dan perubahan derajat klinis dan luaran klinis pada pasien stroke iskemik”.

Disertasi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan disertasi ini masih terdapat berbagai kelemahan yang perlu diperkuat dan kekurangan yang perlu dilengkapi. Oleh sebab itu dengan penuh kerendahan hati penulis mengharapkan masukan, koreksi serta saran untuk mencapai hasil yang lebih baik.

Kepada **Ayahanda Almarhum Baharuddin Banrio** dan **Ibunda Almarhumah Hj. Siti Hawa Abu Bakar** dan **Ayahanda Mertua H. Ahmad Husain** dan **Ibunda Mertua Hj. Asmi Halim**, istri dan anak-anak tercinta **dr. Hj. Mutmainnah Ahmad, Sp.DVE, FINS DV, FAADV, Khaulah Aqilah Ashari, Emir Tsaqif Ashari** dan **Almer Abrar Ashari**, serta **saudara-saudari** atas doa, kasih sayang, didikan, bimbingan, kesabaran dan dukungan yang telah diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan dengan baik.

Dengan tersusunnya disertasi ini, penulis tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada tim pembimbing **dr. Muhammad Akbar, Ph.D., Sp.N(K), DFM.** sebagai Promotor dan **Prof. Dr. dr. Andi Kurnia Bintang, Sp.N(K), M.Kes.** sebagai co-promotor-1 serta **Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, Ph.D., Sp.MK(K).** sebagai co-promotor-2, yang telah bersedia meluangkan waktu untuk membimbing, memberikan ilmu, inspirasi dan motivasi hingga penelitian beserta hasilnya dapat dituangkan dalam bentuk sebuah disertasi.

Penulis turut mengucapkan terima kasih dan penghargaan pula kepada:

1. Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, M.A. dan Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc. selaku Rektor Universitas Hasanuddin Makassar pada masanya;
2. Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc. dan Prof. dr. Budu, Sp.M(K), M.Med, Ph.D selaku Direktur Program Pasca sarjana Universitas Hasanuddin Makassar pada masanya;
3. Prof. dr. Budu, Sp.M(K), M.Med, Ph.D dan Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes., Sp.GK., Sp.PD-KGH., FINASIM selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar pada masanya;

4. Prof. dr. Agussalim Bukhari, M.Clin.Med, Ph.D, Sp.GK(K) dan Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes. selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin Makassar;
5. Seluruh Tim penguji: Prof. dr. Irawan satriotomo, Ph.D, BCMAS, Prof. dr. Agussalim Bukhari, M.Clin.Med, Ph.D, Sp.GK(K), Dr. dr. Jumraini Tammase, Sp.N(K) dan dr. Rusdina Bte ladju, Ph.D atas waktu dan kesempatannya dalam menguji, memberi arahan dan masukannya agar disertasi ini menjadi lebih baik;
6. Kepada Prof. Dr. dr. Syafri Kamsul Arif, Sp.An-KIC, KAKV selaku Direktur Utama RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar dan Prof. dr. Muhammad Ichsan, Ph.D, Sp.M(K) selaku Direktur Utama Rumah Sakit Universitas Hasanuddin Makassar serta Para Direktur rumah sakit lainnya yang telah memberikan kesempatan kepada peneliti untuk melaksanakan penelitian dalam ruang lingkup rumah sakit tersebut;
7. Kepada dr. Rusdina Bte Ladju, Ph.D selaku Kepala Laboratorium *Hasanuddin University Medical Research Center (HUMRC)* Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin beserta staf Ibu Handayani Halik, S.Si, M.Kes dan Bapak Syafri S, AMAK atas bantuannya selama penulis melakukan penelitian;
8. Staf Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin: Bapak Akmal, S.Sos, MAP, Bapak Abdul Muin Amd. FT dan Bapak Rahmat atas bantuannya selama penulis menjalani masa studi;
9. Kepada semua guru-guru dan teman sejawat penulis dalam Departemen Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin: Prof. Dr. dr. Amiruddin Aliah, SpS(K), MM, Alm. Prof. dr. Arifin Limoa, Sp.S(K), dr. K Edward Sie, Sp.S(K), dr. Kuswara, Sp.S(K), Alm. dr. Gerard Wuysang, Sp.S(K), dr. Misnah D Basir, Sp.S(K), dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA(K), Sp.N(K), Dr. dr. Susi Aulina, Sp.S(K), dr. Muhammad Akbar, Ph.D., Sp.N(K), DFM, Dr. dr. David Gunawan, Sp.N(K), Dr. dr. Yudy Goysal, Sp.N(K), dr. Abdul Muis, Sp.N(K), dr. Louis Kwandou, Sp.N(K), Prof. Dr. dr. Andi Kurnia Bintang, Sp.N(K), M.Kes., Dr. dr. Nadra Maricar, Sp.N(K), Dr. dr. Hasmawaty Basir, Sp.N(K), dr. Mimi Lotisna, Sp.N(K), Dr. dr. Jumraini Tammase, Sp.N(K), dr. Ummu Atiah, Sp.N(K), dr. Anastasia Juliana, Sp.N(K), Dr. dr. Audry Devisanty Wuysang, M.Sc, Sp.N(K), dr. M. Iqbal Basri, M.Kes, Sp.N(K), dr. M. Erwin Rachman, Sp.N(K), Dr. dr. Andi Weri Sompas, Sp.N(K), dr. Muhammad Yunus Amran, Ph.D, Sp.N(K), FIPM, FINR, FINA, dr. Wahida Ratnawati, Sp.N(K), M.Kes, FIN, NMTC.TC.Neu, Dr. dr. Nurussyariah Hammado, M.NeuroSci, M.AppSci, Sp.N(K), FIPM, dr. Citra Rosyidah, M.Kes, Sp.N(K), dr. Tria Lilian Limoa, M.Kes, Sp.N(K), dr. Achmad Harun Muchsin, Sp.N, Subsp. N.Onk(K), Dipl. Of Pain, FMIN, AIFO-K, dr. Faisal Budisasmita Paturungi Parawansa, Sp.N, dr. Raissa Alfathir, Sp.N, dr. Ahmad Zaki, Sp.N, dr. Gita Vita Soraya, Ph.D, dr. Yusran Ady Fitrah, Ph.D serta para tenaga pendidik Bapak Isdar, S.KM, MM, Ibu I Masse H, SE, Bapak Muh. Syukur Hasan, S.KM, Bapak Arfan, S.HI, M.Hum, dan Bapak Surfian Rahmat, S.IP, M.Si, yang telah mendidik, membimbing, menginspirasi dalam pelayanan dan

pengembangan neurologi dan membantu penulis sehingga dapat menyelesaikan disertasi dan pendidikan ini dengan baik;

10. Kepada guru penulis dalam bidang Neurointervensi Prof. dr. Shakir Husain, MD, DM, FINR, beserta senior, inspirator dan teman sejawat dalam POKJA Neurointervensi dr. Fritz Sumantri, Sp.N(K), FINS, FINA, dr. Hermanto Swatan, Sp.N, FINS, FINA, dr. Suwito Pantoro, Sp.N, FINS, FINA, dr. Anthonius Adinata, Sp.N, FINS, FIPP, dr. Yuwono, Sp.S, FINS, FINA, dr. Tri Wahyudi, Sp.N, FINS, FINA, dr. Tommy R Setiawan, Sp.N(K), FINS, FINA, dr. Riri Sarisanti, Sp.N, FINS, FINA, Dr. dr. Achmad Firdaus Sani, Sp.N(K), FINS, FINA, dr. Conrad Pasaribu, Sp.N, FINS, FINA, Dr. dr. Subandi, Sp.N(K), Dr. dr. Iskandar Nasution, Sp.N(K), Dr. dr. Kumara Tini, Sp.N(K), dr. Bambang Try, Sp.N, FINS, FINA dan seterusnya yang penulis tidak dapat sebutkan satu per satu yang selalu menjadi teman berdiskusi dan berjuang dalam memajukan pelayanan neurologi khususnya neurointervensi di Indonesia;
11. Kepada kakanda tercinta Almarhum dr. Husain Husni, Sp.N, FINS yang selalu menjadi sumber inspirasi dalam berjuang dan berbuat baik, adinda dr. Wijoyo Halim, Sp.N yang setiap saat bisa menjadi teman berdiskusi dan adik-adik Fellowship Neurointervensi lainnya serta adik-adik residen neurologi yang begitu banyak membantu dalam menyelesaikan penelitian dan pendidikan ini;
12. Kepada para perawat dan radiografer dalam keluarga Brain Centre yang selama ini sangat membantu dalam memberikan pelayanan neurologi di RSUP Dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar;
13. Semua teman-teman seperjuangan pada Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, yang selalu memberikan motivasi, dorongan, dan informasi-informasi kepada peneliti sehingga peneliti dimudahkan selama masa studi;
14. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian, atas perhatian, perkenan dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunnya disertasi ini;
15. Penulis juga menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya untuk seluruh partisipan penelitian yaitu kepada para pasien stroke iskemik dan keluarganya yang telah berkenan untuk berpartisipasi dalam penelitian ini.

Dengan memperhatikan dan mengikuti bimbingan, arahan dan perbaikan dari tim promotor serta penguji, penulis mengharapkan disertasi ini dapat bermanfaat bagi para pembacanya.

## DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI .....	iv
PRAKATA .....	v
ABSTRAK .....	viii
ABSTRACK .....	ix
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH, DAN LAMBANG .....	xvi
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	15
1.3 Tujuan Penelitian .....	16
1.4 Hipotesis Penelitian .....	17
1.5 Manfaat Penelitian .....	17
1.6 Kebaruan .....	18
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>19</b>
2.1 Stroke Iskemik .....	19
2.2 MicroRNA/miRNA pada Stroke Iskemik .....	23
2.3 Peran microRNA pada Kerusakan Otak Pasca Stroke .....	35
2.4 MicroRNA sebagai Biomarker Stroke Iskemik .....	55
2.5 Peran MicroRNA Dalam Kerusakan Otak Pada Stroke Hemoragik .....	57
2.6 MicroRNA/miRNA-21 Pada Aterosklerosis dan Stroke Iskemik .....	59
2.7 MicroRNA/miRNA-221/222 pada Aterosklerosis dan Stroke Iskemik .....	69
2. 8 Penerapan Terapi Berbasis MicroRNA/miRNA .....	72
2. 9 Modifikasi Kimia dan Desain MicroRNA/miRNA .....	73
2. 10 <i>National Institute Health Stroke Scale</i> (NIHSS) .....	74
2.11 <i>Modified Rankin Scale</i> (mRS) .....	76
2.12 Kerangka Teori Penelitian .....	77
2.13 Kerangka Konsep Penelitian .....	78

BAB III METODE PENELITIAN.....	79
3.1 Desain Penelitian .....	79
3.2 Tempat dan Waktu.....	79
3.3 Populasi dan Subjek Penelitian .....	79
3.4 Perkiraan Besar Sampel .....	79
3.5 Kriteria Penelitian .....	80
3.6 Kriteria Kerja Penelitian.....	81
3.7 Alur Penelitian.....	94
3.8 Variabel Penelitian .....	94
3.9 Definisi Operasional dan Kriteria Objektif .....	95
3.10 Manajemen dan Analisis Data .....	97
3.11 Etika Penelitian.....	97
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	98
4.1 Hasil Penelitian.....	98
4.2 Pembahasan.....	111
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	152
5.1 Kesimpulan .....	152
5.2 Saran.....	153
DAFTAR PUSTAKA.....	154

## DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Disregulasi miRNA yang terkait dengan stroke iskemik.....	56
Tabel 4. 1 Karakteristik demografi subjek stroke iskemik (kasus) dan sehat (kontrol).....	98
Tabel 4. 2 Karakteristik subjek dengan ekspresi miRNA-21 dan miRNA-221/222 pada stroke iskemik (kasus) dan sehat (kontrol) .....	100
Tabel 4. 3 Karakteristik demografi subjek dengan ekspresi keduanya miRNA-21 dan miRNA-221/222 pada stroke iskemik (kasus) dan sehat (kontrol).....	101
Tabel 4. 4 Karakteristik demografi subjek dengan salah satu ekspresi miRNA-21 dan miRNA-221/222 pada stroke iskemik (kasus) dan sehat (kontrol).....	102
Tabel 4. 5 Karakteristik demografi subjek dengan tidak ada ekspresi miRNA-21 dan miRNA-221/222 pada stroke iskemik (kasus) dan sehat (kontrol).....	103
Tabel 4. 6 Karakteristik usia kelompok subjek stroke iskemik (kasus) dan kelompok sehat (kontrol) .....	104
Tabel 4. 7 Deskripsi ekspresi miRNA-21 dan miRNA-221/222 subjek stroke iskemik (kasus n=48) pada saat masuk rumah sakit.....	104
Tabel 4. 8 Deskripsi ekspresi miRNA-21 dan miRNA-221/222 pada subjek sehat (kontrol).....	104
Tabel 4. 9 Deskripsi sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) serum dan sitokin antiinflamasi (IL-10) serum subjek stroke iskemik (kasus) pada saat masuk rumah sakit.....	105
Tabel 4. 10 Deskripsi derajat klinis subjek stroke iskemik (kasus) berdasarkan NIHSS dan luaran klinis (berdasarkan mRS) pada saat masuk rumah sakit dan onset hari ke 30.....	105
Tabel 4. 11 Analisis perbandingan ekspresi miRNA-21 pada subjek stroke iskemik (kasus) dengan subjek kontrol.....	106
Tabel 4. 12 Analisis korelasi ekspresi miRNA-21 dengan sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) serum subjek stroke iskemik (kasus).....	107

Tabel 4. 13 Analisis korelasi ekspresi miRNA-21 dengan perubahan derajat klinis dan luaran klinis subjek stroke iskemik (kasus) .....	107
Tabel 4. 14 Analisis perbandingan ekspresi miRNA-221/222 pada subjek stroke iskemik (kasus) dan sehat (kontrol).....	107
Tabel 4. 15 Analisis korelasi ekspresi miRNA-221/222 dengan sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) dan sitokin antiinflamasi IL-10 serum subjek stroke iskemik (kasus) .....	108
Tabel 4. 16 Analisis korelasi ekspresi miRNA-221/222 dengan perubahan derajat klinis dan luaran klinis subjek stroke iskemik (kasus) .....	109
Tabel 4. 17 miRNA-21 dan miRNA-221/222 sebagai prediktor ringan-beratnya derajat klinis dan luaran klinis pasien stroke iskemik akut.....	110

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Biogenesis dan aksi miRNA .....	24
Gambar 2.2 Diagram Venn yang menunjukkan hubungan jenis miRNA dengan berbagai area penyakit pembuluh darah (arteri karotis, arteri koroner, arteri renalis dan arteri pada tungkai).....	27
Gambar 2.3 Aktivitas biologi dari beberapa miRNA yang terkait dengan patofisiologi stroke. Mirna yang berifat proaterogenik (merah) dan ateroprotektif (hijau) .....	32
Gambar 2.4 Proses iskemik serebral disertai dengan mekanisme patogen yang berkontribusi dalam kerusakan dan perbaikan pasca stroke iskemik serta miRNA yang terlibat .....	38
Gambar 2.5 Fungsi dari miRNA dalam berbagai sel vaskular dalam proses aterosklerosis .....	62
Gambar 2.6 Kerangka Teori Penelitian.....	78
Gambar 2.7 Kerangka Konsep Penelitian .....	79
Gambar 3.1 Alur penelitian .....	96
Gambar 4.1 Ekspresi miRNA-21 antara subjek stroke iskemik (kasus) dan subjek sehat (kontrol) ( $p = 0,001$ ) .....	108
Gambar 4.2 Ekspresi miRNA-221/222 antara subjek stroke iskemik (kasus) dan subjek sehat (kontrol) ( $p = 0,91$ ) .....	110
Gambar 4.3 Kemampuan prediksi miRNA-21 dan miRNA-221/222 terhadap derajat klinis.....	112
Gambar 4.4 Kemampuan prediksi miRNA-21 dan miRNA-221/222 terhadap luaran klinis.....	112

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1. Lembar Skor <i>NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH STROKE SCORE</i> (NIHSS).....	172
Lampiran 2. Lembar Skor <i>MODIFIED RANKIN SCALE</i> (mRS).....	175
Lampiran 3. REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK.....	176

## DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH, DAN LAMBANG

Lambang/singkatan Arti dan keterangan

ABCA 1	: ATP binding cassette transporter 1
ABCA1	: ATP binding cassette transporter 1
ABCG1	: ATP binding cassette subfamily G member 1
AGO	: Silver oxide
AMPA	: $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AP-1	: Activator protein-1
ApoB	: Apolipoprotein B
AQP	: Aquaporin
ASK-1	: Apoptosis signal-regulating kinase 1
AT1r	: Angiotensin II receptor type 1
BBB	: Blood brain barrier
Bcl-6	: B cell limfoma-6
BI	: Barthel Index
BMEEC	: Bone marrow microvascular endothelial cell
CAM	: Cell adhesion molecules
CARHSP1	: Calcium regulated heat stable protein 1
CCL3	: Chemokine (C-C motif) ligand 3
CD	: Cluster of differentiation
cDNA	: Complementary DNA
ceRNA	: Competing endogenous RNA
CircR-284	: Circular RNA-284
CSF	: Cerebrospinal fluid
CSF	: Colony stimulating factor
<i>CSF-1</i>	: Colony stimulating factor-1
CT	: Cycle threshold
DG	: Dentate gyrus
DM-BMSC	: Bone-marrow stromal cells (BMSCs) derived from T1DM rats
EC	: Endothelial cell

ECM	: Extracellular matrix
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
Elk-1	: ETS transcription factor ELK1
ENOs	: Endothelial nitric oxide synthase
Enpp1	: Ectonucleotide phosphodiesterase 1
ERK	: Extracellular signal-regulated kinases
ET-1	: Endothelin-1
ETS1	: Erythroblast transformation specific 1
FDA	: Food and Drug Administration
FGF-2	: Fibroblast growth factor-2
Foxp3	: Forkhead box P3
GIST	: Gastrointestinal stroma tumor
GLT-1	: Glutamate transporter-1
GluR2	: Glutamate receptor 2
H/R	: Hypoxia/reperfusion
HIBD	: Hypoxic ischemic brain damage
HIF-1 $\alpha$	: Hypoxia inducible factor 1 alpha
HIS	: Hyperacute ischemic stroke
HRP	: Horseradish peroxidase
hs-CRP	: High-sensitivity C-reactive protein
HUM RC	: Hasanuddin University Medical Research Center
I/R	: Ischemia/reperfusion
ICAM-1	: Intercellular Adhesion Molecule 1
ICH	: Intracerebral Hemorrhage
IFN- $\gamma$	: Interferon-gamma
IL-10	: Interleukin-10
IL-13	: Interleukin-13
IL-1 $\beta$	: Interleukin-1 beta
IL-6	: Interleukin-6
IRAK4	: Interleukin 1 receptor associated kinase
IRS-1	: Insulin receptor substrate 1

IRS-1-PI3K-Akt	: Insulin receptor substrate-1-phosphoinositide 3-kinase-Ak strain transforming
Klf4	: Kruppel like factor 4
LDL	: Low density lipoprotein
LNA	: Locked nucleic acid
lncRNA MEG3	: Long non-coding RNA maternally expressed gene 3
LPS	: Lipololisakarida
MAP kinase	: Mitogen-activated protein
MCAO	: Middle cerebral artery occlusion
MCP-1	: Monocyte chemoattractant protein-1
MEG3	: Maternally expressed gene 3
MIP-1 $\alpha$	: Macrophage inflammatory proteins
mir	: Micro-RNA
MiRNA	: Micro RNA
miRNA-221	: Micro RNA-221
miRNA-222	: Micro RNA-222
MMP-9	: Matrix metalloproteinase-9
Mn-SOD	: Manganese superoxide dismutase
mRNA	: Messenger RNA
mRS	: Modified ranking scale
MSC	: Mesenchymal stromal cells
MSC	: Mesenchymal stem cell
MYD 88	: Myeloid differentiation response 88
NF-KB	: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B' cells
NIHSS	: National Institute of Health Stroke Scale
NLRP 3	: Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing
NMDA	: N-methyl-D-aspartate
NOX4	: NADPH oxidase 4
NR2A	: NMDA receptor subunit 2A
Nrf2	: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

OGD	: Oxygen glucose deprivation
OGD	: Oxygen-glucose deprivation
P2Y <sub>12</sub>	: Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12 protein
PC	: Preconditioning
PCR	: Polymerase chain reaction
PDCD4	: Programmed cell death 4
PDGF	: Platelet derived growth factor
PGC-1 $\alpha$	: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha
PI3K	: Phosphoinositide 3-kinase
Pit-1	: Pituitary-specific positive transcription factor-1
PPAR- $\delta$	: Proliferator-activated receptors- $\delta$
Pri-mir-451	: Primary-mir-451
Pri-miRNA	: Primary transcript miRNA
PTEN	: Phosphatase and tensin homolog
PTEN	: Phosphatase and Tensin Homolog deleted on Chromosome 10
RB	: RNA binding
REST	: RE1-silencing transcription factor
RIS	: Restorative ischemic stroke
RJ	: Royal jelly
RNA	: Ribonucleic acid
RNAase	: Ribonuclease
RNase III	: Ribonuclease III
ROS	: Reactive Oxygen Species
RT-PCR	: Reverse transcriptase PCR
SHR	: Spontaneously hypertensive rat
SI	: Stroke ischemic
SIS	: Subacute ischemic stroke
SMAD	: Small mother against decapentaplegic
SOCS1	: Suppressor of cytokine signaling 1).

SSP	: Sistem saraf pisat
SSS	: Scandinavian Stroke Scale
STAT-5	: Signal transducer and activator of transcription-5B
SVZ	: Subventricular zone
T2D	: Type 2 diabetes
TACE	: Tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzyme
TGF- $\beta$	: Transforming growth factor- $\beta$
Th2	: T helper 2
TNFR	: Tumor necrosis factor receptor
TNF- $\alpha$	: Tumor necrosis factor-alpha
tRNA	: Transfer RNA
ULK-2	: Unc-51-like kinase 2
VCAM-1	: Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
VNS	: Vagal nerve stimulation
VSMC	: Vascular smooth muscle cell
WHO	: World Health Organization
$\gamma\delta$ T	: Gamma delta T cell

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Stroke sampai saat ini masih menjadi penyebab kematian kedua di dunia dan merupakan penyebab utama kecacatan permanen pada orang dewasa (Katan & Luft, 2018). Ketika otak mengalami kekurangan oksigen dan nutrisi, baik karena oklusi/stenosis atau rupturnya arteri, neuron yang berada pada area yang cedera akan mati dan akan menyebabkan kerusakan yang irreversibel, yang pada akhirnya akan menyebabkan kecacatan pada penderitanya (Q. Jiang et al., 2021a).

Menurut laporan terbaru diperkirakan di USA pada populasi yang berusia lebih dari 20 tahun sekitar 7,6 juta telah mengalami stroke berdasarkan data tahun 2018. Prevalensi ini meningkat pada kedua jenis kelamin baik laki-laki maupun perempuan (Tsao et al., 2022). Di Cina, stroke iskemik sekitar 70% dari semua kasus stroke. Pria secara signifikan lebih rentan terhadap penyakit ini daripada wanita (Q. Jiang et al., 2021a). Prevalensi global dari keseluruhan tipe stroke sekitar 89,13 juta kasus, dengan peningkatan sekitar 2,17% dari tahun 2010 ke 2020. Prevalensi tertinggi di Afrika Sub Sahara, USA bagian tenggara dan timur serta Asia Tenggara. Terkhusus untuk stroke iskemik tertinggi di USA dan Afrika Sub Sahara (Katan & Luft, 2018; Tsao et al., 2022).

Adapun insiden di USA setiap tahun diperkirakan sekitar 795.000 yang mengalami serangan stroke, sekitar 610.000 sebagai serangan pertama dan 185.000 akibat serangan ulangan. Dari keseluruhan stroke, sekitar 85% yang mengalami stroke iskemik, 10% perdarahan intraserebral dan sekitar 5% yang mengalami perdarahan subarakhnoid. Rerata insiden tertinggi stroke pada penduduk Asia Timur sekitar 206,63 per 100.000 penduduk, diikuti Asia Tengah sekitar 200,48 per 100.000 penduduk dan Asia Tenggara sekitar 190,98 per 100.000 penduduk. Insiden global dari stroke sekitar 11,71 juta dimana 7,59 juta mengalami stroke iskemik, 3,41 juta

mengalami perdarahan intraserebral dan 0,71 juta mengalami perdarahan subaraknoid (Katan & Luft, 2018; Tsao et al., 2022).

Dari data tahun 2019 diperkirakan setiap 3 menit, seorang meninggal karena stroke atau sekitar 1 kematian akibat stroke dari 19 kematian di USA. Secara global angka mortalitas akibat stroke sekitar 7,08 juta per tahun, namun hal ini mengalami penurunan sekitar 15,27% dari tahun 2010. Mortalitas tertinggi pada Asia Tengah, Asia Tenggara, Asia Timur, Oceania dan Afrika Sub Sahara. Dan akibat dari stroke iskemik, mortalitas sekitar 3,48 juta dan mengalami penurunan sekitar 13,31% dari tahun 2010 (Tsao et al., 2022).

Prevalensi stroke di Indonesia tahun 2018 berdasarkan diagnosis dokter pada penduduk umur  $\geq 15$  tahun sebesar (10,9%) atau diperkirakan sebanyak 2.120.362 orang (Kemenkes RI, 2018). Di Indonesia sendiri data prevalensi stroke menunjukkan kenaikan dari 7% per 1000 penduduk pada tahun 2013 menjadi 10,9% per 1000 penduduk pada tahun 2018. Provinsi yang memiliki penderita stroke tertinggi yaitu Kalimantan Timur dengan jumlah 14,7% per 1000 penduduk, sedangkan Sulawesi Selatan menempati urutan ke 18 provinsi dengan penderita stroke terbanyak di Indonesia. Data mengenai faktor risiko yang dapat memicu terjadinya stroke juga meningkat, seperti prevalensi hipertensi pada penduduk umur yang lebih dari 18 tahun di Indonesia sebesar 31,7% dengan kasus hipertensi yang terdiagnosis dan minum obat 23,9% dan tidak terdiagnosis 76,1 %. Kasus diabetes mellitus sebanyak 5,7 % dari total populasi, 1,5% sudah terdiagnosis dan 4,2 % belum terdiagnosis (Kemenkes RI, 2018).

Sampai saat ini berdasarkan studi epidemiologi telah diketahui banyak faktor risiko yang terkait dengan dengan stroke iskemik (SI). Faktor risiko SI antara lain hipertensi, aterosklerosis, diabetes mellitus, diseksi arteri, gaya hidup yang tidak tepat, pola diet yang tidak tepat, obesitas, foramen ovale paten, status sosial ekonomi, penggunaan obat-obatan terlarang, merokok, dan gangguan faktor hemostatik (Boehme et al., 2017; Bulygin et al., 2020; Ekker et al., 2018). Evaluasi faktor risiko merupakan aspek penting untuk menguraikan subtype spesifik SI karena prognosis,

patogenesis, dan terapi bervariasi berdasarkan sub tipe yang berbeda. Selain itu, pemilihan strategi pencegahan yang cocok untuk mengurangi SI sebagian besar didasarkan pada sub tipe SI (Ohira et al., 2006). Selama abad ke-21, insiden stroke berdasarkan usia telah meningkat pada orang dewasa muda. Orang dewasa yang lebih tua di seluruh dunia dipengaruhi oleh obesitas dan penuaan dan kejadian stroke di antara orang-orang obesitas ini dilaporkan meningkat menjadi 1,5 juta orang di seluruh Eropa pada tahun 2025 (Ohira et al., 2006). Selain itu, pasien stroke memiliki risiko lebih tinggi untuk mengalami kelainan kognitif, demensia, penyakit Alzheimer, depresi, dan secara signifikan mengurangi kualitas hidup pasien. Oleh karena itu, modalitas terapi pasca stroke untuk mencapai pemulihan sangat diperlukan untuk mengurangi efek stroke yang merugikan ini (Boehme et al., 2017).

Hipertensi arteri adalah salah satu faktor risiko yang signifikan untuk SI. Hal ini menurunkan elastisitas pembuluh darah yang lebih lanjut memfasilitasi pecahnya pembuluh darah dan menyebabkan stroke hemoragik (Boehme et al., 2017; Hasan et al., 2011). Hipertensi yang berlanjut akan menyebabkan proses aterosklerotik yang bisa menimbulkan stenosis arteri, pembentukan trombus, dan ruptur plak, yang semuanya dapat menyebabkan oklusi arteri yang mensuplai area otak tertentu, yang lebih lanjut menyebabkan iskemik (Boehme et al., 2017; Bulygin et al., 2020; Gregersen & Havorsen, 2018; J. C. Wang & Bennett, 2012). Selanjutnya, hiperglikemia diabetik juga memperburuk kematian neuron dan memperburuk luaran klinis pada pasien SI (R. Chen et al., 2016). Trombosis dan emboli mendorong efek merugikan pada SI seperti eksitotoksisitas, edema serebral dan gangguan sawar darah otak (BBB). Selain itu, cedera otak tidak terbatas pada inti zona iskemik, karena neuron yang sekarat melepaskan faktor proapoptosis dan proinflamasi ke parenkim otak yang berdekatan, yang menyebabkan kematian neuron di wilayah penumbra (Khoshnam et al., 2017; Maida et al., 2020). Daerah iskemik penumbra dapat dilindungi dengan pengobatan tepat waktu menggunakan modalitas terapi yang dapat membatasi ukuran infark, menyelamatkan

fungsi sel dan integritas struktural di daerah penumbra (Khoshnam et al., 2017; Maida et al., 2020).

Selain iskemik, reperfusi menginduksi cedera otak melalui beberapa mekanisme termasuk inflamasi dan stres oksidatif (Y. Jiang et al., 2022; Khoshnam et al., 2017). Proses inflamasi dimulai beberapa jam setelah cedera, ketika mikroglia dan neuron yang sekarat melepaskan molekul proinflamasi. Secara bersamaan, sel endotel mengekspresikan molekul adhesi sel termasuk *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) dan *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) (Raggi et al., 2018; Ramiro et al., 2018). Perubahan ini biasanya mendorong migrasi transendotelial sel imun perifer terutama makrofag dan neutrofil ke daerah iskemik, yang selanjutnya mempotensiasi inflamasi dengan pelepasan molekul pro-inflamasi dan *spesies oksigen reaktif* (ROS) berikutnya. Defisit energi selama cedera otak menyebabkan kerusakan "pompa ion melintasi neuron", yang menyebabkan edema vaskular-seluler (sitotoksik) dan meningkatkan tekanan intrakranial. Selanjutnya, mitokondria yang rusak dalam sel otak melepaskan ROS, yang memediasi peroksidasi lipid, dan kerusakan asam nukleat. Semua faktor ini memperburuk kerusakan otak sekunder setelah stroke. Inflamasi dan stres oksidatif adalah peristiwa penting yang terlibat dalam mendorong kerusakan seluler dan molekuler selama serangan pasca-iskemik. Stroke yang awalnya menimbulkan kerusakan pada fase akut diikuti oleh kerusakan seluler kronis yang kondusif untuk mitigasi dalam plastisitas dan regenerasi seluler. Berdasarkan fase-fase ini, intervensi terapeutik saat ini lebih disukai untuk mempotensiasi kelangsungan hidup dan pemulihan neuron (Bulygin et al., 2020; Raggi et al., 2018; Ramiro et al., 2018).

Meskipun banyak pendekatan dan studi diagnostik dan terapeutik yang telah dilakukan, sampai saat ini trombolisis rtPA masih merupakan pengobatan yang paling efektif untuk SI (Dela Peña et al., 2015; Yemisci et al., 2015). Salah satu yang akhir-akhir ini banyak diteliti dalam kaitannya dengan proses terjadinya stroke terutama SI adalah keterlibatan dari *micro-RNA* (*miRNA*). *Micro-RNA* merupakan molekul *noncoding RNA* berukuran

kecil (16-29 nukleotida). Telah banyak penelitian yang menguraikan peran microRNA/miRNA dalam mengatur gen target yang terlibat dalam hipertensi arteri, aterosklerosis, dan diabetes mellitus yang berpengaruh terhadap kejadian SI, dimana gen target mampu memediasi proses reaksi inflamasi, stres oksidatif, proliferasi sel, dan apoptosis (Bulygin et al., 2020; Hussein & Magdy, 2021; Ma et al., 2019).

MicroRNA/miRNA adalah molekul yang disebutkan terlibat dalam modulasi faktor risiko stroke (Hussein & Magdy, 2021). Mereka adalah molekul RNA *non-coding* kecil yang terdiri dari 22 nukleotida panjangnya, disebutkan bertindak sebagai regulator pasca transkripsi ekspresi gen dalam sel mamalia (Cao et al., 2016). MiRNA dapat memodulasi "pemasangan basa ke urutan komplementer" dalam *messenger RNA* (mRNA), yang secara khusus mengarah pada penurunan aktivitas gen melalui "represi translasi". Molekul-molekul ini terlibat dalam proses biologis yang paling mendasar yaitu, kontrol siklus sel, metabolisme sel, apoptosis, dan respon imun. Prevalensi SI cukup tinggi menunjukkan bahwa profesional medis perlu mengidentifikasi tanda-tanda awal faktor risiko untuk memilih modalitas terapi segera terhadap proses penyakit yang mengarah ke stroke. Selain itu, strategi ini secara kebetulan bermanfaat untuk memilih modalitas terapi yang sesuai untuk mengobati stroke melalui patofisiologi SI (Bulygin et al., 2020).

Studi sebelumnya menggambarkan beberapa miRNA penting yang memainkan peran kunci dalam hipertensi arteri sebagai salah satu faktor risiko stroke. Misalnya, miRNA-155, miRNA-125a/b-5p, miRNA-22, dan miRNA-487b dapat mengatur tekanan darah dan karenanya memengaruhi hasil klinis pasien selama terapi pada pasien SI. Beberapa miRNA dilaporkan terlibat dalam perkembangan awal hipertensi, yang dapat berguna untuk diagnosis dini dan menjadi prediktor risiko terhadap kejadian stroke (Friese et al., 2013; Kadir et al., 2022; D. Li et al., 2010). Sebuah laporan oleh Yang S. et al. (2015) menggambarkan biomarker yang dikaitkan dengan SI pada pasien diabetes tipe-2 (T2D). Menurut penelitian ini, hiperglikemia pada pasien T2D menginduksi aktivasi trombosit melalui

miRNA-144 dan miRNA-223 untuk mendorong “penurunan regulasi ekspresi IRS-1 dan peningkatan regulasi dalam ekspresi P2Y<sub>12</sub>” melalui pensinyalan IRS-1-PI3K-Akt. Oleh karena itu, kadar ekspresi miRNA-223 trombosit dan plasma yang rendah dan peningkatan ekspresi miRNA-144 trombosit dan plasma mungkin merupakan faktor risiko SI pada pasien T2D (S. Yang et al., 2016). Studi stroke diabetes menggunakan model mencit melaporkan bahwa kadar miRNA-145 yang rendah meningkatkan “efek neuroprotektif” melalui injeksi sel stroma sumsum tulang untuk meningkatkan hasil klinis selama SI (Bulygin et al., 2020; Cui et al., 2016; S. Yang et al., 2016).

Hiperglikemia dapat memengaruhi ekspresi miRNA otak setelah stroke. Temuan dari studi sebelumnya menggambarkan hubungan yang signifikan antara miRNA-Let7A, ASK-1 dan fungsi mikroglial pada stres oksidatif yang diinduksi hiperglikemia selama stroke; laporan ini menunjukkan kebutuhan untuk mengembangkan agen farmakologis untuk meningkatkan fungsi mikroglial melawan stroke iskemik (Bulygin et al., 2020; S. Yang et al., 2016).

Aterosklerosis adalah penyakit inflamasi asimtomatik dan penyebab signifikan stroke iskemik dan infark miokard. Ini dimulai dengan pembentukan plak aterosklerotik ketika kolesterol dengan LDL menumpuk pada endotelium, mendorong inflamasi yang terkait dengan SI. Pembentukan plak aterosklerotik diprakarsai oleh pembentukan lapisan lemak di mana lipid dan sel imun menumpuk pada tunika intima (Menet et al., 2018). Kondisi seperti hipertensi dan hiperkolesterolemia merupakan faktor risiko aterosklerosis karena menginduksi ekspresi VCAM-1, yang memungkinkan infiltrasi sel imun (monosit dan makrofag) di seluruh wilayah iskemik (Herrero-Fernandez et al., 2019). Lipoprotein densitas rendah (LDL) yang ada dalam lapisan lemak memediasi pembentukan inti nekrotik dari plak aterosklerotik. Perkembangan plak aterosklerotik dikaitkan dengan beberapa proses seperti proliferasi sel otot polos yang cepat/*vascular smooth muscle cells* (VSMC), inflamasi dan remodeling matriks ekstraseluler/*extracellular matrix* (ECM) (J. C. Wang & Bennett, 2012).

Untuk hal ini terdapat beberapa miRNA juga yang telah diketahui terlibat dalam proses ini. Misalnya overekspresi miRNA-92a menyebabkan gangguan angiogenesis selama aterosklerosis dan meningkatkan manifestasi stroke iskemik (Shoeibi, 2020). Blokade miRNA-92a menggunakan antagomir dapat mendorong pemulihan neovaskularisasi di seluruh jaringan yang rusak secara *in vivo* dan *in vitro*, yang menunjukkan kemungkinan sebagai modalitas terapi yang berharga terhadap penyakit iskemik (Bulygin et al., 2020; Shoeibi, 2020). Penekanan miRNA-320a yang menargetkan faktor respons serum dapat memediasi pensinyalan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) untuk meningkatkan sintesis pembuluh darah selama stroke yang diinduksi aterosklerosis (Shoeibi, 2020). MiRNA-143/145 dapat menargetkan *ATP binding cassette transporter 1* (ABCA1), sedangkan miRNA-92a dapat menargetkan *Kruppel-like transcription factor* yang memodulasi gen *shear stress*, memberikan efek perlindungan lain pada fisiologi pembuluh darah selama aterosklerosis (Shoeibi, 2020). MiRNA-145 sangat penting untuk pemrograman *vascular smooth muscle cell* (VSMC) yang dimediasi *miokardin*. MiRNA ini mampu menginduksi diferensiasi sel punca *neural crest multipoten* untuk menghasilkan otot polos vaskular (Shoeibi, 2020). MiRNA-145 mendorong diferensiasi VSMC dengan meningkatkan protein *Myocd* disamping itu miRNA-143 dan miRNA-145 secara kooperatif menargetkan *Klf4* (*Kruppel like factor 4*), *miokardin*, dan *Elk-1* untuk memengaruhi perkembangan VSMC (Bulygin et al., 2020; Shoeibi, 2020).

*Oxidized-LDL* dapat mengaktifkan sel dendritik dan meningkatkan respon inflamasi pada aterosklerosis. Salah satu miRNA yang terlibat dalam proses ini yaitu miRNA-181a. Ekspresi miRNA-181a ditekan dalam monosit pasien obesitas. Pengobatan dengan prekursor miRNA-181a dapat mengurangi inflamasi oksidatif terkait LDL dalam sel dendritik yang diturunkan dari sumsum tulang melalui penargetan gen respon awal *c-Fos* (Shoeibi, 2020). Selain itu, miRNA-155 terlibat dalam memediasi aterogenesis melalui inflamasi dengan menargetkan faktor transkripsi anti-inflamasi ETS1 dan *reseptor angiotensin II tipe 1* (AT1r) dalam sel endotel

manusia. Kadar MiRNA-155 yang rendah pada tikus hiperlipidemia dapat memfasilitasi perkembangan aterosklerosis melalui penargetan reseptor *colony stimulating factor 1* (CSF) atau *mitogen-activated protein* (MAP) *kinase*. MiRNA-155 spesifik makrofag telah terbukti menurunkan tingkat protein terkait Fas, dan faktor inflamasi lainnya seperti TNF- $\alpha$  dengan menargetkan *calcium regulated heat stable protein 1* (CARHSP1) (Shoeibi, 2020; Zhu et al., 2013). Selanjutnya, miRNA-155 dapat menargetkan NF- $\kappa$ B karena faktor transkripsi ini mengatur transkripsi miRNA-155 dalam feedback umpan balik. MiRNA-155 diregulasi dalam makrofag manusia yang “terstimulasi LDL”; penghambatan miRNA-155 mengarah ke serapan lipid dan respon inflamasi yang lebih tinggi selama aterosklerosis yang dapat mengakibatkan risiko stroke iskemik (M. Park et al., 2019). MiRNA-155 juga mendorong aterosklerosis dengan menekan aktivitas faktor anti-inflamasi, "*protein HMG1*", "*protein B cell limfoma 6 (Bcl-6)*", dan "*Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1)*". Studi-studi ini menyarankan perlunya mengembangkan agen farmakologis baru untuk mengganggu aktivitas miRNA-155 untuk memblokir perkembangan aterosklerosis, sebuah faktor risiko untuk terjadinya SI (Bulygin et al., 2020; M. Park et al., 2019).

Selama beberapa dekade terakhir, fokus penelitian miRNA-21 terutama pada tumor. Karena aktivitas onkogeniknya, miRNA-21 telah diidentifikasi sebagai onco-mir. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa miRNA-21 berfungsi dalam modulasi berbagai proses yang berkaitan dengan penyakit kardiovaskular, termasuk perubahan fungsi *endothelial cell*/sel endotel (EC), *vascular smooth muscle cells*/sel otot polos pembuluh darah (VSMC), makrofag/sel busa, dan perubahan fungsi sel endotel (EC). Selain itu, ekspresi miRNA-21 yang diinduksi *shear stress* pada pembuluh darah mengurangi proses apoptosis dan meningkatkan fosforilasi *endothelial nitric oxide synthase* (ENOs) dengan menargetkan *phosphatase and tensin homolog* (PTEN). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Tang et al. (2017), miRNA-21 meningkatkan fluks autofagik dan mengurangi cedera sel endotel yang disebabkan oleh ox-LDL. Sebagian besar penelitian telah

menunjukkan bahwa miRNA-21 memiliki efek anti-apoptosis dan proliferasi pada sel otot polos vaskular (VSMCs) menciit. MiRNA-21 juga disebut sebagai mediator penting dalam patogenesis makrofag. Melalui dua mekanisme ini: memblokir aktivitas NF- $\kappa$ B dan mengurangi sekresi sitokin pro-inflamasi dengan berfokus pada *programmed cell death 4* (PDCD4). Penelitian dengan hasil "anti-inflamasi" ini tidak konsisten dengan laporan lain. Dalam model restenosis in-stent, miRNA-21 menyebabkan sekresi mediator pro-inflamasi dan menyebabkan inflamasi pembuluh darah (Caescu et al., 2015). Namun, masih diperdebatkan apakah miRNA-21 dapat meningkatkan fenotip makrofag M1 atau M2 (Canfrán-Duque et al., 2017; Gao et al., 2019; X. Li et al., 2018; Tang et al., 2017).

Aterosklerosis adalah respons dari proses inflamasi kronis, dimana inisiasi, propagasi, dan perkembangannya banyak dipengaruhi oleh monosit/makrofag. Sebelumnya diketahui bahwa kadar miRNA-21 sangat terkait dengan ox-LDL yang distimulasi oleh monosit pada darah tepi manusia. Pada penelitian sebelumnya ditemukan bahwa ekspresi miRNA-21 dipengaruhi secara signifikan oleh lesi aterosklerotik aorta tikus dan monosit sirkulasi pasien dengan penyakit jantung koroner dan beberapa penelitian lain mendukung temuan ini. Dalam perbandingan dengan arteri non-aterosklerotik, Raitoharju et al. (2011) menemukan bahwa plak aterosklerotik manusia terkait dengan tingginya kadar miRNA-21. Berdasarkan hal ini, muncul hipotesis bahwa miRNA-21 berperan sebagai pengatur penting dalam proses patologis pada aterosklerosis (Barwari et al., 2018; Raitoharju et al., 2011).

Akhir-akhir ini disamping pada lesi aterosklerosis banyak juga tulisan yang ditemukan terkait dengan miRNA-21 dan proses stroke iskemik. Menariknya, miRNA telah muncul sebagai mediator utama gen pasca transkripsional baik dalam aspek patogenik maupun patologis pada biologi stroke iskemik. Laporan terbaru menyatakan bahwa microRNA menjadi kandidat kuat untuk intervensi terapi aterosklerosis yang dimediasi microRNA (Hurst dan Lee, 2003). Sebuah penelitian baru-baru ini menyatakan bahwa miRNA-21 dan miRNA-24 dapat diidentifikasi sebagai

biomarker diagnostik pada iskemik serebral dan mungkin memiliki target terapi potensial untuk pengobatan cedera pasca-iskemik (Zhou dan Zhang, 2014a). Menariknya, salah satu penelitian menunjukkan bahwa miRNA-21 berperan dalam perkembangan stroke iskemik dan menunjukkan bahwa miRNA-21 mungkin merupakan biomarker diagnostik potensial atau target terapeutik untuk stroke iskemik (Xiang et al., 2017). Data studi lain mengungkap mekanisme baru lncRNA MEG3 sebagai ceRNA dengan menargetkan jalur pensinyalan miRNA-21/PDCD4 dalam mengatur kematian neuron iskemik, yang dapat membantu mengembangkan strategi baru untuk intervensi terapeutik pada stroke iskemik serebral (Yan et al., 2017; Panagal et al., 2019; Solly et al., 2019; Yu and Li, 2014).

Penelitian mengungkapkan peran penting miRNA-21 dalam proses patologis setelah cedera iskemik serebral dan menunjukkan potensi penggunaan miRNA-21 dalam diagnostik stroke sebagai biomarker plasma yang sensitif. MiRNA-21 mungkin memiliki efek antiapoptosis pada sel neuroblastoma N2A pasca *oxygen-glucose deprivation* (OGD) dan reoksigenasi (Zhou dan Zhang, 2014b). Sebuah studi oleh Yang et al. (2014), menunjukkan miRNA-21 berfungsi sebagai pelindung terhadap cedera miokard yang disebabkan oleh iskemik-reperfusi (I/R) dan/atau hipoksia-reperfusi (H/R) (Yang et al., 2014). Selama I/R dan H/R, overekspresi miRNA-21 meningkatkan aktivitas pensinyalan *Akt* melalui penekanan ekspresi *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) yang lebih lanjut menekan ekspresi caspase-3 dan menunjukkan bahwa miRNA-21 mungkin merupakan agen yang menjanjikan untuk pengobatan cedera miokard dan stroke yang disebabkan oleh I/R dan H/R (Yang et al., 2014). Telah diketahui bahwa pasien stroke dan subjek aterosklerosis menunjukkan kadar miRNA-21 yang jauh lebih tinggi dan dapat berfungsi sebagai biomarker baru untuk aterosklerosis dan stroke (Tsai et al., 2013). Kadar miRNA-21 lebih tinggi pada tikus Wister jantan yang dilakukan oklusi pada *Middle Cerebral Artery* (MCA) (Liu et al., 2013). Seperti yang kita ketahui bahwa miRNA-21 merupakan faktor antiapoptosis yang kuat pada

beberapa sistem biologis (Buller et al., 2010; Panagal et al., 2019; Solly et al., 2019; Yu dan Li, 2014).

Selain miRNA-21 yang banyak menjadi perhatian pada proses aterosklerosis, kelompok miRNA-221/222 juga berperan banyak aktif dalam proses aterosklerosis dengan menargetkan banyak molekul pengatur terkait inflamasi pada sel endotel manusia, termasuk faktor transkripsi ETS1 yang kondusif untuk aktivasi PGC-1 $\alpha$ , reseptor adiponektin 1, dan STAT-5. MiRNA-221/222 menargetkan protein seperti *kinesin-like protein 1, 2* (Kip1, Kip2), dan *c-kit* yang terlibat dalam promosi proliferasi VSMC (X. Liu et al., 2012). Namun, kadar miRNA-221/222 berkurang pada perkembangan plak lebih lanjut sehingga menurunnya miRNA-221/222 total dapat menyebabkan ruptur plak. Pemeriksaan kalsifikasi vaskular pada tikus menunjukkan bahwa *upregulasi* miRNA-221/222 dapat memperburuk kalsifikasi aorta dengan menginduksi perubahan ekspresi *ectonucleotide phosphodiesterase 1* (Enpp1) dan *Pit-1* (Mackenzie et al., 2014). Penelitian-penelitian ini menunjukkan peran kompleks miRNA dalam proses perkembangan aterosklerosis, faktor risiko utama untuk SI (Bulygin et al., 2020).

Pada penelitian lain dimana dilakukan oklusi pada MCA pada tikus yang diinjeksikan *miRNA-221 mimic* dibandingkan kontrol yang tanpa pemberian *miRNA-221 mimic* menunjukkan penurunan volume infark serebri dan defisit behaviour pada kelompok kasus. Lebih lanjut menunjukkan ekspresi sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ , MCP-1, VCAM-1, and IL-6) dan kemokin yang menurun. Hal ini menunjukkan bahwa miRNA-221 dapat menurunkan kerusakan otak pada stroke iskemik akut dengan mengambat respon proinflamasi dan menjadi target terapi yang potensial pada pasien stroke iskemik (Shan et al., 2021).

Disamping berbagai faktor risiko yang ada seperti yang telah disebutkan di atas, misalnya aterosklerosis yang juga merupakan proses inflamasi kronik pada iskemik serebral yang akut juga terjadi respon imun akut yang sangat memengaruhi proses patobiologi dan luaran stroke. Walaupun respon imun dimulai terjadi secara lokal pada pembuluh darah

yang tersumbat dan mengalami hipoperfusi serta parenkim otak yang iskemik, mediator inflamasi yang dihasilkan secara in situ menyebar ke seluruh organ secara sistemik. Proses ini pada awalnya menimbulkan respon inflamasi sistemik, kemudian diikuti dengan imunosupresi yang bertujuan meredam lingkungan proinflamasi yang berpotensi membahayakan (Anrather & Iadecola, 2016).

Pada core iskemik, yang secara klinis didefinisikan sebagai area dengan aliran darah otak regional <20%, proses kematian neuron akut terjadi dengan cepat, dalam beberapa menit hingga beberapa jam setelah oklusi, karena defisit energi yang mengakibatkan ketidakseimbangan ion intraseluler, kegagalan mitokondria, dan aktivasi protease intraseluler, lipase, dan ribonuklease yang menyebabkan kerusakan cepat elemen struktur seluler dan hilangnya integritas sel. Namun, di luar core iskemik, jaringan otak masih mendapat sebagian perfusi meskipun lajunya berkurang. Area ini, yang disebut sebagai penumbra iskemik, sering kali ditandai dengan penurunan laju perfusi, namun lebih besar dibandingkan pada core iskemik. Meskipun fungsi neuron penumbra terganggu, namun masih dapat diselamatkan jika aliran darah dipulihkan. Namun meskipun aliran darah pulih, neuron pada penumbra menghadapi tantangan besar terhadap kelangsungan hidupnya, seperti eksitotoksitas dan inflamasi. Eksitotoksitas terjadi akibat pelepasan neurotransmitter glutamat yang tidak terkontrol dari neuron yang mengalami depolarisasi. Aktivasi reseptor asam N-metil-D-aspartat dan  $\alpha$ -amino-3 hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionat yang dimediasi glutamat, diperkuat oleh aktivasi berkepanjangan kanal ion reseptor melastatin, menyebabkan masuknya kalsium ekstraseluler yang tidak terkontrol dan disregulasi homeostasis kalsium intraseluler yang menghasilkan pembentukan oksigen reaktif (ROS) dan spesies nitrogen, disfungsi mitokondria, aktivasi kaskade apoptosis, dan aktivasi poli (adenosin difosfatribosa) polimerase (Anrather & Iadecola, 2016).

Inflamasi yang diawali oleh stagnasi aliran darah, aktivasi leukosit intravaskular, dan pelepasan mediator proinflamasi dari endotel iskemik

dan parenkim otak, berpotensi meningkatkan cedera jaringan. Meskipun banyak aspek inflamasi bermanfaat dan ditujukan untuk memulihkan homeostatis jaringan, kerusakan tambahan akibat respons inflamasi akut berkontribusi terhadap kerusakan iskemik (Anrather dan Iadecola, 2016).

Pada stroke iskemik ini, terjadi pelepasan sitokin yang memainkan peran utama dalam meningkatkan regulasi ekspresi *cell adhesion molecules* (CAM) terutama peningkatan regulasi *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) pada core iskemik yang menyebabkan gangguan BBB dengan membantu peningkatan leukosit, yang pada gilirannya melepaskan sitokin. Gangguan BBB menyebabkan migrasi berbagai sel inflamasi seperti makrofag, *natural killer cells*, limfosit T, dan leukosit polimorfonuklear ke tempat iskemik. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa infiltrasi leukosit dan mikroglia meningkatkan sitokin dan beberapa penelitian telah melaporkan bahwa neuron dan glia juga memproduksi sitokin setelah iskemik otak. Namun pada cedera otak, ekspresi sitokin pro dan antiinflamasi mengalami peningkatan regulasi, namun peningkatan regulasi spasial dan temporal sangat bergantung pada jenis model iskemik yang digunakan. Tiga sitokin proinflamasi utama adalah *interleukin 1 $\beta$*  (IL-1 $\beta$ ), *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), dan *interleukin-6* (IL-6) yang memicu dan memperburuk respon inflamasi setelah stroke. Studi post-mortem menunjukkan bahwa sel TNF- $\alpha$  positif terlihat pada otak pasien stroke iskemik berat sejak 3 hari pasca stroke, dan tetap positif hingga 15 bulan (Jayaraj et al., 2019; Qin et al., 2022; X. Wang et al., 2009).

Kadar serum TNF- $\alpha$  meningkat dalam waktu 6 jam pasca stroke dan kadarnya dipertahankan selama 10 hari (L. Zeng et al., 2014). Demikian pula, kadar IL-1 $\beta$  meningkat di CSF dengan kadar puncak pada hari ke 2 dan 3 pasca stroke. Namun, beberapa penelitian menunjukkan tidak ada peningkatan kadar IL-1 $\beta$  dalam serum dan plasma, yang mungkin disebabkan oleh lokalisasi IL-1 $\beta$  di tempat inflamasi (Morancho et al., 2015). Interleukin-1 $\beta$  memediasi cedera otak iskemik, traumatik, dan eksitotoksik melalui aksinya pada neuron, glia, dan pembuluh darah. Mirip dengan TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ , kadar IL-6 meningkat pada CSF pasien stroke berat. Beberapa

penelitian melaporkan bahwa kadar IL-6 CSF meningkat dalam waktu 24 jam dan mencapai puncaknya pada hari ke 2 dan 4, sementara beberapa penelitian melaporkan mencapai puncaknya pada hari ke 3 dan 7 (Morancho et al., 2015). Namun, kadarnya tampaknya bergantung pada jenis dan tingkat keparahan stroke. Interleukin-1 $\beta$ , mediator penting neuroinflamasi, meningkatkan regulasi ekspresi IL-6. Oleh karena itu, pemberian antagonis reseptor IL-1 $\beta$ , seperti anakinra, menunjukkan perbaikan klinis yang baik dan penurunan jumlah neutrofil perifer dan kadar IL-6 (Y. Li et al., 2015). Sebaliknya, *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) dan IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi yang menghambat ekspresi sitokin proinflamasi sehingga mengurangi inflamasi setelah stroke iskemik. Agen pro dan antiinflamasi ini bertindak sebagai prediktor dan membantu prognosis cedera iskemik. Namun, sitokin lain juga berkontribusi terhadap kerusakan dan perbaikan otak, namun keseimbangan antara efek menguntungkan dan merugikan dari sitokin sangat bergantung pada status biokimia dan fisiologis otak (Jayaraj et al., 2019; Qin et al., 2022).

Para peneliti membayangkan modalitas terapi baru untuk memodulasi peran miRNA spesifik di atas pada proses aterosklerosis karena dapat memberikan hasil klinis yang efektif terhadap SI. Sejumlah penelitian telah menunjukkan perubahan simultan dalam tingkat miRNA, seperti miRNA-21, miRNA-27b, miRNA-130a, miRNA-210, dan miRNA-221, setelah ruptur plak di area lesi atau serum atau keduanya (Bai & Bian, 2022; Lu et al., 2018b). Hasil ini menunjukkan bahwa miRNA adalah biomarker potensial dari SI aterosklerotik. Sayangnya, sampai saat ini sebagian besar penelitian hanya melaporkan perubahan sinkron dalam tingkat beberapa miRNA pada ruptur plak tetapi gagal untuk menentukan urutan-urutan dan hubungan logis antara dua peristiwa ini. Oleh karena itu, kami tidak dapat menyamakan *upregulation* atau *downregulation* miRNAs ini dengan SI aterosklerotik yang akan segera terjadi. Para ilmuwan juga harus mengklarifikasi lebih lanjut miRNA mana yang ateroprotektif dan mana yang menyebabkan ruptur.

Meskipun telah diketahui beberapa miRNA dalam proses terjadinya SI namun lebih banyak bukti pasti diperlukan karena beberapa miRNA memiliki peran ganda dan terkadang kontradiktif. Dari sejumlah miRNA yang ada saat ini, miRNA 21, miRNA-221 dan miRNA-222 merupakan miRNA yang menarik perhatian karena sifatnya yang kadang memiliki peran kontradiktif pada proses aterosklerosis dan stroke iskemik.

Memang, terapi berbasis miRNA adalah hotspot pengembangan obat saat ini di berbagai bidang. Bagaimanapun, miRNA memainkan peran penting dalam inisiasi stroke iskemik aterosklerotik dan proses yang terjadi setelah cedera, seperti perubahan patologis pada neuron, penyelamatan zona penumbra dan perbaikan jaringan saraf selanjutnya. MiRNA memiliki potensi besar sebagai target terapeutik. Namun, hanya beberapa obat yang telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) hingga saat ini. Salah satu contohnya adalah Mipomersen Sodium, obat oligonukleotida antisense yang efektif menurunkan kadar LDL-C, apoB dan kolesterol total yang disetujui pada tahun 2013, dan telah terbukti efektif pada pasien dengan *homozigot familial hypercholesterolemia* (Bulygin et al., 2020). Terapi ini merupakan awal yang baik, tetapi masih jauh dari proses pengembangan miRNA mimik atau inhibitor yang secara khusus menargetkan protein yang penting untuk proses awal aterosklerosis dan ruptur plak. Banyak miRNA memiliki lebih dari satu target protein, dan setiap protein memiliki perannya sendiri dalam jaringan gen berbeda yang terlibat dalam beragam aktivitas sel. Situasi ini mau tidak mau menghasilkan efek samping dan menjadi hambatan untuk aplikasi klinis miRNA mimik atau inhibitor. MiRNA mewakili penanda bio potensial dari SI aterosklerotik di masa akan datang dan menjadi acuan bagi strategi terapi anti-miRNA untuk SI di kemudian hari (Bulygin et al., 2020; Jayaraj et al., 2019).

## **1.2 Rumusan Masalah**

Saat ini berbagai agen farmakologis telah digunakan dalam pengobatan SI namun diketahui hanya trombolisis intravena actylise dan thrombektomi mekanik yang memberikan respon pengobatan yang baik walaupun dibatasi dengan berbagai masalah seperti onset SI, ketersediaan

obat dan fasilitas serta indikasi dan kontraindikasi dari penggunaan obat tersebut. Sejumlah biomarker dapat memberikan prediksi respons terapi pada pengobatan SI sehingga diharapkan akan dapat memperbaiki morbiditas dan mortalitas penderita SI. Sejauh ini, penanda miRNA dalam serum untuk melihat faktor risiko dan perkembangan SI masih minim. Di Indonesia publikasi penelitian mengenai profil miRNA pada SI jumlahnya relatif masih terbatas. Mengingat potensi peran miRNA yang dapat memprediksi perkembangan faktor risiko SI dan proses SI itu sendiri, maka perlu dilakukan penelitian terhadap ekspresi miRNA -21, miRNA-221 dan miRNA-222 pada pasien SI.

Berdasarkan latar belakang diatas dapat ditarik rumusan masalah bagaimana ekspresi microRNA-21 dan microRNA-221-222 terhadap sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) dan antiinflamasi (IL-10) dan perubahan derajat klinis serta luaran klinis pada pasien stroke iskemik?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan umum**

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis ekspresi microRNA-21 dan microRNA-221-222 terhadap sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) dan antiinflamasi (IL-10) dan perubahan derajat klinis serta luaran klinis pada pasien stroke iskemik.

#### **1.3.2 Tujuan khusus**

- a. Membandingkan ekspresi miRNA-21 pada subjek stroke iskemik (kasus) dengan subjek sehat (kontrol).
- b. Menganalisis hubungan ekspresi miRNA-21 dengan sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) serum subjek stroke iskemik (kasus).
- c. Menganalisis hubungan ekspresi miRNA-21 dengan sitokin antiinflamasi (IL-10) serum subjek stroke iskemik (kasus).
- d. Menganalisis hubungan ekspresi miRNA-21 dengan perubahan derajat klinis dan luaran klinis subjek stroke iskemik (kasus).
- e. Membandingkan ekspresi miRNA-221/222 pada subjek stroke iskemik (kasus) dengan subjek sehat (kontrol).

- f. Menganalisis hubungan ekspresi miRNA-221/222 dengan sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) serum subjek stroke iskemik (kasus).
- g. Menganalisis hubungan ekspresi miRNA-21/222 dengan sitokin antiinflamasi (IL-10) serum subjek stroke iskemik (kasus).
- h. Menganalisis hubungan ekspresi miRNA-21/222 dengan perubahan derajat klinis dan luaran klinis subjek stroke iskemik (kasus).

#### **1.4 Hipotesis Penelitian**

1. Adanya hubungan antara peningkatan ekspresi miRNA-21 dan miRNA-221/222 dengan variabel-variabel klinikopatologi pada subjek stroke iskemik.
2. Adanya perbedaan tingkat ekspresi miRNA-21 dan miRNA-221/222 pada tiap tingkatan/derajat variabel-variabel klinikopatologi pada penderita/pasien stroke iskemik.
3. MiRNA-21 dan miRNA-221/222 dapat dipergunakan sebagai prediktor terhadap kejadian stroke iskemik di masa yang akan dan tingkat/derajat dari variabel-variabel klinikopatologi pada penderita/pasien stroke iskemik.

#### **1.5 Manfaat Penelitian**

##### **1.5.1. Manfaat akademik**

Hasil penelitian akan menambah pengetahuan tentang peran miRNA-21 dan miRNA-221/222 dalam pengendalian faktor risiko, pencegahan dan terapi stroke iskemik untuk menurunkan angka morbiditas dan mortalitas. Kadar ekspresi miRNA yang terdeteksi berkaitan dengan perbedaan derajat variabel klinikopatologi akan menjadi sumbangan pengetahuan yang berharga bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan penerapannya termasuk penyusunan model baru prediktor terhadap kejadian stroke iskemik di masa yang akan datang. Penelusuran jalur sinyal biologis yang dipengaruhi oleh miRNA dalam patobiologi stroke iskemik dapat menjadi dasar penelitian biomolekular selanjutnya.

### **1.5.2. Manfaat layanan kesehatan**

Dengan mengetahui ekspresi miRNA yang berkaitan dengan kejadian stroke iskemik, diharapkan dapat berperan dalam penentuan keputusan kebijakan terutama dalam pengendalian faktor risiko stroke iskemik. Hasil penelitian dapat dijadikan tambahan acuan untuk menjelaskan manfaat dan risiko dalam pengendalian faktor risiko stroke, prediktor insiden stroke iskemik di masa yang akan datang dan berat ringannya bila terjadi stroke iskemik dalam suatu populasi.

### **1.6 Kebaruan**

Pada penelitian ini menggunakan ekspresi miRNA-21 dan miRNA-221/222 secara bersama sebagai prediktor terhadap perbedaan derajat klinis dan luaran klinis pada pasien stroke iskemik. Analisis yang menghubungkan dengan sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ ) dan antiinflamasi (IL-10) serta derajat klinis dan luaran klinis adalah hal yang baru dan pertama kali dilakukan untuk pasien stroke iskemik. Penggunaan serum dan pemeriksaan fisik akan memudahkan pemeriksaan tindak lanjut penderita karena tidak invasif sehingga dapat dilakukan secara serial dan berulang dalam rentang waktu tertentu.

## **BAB II TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Stroke Iskemik**

#### **2.1.1 Definisi dan epidemiologi stroke**

Stroke menurut *World Health Organization* (WHO) adalah suatu kondisi dimana ditemukan defisit neurologik yang diakibatkan oleh cedera fokal akut pada susunan saraf sentral yang disebabkan oleh masalah vaskular termasuk di dalamnya infark serebral, perdarahan intraserebral, dan perdarahan subarakhnoid (Coupland et al., 2017; Sacco et al., 2013).

Infark susunan saraf pusat didefinisikan sebagai infark yang tidak hanya pada serebral saja tetapi juga bisa pada medulla spinalis dan pada sel retina akibat dari iskemik. Hal ini didasari oleh kondisi patologis, imajing atau bukti objektif lainnya adanya cedera pada serebral, medulla spinalis atau cedera iskemik fokal pada retina berdasarkan distribusi vaskular atau adanya bukti gejala yang menetap lebih atau sama dengan 24 jam atau berakhir dengan kematian yang disebabkan oleh cedera pada serebral, medulla spinalis atau retina (Coupland et al., 2017; Sacco et al., 2013).

Prevalensi stroke diperkirakan berbeda dalam setiap penelitian karena adanya perbedaan pada sampel dan populasi namun diperkirakan di USA pada populasi yang berusia lebih dari 20 tahun sekitar 7,6 juta yang telah mengalami stroke berdasarkan data tahun 2018. Prevalensi ini meningkat pada kedua jenis kelamin baik laki-laki maupun perempuan (Bulygin et al., 2020; GBD 2019 Stroke Collaborators et al., 2021; Tsao et al., 2022).

Prevalensi global dari keseluruhan tipe stroke sekitar 89.13 juta kasus, dengan peningkatan sekitar 2,17% dari tahun 2010 ke 2020. Prevalensi tertinggi di Afrika Sub Sahara, USA bagian tenggara dan timur serta Asia Tenggara. Terkhusus untuk stroke iskemik tertinggi di USA dan Afrika Sub Sahara (Ekker et al., 2018; GBD 2019 Stroke Collaborators et al., 2021; Tsao et al., 2022).

Adapun insiden di USA setiap tahun diperkirakan sekitar 795.000 yang mengalami stroke serangan pertama dan berulang, sekitar 610.000 sebagai serangan pertama dan 185.000 akibat serangan ulangan. Dari keseluruhan stroke sekitar 85% yang mengalami stroke iskemik, 10% perdarahan intraserebral dan sekitar 3% yang mengalami perdarahan subarakhnoid rerata insiden tertinggi stroke pada penduduk Asia Timur sekitar 206,63 per 100.000 penduduk, diikuti Asia Tengah sekitar 200,48 per 100.000 penduduk dan Asia Tenggara sekitar 190,98 per 100.000 penduduk Insiden global dari stroke sekitar 11,71 juta dimana 7,59 juta mengalami stroke iskemik, 3,41 juta mengalami perdarahan intraserebral dan 0,71 juta mengalami perdarahan subarakhnoid (Egger et al., 2018; GBD 2019 Stroke Collaborators et al., 2021; Tsao et al., 2022).

Dari data tahun 2019 diperkirakan setiap 3 menit 0 detik, seorang meninggal karena stroke atau sekitar 1 kematian akibat stroke dari 19 kematian di USA. Secara global angka mortalitas akibat stroke sekitar 7,08 juta per tahun, namun hal ini mengalami penurunan sekitar 15,27% dari tahun 2010. Mortalitas tertinggi pada Asia Tengah, Asia Tenggara, Asia Timur, Oceania dan Afrika Sub Sahara. Dan akibat dari stroke iskemik, mortalitas sekitar 3,48 juta dan mengalami penurunan sekitar 13,31% dari tahun 2010 (Egger et al., 2018; Tsao et al., 2022).

### **2.1.2 Faktor-faktor risiko stroke iskemik**

Stroke iskemik (SI) adalah penyebab utama kematian dan dilaporkan lebih dari 6 juta kematian setiap tahun di seluruh dunia. Stroke iskemik terjadi karena gangguan suplai darah serebral, yang paling sering disebabkan oleh trombosis arteri/proses arteriosklerotik dan emboli. Di seluruh dunia, hampir 2 juta kasus SI telah dilaporkan pada orang dewasa muda per tahun. Selanjutnya, ada beberapa faktor risiko SI yang dilaporkan dari studi epidemiologi: faktor risiko utama SI adalah hipertensi, diseksi arteri, gaya hidup yang tidak tepat, pola diet, obesitas, foramen ovale paten, status sosial ekonomi,

penggunaan obat-obatan terlarang, diabetes mellitus, merokok, dan faktor hemostatik.

Evaluasi faktor risiko merupakan aspek penting untuk menguraikan subtipe spesifik SI karena prognosis, patogenesis, dan pengobatan bervariasi untuk subtipe yang berbeda. Selain itu, pemilihan strategi pencegahan yang cocok untuk memerangi SI sebagian besar didasarkan pada subtipe SI. Selama abad ke-21, insiden stroke berdasarkan usia telah meningkat pada orang dewasa muda. Orang dewasa yang lebih tua di seluruh dunia dipengaruhi oleh obesitas dan penuaan dan kejadian stroke di antara orang-orang obesitas ini dilaporkan meningkat menjadi 1,5 juta orang di seluruh Eropa pada tahun 2025 (Béjot et al., 2016).

Selain itu, pasien stroke memiliki risiko lebih tinggi untuk mengalami kelainan kognitif, demensia, penyakit Alzheimer, depresi, dan secara signifikan mengurangi kualitas hidup pasien. Oleh karena itu, modalitas terapi pasca stroke untuk mencapai pemulihan segera diperlukan untuk mengurangi efek stroke yang menghancurkan ini. Hipertensi arteri adalah salah satu faktor risiko yang signifikan untuk SI. Hal ini menurunkan elastisitas pembuluh darah lebih lanjut memfasilitasi pecahnya pembuluh darah, menyebabkan stroke hemoragik. Proses aterosklerotik menyebabkan stenosis arteri, pembentukan trombus, dan ruptur plak, yang semuanya dapat menyebabkan oklusi arteri yang mensuplai area otak tertentu, untuk mendorong terjadinya iskemik. Selanjutnya, hiperglikemia diabetik juga memperburuk kematian neuron dan memperburuk hasil klinis pada pasien SI.

Trombosis dan emboli mendorong efek merugikan seperti SI disertai dengan eksitotoksisitas, edema serebral dan gangguan sawar darah otak (BBB). Meskipun banyak pendekatan dan studi terapeutik, trombolisis masih merupakan pengobatan yang paling efektif untuk SI. Selain itu, cedera otak tidak terbatas pada zona core iskemik, karena neuron yang sekarat melepaskan faktor proapoptosis dan proinflamasi

ke parenkim otak yang berdekatan, yang menyebabkan kematian neuron di wilayah penumbra. Daerah penumbra iskemik dapat dilindungi dengan pengobatan tepat waktu menggunakan modalitas terapi yang dapat membatasi ukuran infark, menyelamatkan fungsi sel dan integritas struktural di daerah penumbra.

Selain iskemik, reperfusi menginduksi cedera otak melalui beberapa mekanisme termasuk inflamasi dan stres oksidatif. Cedera tipe iskemik pada substansia alba yang sementara berkembang ditandai dengan hilangnya akson pramielin pada substansia alba janin dan hilangnya fungsi akson yang dimediasi melalui reseptor NMDA neurotoksik, yang berkontribusi terhadap kejadian serebral palsy dan stroke. Proses inflamasi dimulai beberapa jam setelah cedera, ketika mikroglia dan neuron yang sekarat melepaskan molekul proinflamasi. Secara bersamaan, sel endotel mengekspresikan molekul adhesi sel termasuk molekul adhesi antar sel 1 (ICAM-1) dan VCAM-1. Perubahan ini biasanya mendorong migrasi transendotelial sel imun perifer terutama makrofag dan neutrofil ke daerah iskemik, yang selanjutnya mempotensiasi inflamasi dengan pelepasan molekul proinflamasi dan spesies oksigen reaktif (ROS) berikutnya. Defisit energi selama cedera otak menyebabkan kerusakan "pompa ion neuron", yang menyebabkan edema vaskular-seluler dan meningkatkan tekanan intrakranial. Selanjutnya, mitokondria yang rusak dalam sel otak melepaskan ROS, yang memediasi peroksidasi lipid, dan kerusakan asam nukleat. Semua faktor ini memperburuk kerusakan otak sekunder setelah stroke. Inflamasi dan stres oksidatif adalah peristiwa penting yang terlibat dalam mendorong kerusakan seluler dan molekuler selama serangan pasca-iskemik. Dalam proses ini memberikan dua peluang terapi prospektif untuk pencegahan kerusakan otak sekunder setelah stroke. Stroke pada fase awal stroke/fase akut diikuti oleh proses berikutnya berupa kerusakan seluler kronis yang kondusif untuk mitigasi dalam plastisitas dan regenerasi seluler. Berdasarkan fase-fase ini, intervensi terapeutik

saat ini lebih disukai untuk mempotensiasi kelangsungan hidup dan pemulihan neuron (Bulygin et al., 2020; G. Li et al., 2018).

## 2.2 MicroRNA/miRNA pada Stroke Iskemik

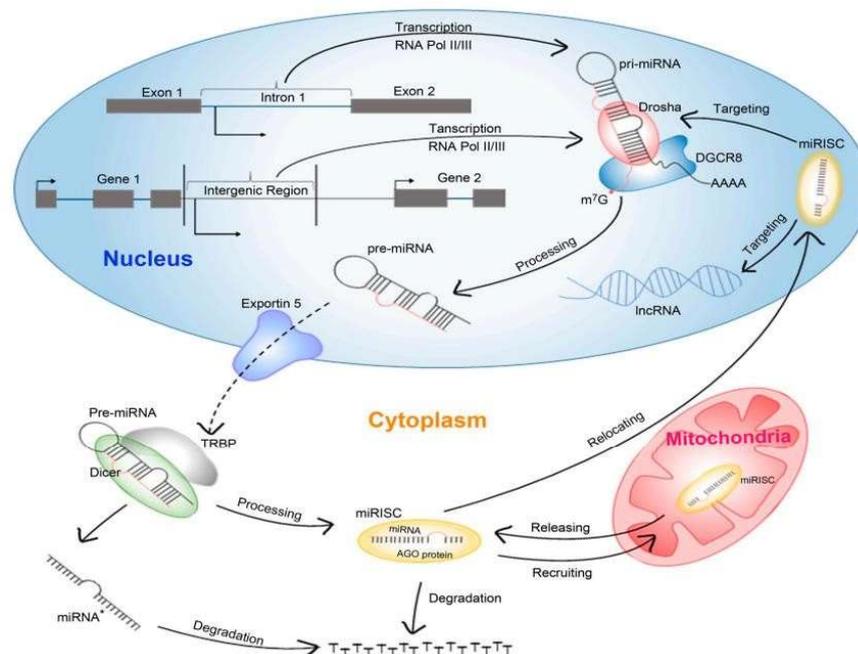
MicroRNA/miRNA adalah molekul yang dilaporkan dalam penelitian terlibat dalam modulasi faktor risiko stroke. Mereka adalah molekul RNA *non-coding* kecil yang terdiri dari 22 nukleotida panjangnya, disebutkan bertindak sebagai regulator pasca transkripsi ekspresi gen dalam sel mamalia. MiRNA dapat memodulasi "pemasangan basa ke urutan komplementer" dalam *messenger RNA* (mRNA), yang secara khusus mengarah pada penurunan aktivitas gen melalui "represi translasi". Molekul-molekul ini terlibat dalam proses biologis yang paling mendasar yaitu, kontrol siklus sel, metabolisme sel, apoptosis, dan respon imun. Prevalensi SI yang cukup tinggi menunjukkan bahwa profesional medis perlu mengidentifikasi tanda-tanda awal dan faktor risiko untuk memilih modalitas terapi segera terhadap proses penyakit yang mengarah ke stroke. Selain itu, strategi ini juga harus memberikan manfaat untuk memilih modalitas terapi yang sesuai untuk mengobati patofisiologi dari SI (Bulygin et al., 2020; G. Li et al., 2018).

### 2.2.1 Biogenesis dan fungsi miRNA

MiRNA adalah sekelompok RNA non koding kecil yang telah terbukti memodulasi ekspresi protein pada tingkat pasca-transkripsi. Sejak ditemukan pada *Caenorhabditis elegans* pada tahun 1993 (R. C. Lee et al., 1993), lebih dari 30.000 urutan miRNA unik telah ditemukan pada lebih dari 200 spesies yang telah diurutkan (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). Struktur miRNA, fungsi, biogenesis, dan mekanisme aksi telah dipelajari secara ekstensif selama dekade terakhir.

MiRNA ditranskripsi sebagai miRNA primer beruntai tunggal (pri-miRNA) yang panjangnya beberapa kilobase dan mengandung satu atau lebih struktur *stem-loop*, kemudian dibelah oleh *nuclear RNase III Drosha* (Y. Lee et al., 2003). Struktur *stem-loop* yang dibelah tersebut disebut *prekursor miRNA* (pra-miRNA), yang diekspor masuk

ke dalam sitosol oleh *Exportin-5*, diproses lebih lanjut oleh *RNase III* yang disebut *Dicer* untuk melepaskan dupleks miRNA, dan berikatan dengan *protein argonaute* (AGO). Untai dupleks yang kurang stabil akan dicerna, dan untai lainnya akan dilepaskan sebagai 18 to 22 nukleotida menjadi miRNA matang rantai panjang yang akan berikatan dengan *RNA-induced silencing complex* (RISC) di mana protein AGO adalah komponen penting dalam hal tersebut. *RISC complex* memandu miRNA matur untuk berikatan pada 3'UTR dari mRNA sitosol target. Adanya ikatan miRNA ini mencegah translasi atau mendorong degradasi mRNA (Gambar 2.1)(Winter et al., 2009).



**Gambar 2.1 Biogenesis dan aksi miRNA (Dikutip dari Cao, Li and Chan, 2016; Walayat, Yang and Xiao, 2019)**

Selain jalur biogenesis yang umum ini, biogenesis miRNA langsung ke Drosha- dan Dicer- juga telah dilaporkan. Transkripsi intermediet mewakili bentuk paling umum dari biogenesis independen Drosha dimana *pre-miRNA stem-loop* dihasilkan selama proses mRNA, tRNA, atau *small nucleolar RNA* (De Wit et al., 2009; Ender et al., 2008). Sangat jarang pre-miRNA dapat ditranskripsi secara langsung, dan dalam beberapa kasus, rangkaian pendek RNA dapat

diproses menyerupai pre-miRNA. Aktivitas Dicer diperlukan untuk melepaskan hampir semua miRNA yang diketahui, tetapi miRNA-451 adalah pengecualian. Drosha memproses pre-miRNA-451 menjadi stem-loop yang pendek untuk dikenali oleh Dicer, selanjutnya pre-miRNA-451 terikat langsung ke AGO2, Dimana aktifitasnya sebagai alat pemotong yang akhirnya menghasilkan miRNA-451 matur (Miyoshi et al., 2005).

Menariknya, miRNA terlibat dalam berbagai macam penyakit dan telah terbukti diperlukan untuk fungsi fisiologis yang tepat. Banyak keadaan patologis diketahui mengubah profil dan fungsi miRNA, dan memahami perubahan tersebut akan mengembangkan modalitas untuk memperbaikinya mungkin mengarah pada strategi terapi baru (Kinet et al., 2013). Itu bagian berikut membahas bukti eksperimental untuk miRNA yang terlibat dalam perkembangan penyakit, dan biomarker potensial untuk stroke iskemik dan patologi yang terkait (G. Li et al., 2018).

### **2.2.2 MiRNA dalam perkembangan otak: implikasi untuk stroke**

Pada otak mamalia, menunjukkan banyak miRNA dengan tingkat dan aktivitas yang sangat tinggi dengan wilayah ekspresi spesifik (Bak et al., 2008; Sempere et al., 2004). Studi menggunakan *Dicer* (RNAse penting untuk biogenesis miRNA) menunjukkan signifikansi fungsional yang sangat diperlukan dari miRNA dalam mengendalikan proses yang meliputi diferensiasi seluler, proliferasi, morfogenesis sinaptik, dan pembentukan pembuluh darah dan dengan demikian mengatur perkembangan otak (Schratt et al., 2006). MiRNA juga terbukti diekspresikan secara temporer dalam tahap perkembangan penting di otak mamalia (Miska et al., 2004; Sempere et al., 2004). Diketahui terdapat beberapa miRNA yang berperan dalam perkembangan otak yang juga diaktifkan setelah iskemik serebral, sehingga menunjukkan adanya tumpang tindih antara perkembangan otak dan cedera otak (Bulygin et al., 2020).

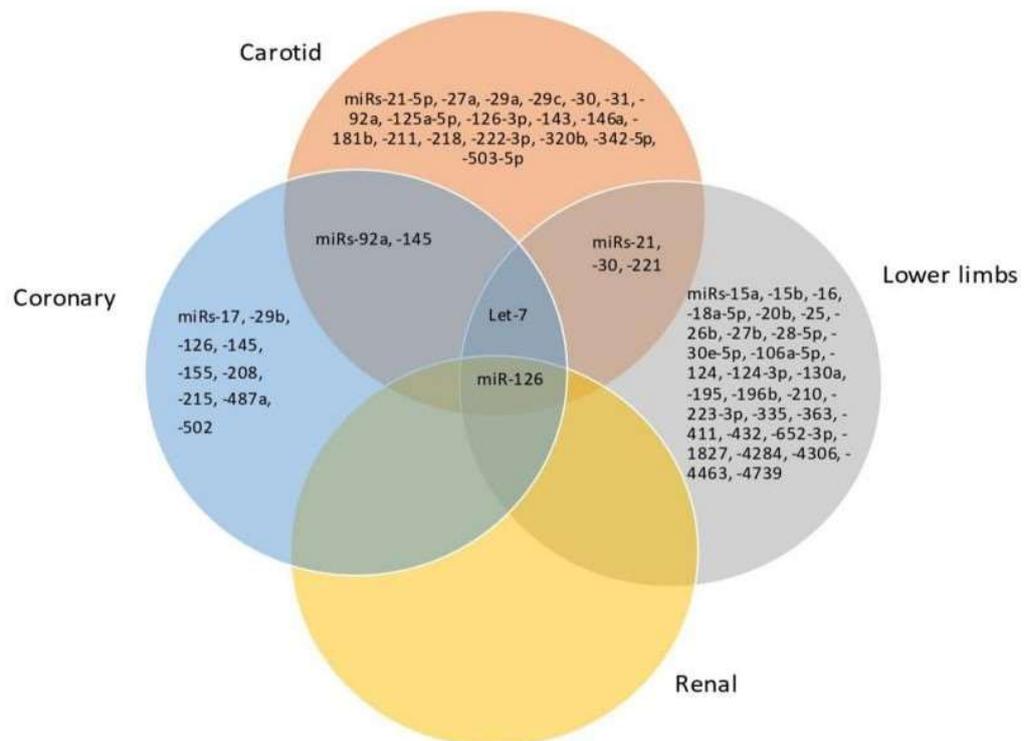
Kelompok miRNA-17-92 terlibat dalam mempertahankan populasi dari sel progenitor dan sel glial yang diatur oleh *regulating the proliferation-related genes phosphatase* dan *tensin homolog* dan *T-box brain protein 2*. Pada tikus dengan eksperimental stroke, kelompok miRNA-17-92 terbukti diregulasi dengan kuat dan mendorong proliferasi sel progenitor neuron (X. Liu et al., 2020). MiRNA-124 diketahui berpengaruh terhadap perjalanan hidup neuron sebagai akibat dari overekspresi dalam diferensiasi neuron (Smirnova et al., 2005).

Hambatan pada miRNA-124 akan mencegah perkembangan aksonal dan menyebabkan berkurangnya ukuran otak dan kelainan pada struktur neuroanatomi selama pengembangan. Pasca iskemik serebral terjadi perubahan kadar miRNA-124 yang berimplikasi dalam beragam kelainan proses seluler, termasuk inflamasi, edema, apoptosis, dan neurogenesis (Doeppner et al., 2015; G. Li et al., 2018). Pada ikan zebra, miRNA-142-3p memediasi integritas vaskular dan perkembangan angiogenesis dengan menekan *cadherin endotel vaskular*. Overekspresi dari miRNA-142-3p terbukti mengurangi integritas pembuluh darah dan menyebabkan perdarahan otak, sedangkan penghambatan miRNA-142-3p menyebabkan remodeling vaskular yang abnormal. Iskemik fokal terbukti meningkatkan kadar miRNA-142-3p pada mencit, menunjukkan bahwa miRNA-142-3p kemungkinan memainkan peran dalam remodeling neurovaskular pasca-iskemik (Lalwani et al., 2012; X. Liu et al., 2020).

Demikian pula, miRNA-126 juga merupakan mediator utama pertumbuhan dan perkembangan vaskular di otak dengan menargetkan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Fish et al., 2008). Studi pada mencit juga menunjukkan bahwa miRNA-126 menghambat VEGF dan neovaskularisasi retina setelah iskemik. Lebih lanjut, kadar miRNA-126 dalam sirkulasi diidentifikasi sebagai biomarker untuk stroke iskemik pada manusia (Bulygin et al., 2020; Fish et al., 2008).

### 2.2.3 MicroRNA/miRNA yang terlibat dalam komorbiditas stroke

Stroke dikaitkan dengan berbagai penyakit komorbid, terutama hipertensi, aterosklerosis dan diabetes. Hipertensi adalah faktor risiko utama untuk stroke karena menurunkan elastisitas pembuluh darah dan karenanya berpotensi menyebabkan ruptur, menyebabkan stroke hemoragik (GBD 2019 Stroke Collaborators et al., 2021; Hasan et al., 2011). Perkembangan aterosklerotik menyebabkan stenosis arteri, pembentukan trombus dan potensi ruptur pada plak, yang semuanya merupakan etiologi umum stroke pada manusia. Diabetes memiliki beberapa fenotipe, tetapi hiperglikemia pada pasien diabetes tertentu memperburuk kematian neuron dan memperburuk hasil pasca-iskemik. MiRNA diketahui memodulasi semua faktor risiko stroke ini (Bulygin et al., 2020; Feinberg & Moore, 2016).



**Gambar 2.2** Diagram Venn yang menunjukkan hubungan jenis miRNA dengan berbagai area penyakit pembuluh darah (arteri karotis, arteri koroner, arteri renalis dan arteri pada tungkai) (Dikutip dari Teixeira et al., 2022)

### 2.2.3.1 MicroRNA/miRNA dan hipertensi dalam kaitannya dengan stroke

Pada aorta tikus yang mengalami hipertensi spontan, kadar miRNA-155 terbukti berkorelasi negatif dengan tekanan darah. Kadar miRNA-155 pada sel mononuklear darah perifer dilaporkan lebih rendah pada pasien hipertensi stadium 1 (Ceolotto et al., 2011). Selanjutnya, *endothelial nitric oxide (NO) synthase* dan *Angiotensin II type 1 receptor (AT1R)* diamati sebagai target miR-155, menunjukkan perannya dalam vasorelaksasi dan *renin-angiotensin system* (W. Sun et al., 2021a). Jadi, miRNA-155 tampaknya merupakan miRNA penting yang mungkin memodulasi kejadian stroke dengan mengontrol tekanan darah. Beberapa miRNA lainnya, termasuk miRNA-125a/b-5p, miRNA-22, dan miRNA-487b, juga terbukti mengendalikan tekanan darah. MiRNA-125a/b-5p menargetkan endotelin-1 (vasokonstriktor kuat) pada sel endotel pembuluh darah (G. Li et al., 2018), dan miRNA-22 menargetkan chromogranin A, yang meningkatkan catestatin yang pada gilirannya mengatur tekanan darah (Friese et al., 2013). Untuk mendukung peran miRNA-22, sebuah penelitian menunjukkan bahwa ketika tikus yang mengalami hipertensi diobati dengan antagomiR-22, maka akan terjadi penurunan tekanan darah. Lebih lanjut miRNA-487b mengalami peningkatan pada aorta tikus Sprague-Dawley yang hipertensi yang diinduksi angiotensin II dan dikaitkan dengan penurunan *antiapoptotic insulin receptor substrate 1*, yang menyebabkan kerusakan fibroblast adventisia aorta. Selanjutnya, sekuensing miRNA nanostring mengidentifikasi 24 miRNA yang diekspresikan secara berbeda pada batang otak pada tikus yang mengalami hipertensi dan pada tikus yang normotensi, dan pengurutan dalam mengidentifikasi 30 miRNA yang mengalami *upregulasi* pada sel endotel mikrovaskular manusia yang diduga memiliki peran dalam hipertensi (Bulygin et al., 2020; G. Li et al., 2018).

### 2.2.3.2 MicroRNA/miRNA dan diabetes dalam kaitannya dengan stroke

Diabetes adalah kondisi komorbiditas utama untuk stroke pada manusia, dimana terjadi peningkatan glukosa dalam darah yang dapat menyebabkan penumpukan plak dan pembentukan trombus, yang berpotensi memicu stroke (Tsao et al., 2023). Patologi vaskular yang diinduksi diabetes dapat meningkatkan permeabilitas vaskular untuk mendorong SI. Hasil pasca stroke yang lebih buruk dilaporkan pada tikus model stroke diabetes ditandai dengan adanya kerusakan pada substansia alba dan akson. Peningkatan kadar glukosa darah selama diabetes dapat berkontribusi pada perkembangan disfungsi endotel dengan memengaruhi pembentukan plak aterosklerotik yang dapat menyebabkan stenosis arteri serebral, faktor risiko lain untuk stroke (Bulygin et al., 2020). Sebuah studi baru-baru ini menunjukkan bahwa pada penderita diabetes tipe 2 yang mengalami stroke, terdapat penurunan secara signifikan kadar miRNA-223 dan peningkatan kadar miRNA-144 (S. Yang et al., 2016). Dalam trombosit pasien diabetes, miRNA-223 dan miRNA-146a mengalami penurunan setelah stroke (G. Li et al., 2018).

Pada tikus dengan diabetes yang diinduksi streptozotocin yang mengalami iskemik fokal sementara, dengan pemberian *bone-marrow stromal cells* (BMSCs) dari tikus diabetes dilaporkan lebih neuroprotektif daripada BMSC dari tikus non-diabetes. Injeksi IV BMSC yang berasal dari tikus normal dapat menginduksi angiogenesis, neurogenesis, dan arteriogenesis diikuti oleh stabilisasi vaskular untuk meningkatkan fungsi saraf setelah stroke pada pasien tanpa diabetes (Bulygin et al., 2020). BMSC memiliki fungsi yang signifikan dalam memfasilitasi migrasi dan stimulasi pelepasan faktor trofik dari parenkim otak pada seluruh wilayah iskemik jaringan otak yang cedera (Bulygin et al., 2020). Hiperglikemia juga dapat memengaruhi miRNA otak tanpa adanya stroke iskemik. Misalnya, let-7a terbukti terlibat dalam metabolisme glukosa dengan menekan

sinyal apoptosis yang mengatur kinase 1 pada mikroglia (Song et al., 2017). Studi lain mengidentifikasi penurunan regulasi miRNA-200a/b dan miRNA-466a/d-3p pada *neural stem cells* tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin (G. Li et al., 2018; Shyamasundar et al., 2013).

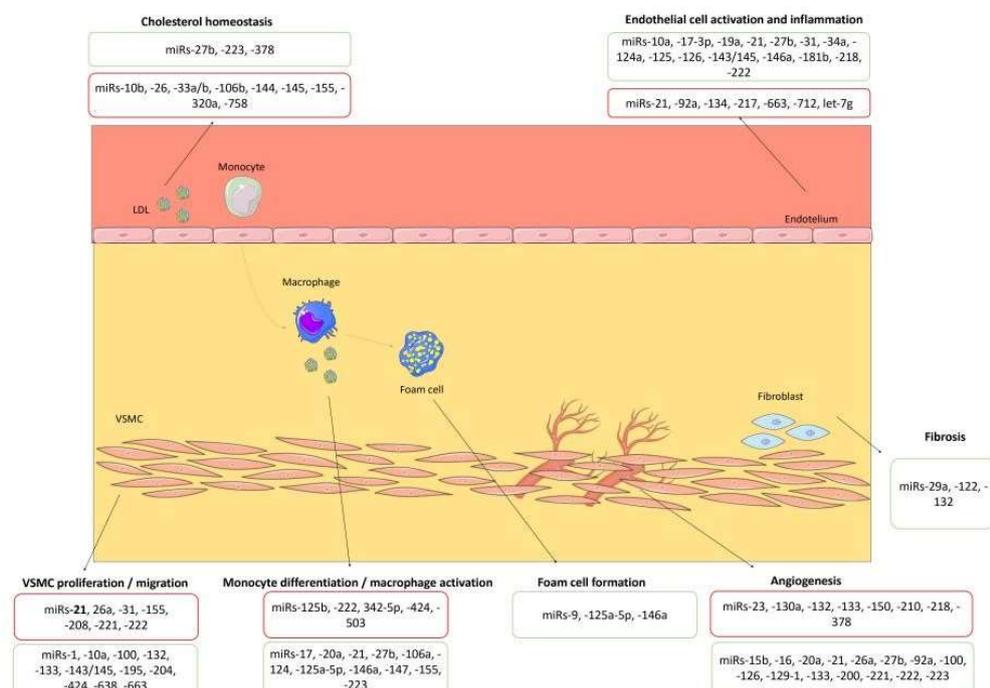
### 2.2.3.3 MicroRNA/miRNA yang terlibat dalam aterosklerosis

Aterosklerosis adalah penyakit inflamasi asimtomatik dan penyebab signifikan infark miokard dan SI. Hal ini dimulai dengan pembentukan plak aterosklerotik ketika kolesterol dan *low-density lipoprotein* (LDL) menumpuk pada endotelium, mendorong inflamasi yang terkait dengan SI. Pembentukan plak aterosklerotik diprakarsai oleh pembentukan lapisan lemak dimana lipid dan sel imun menumpuk pada tunika intima. Kondisi seperti hipertensi dan hiperkolesterolemia merupakan faktor risiko aterosklerosis karena menginduksi ekspresi VCAM-1 yang memungkinkan infiltrasi sel imun (monosit dan makrofag) pada seluruh area iskemik. LDL yang ada dalam lapisan lemak memediasi pembentukan inti nekrotik dari plak aterosklerotik. Perkembangan plak aterosklerotik dikaitkan dengan beberapa proses seperti proliferasi sel otot polos/*smooth muscle cell* (SMC) yang cepat, inflamasi dan remodeling matriks ekstraseluler/*extracellular matrix* (ECM)(Teixeira et al., 2022).

Aterosklerosis dikaitkan dengan perubahan miRNA pada dinding pembuluh darah, serum, dan sel imun, menunjukkan peran mereka dalam perkembangan aterosklerotik (Q. Jiang et al., 2021b; G. Li et al., 2018). Penurunan regulasi dari beberapa miRNA, seperti miRNA-320a (menargetkan serum faktor respons yang diperlukan untuk pensinyalan VEGF), miRNA-143/145 (menargetkan *ATP binding cassette transporter 1* (ABCA1)) dan miRNA-92a (menargetkan *Kruppel-like factor 2* yang memodulasi gen *shear stress*) serta melindungi pembuluh darah pada aterosklerosis (Q. Jiang et al., 2021a; G. Li et al., 2018).

Overekspresi miRNA-92a akan menyebabkan gangguan angiogenesis selama aterosklerosis dan meningkatkan manifestasi stroke iskemik. Blokade miRNA-92a menggunakan antagomir dapat membantu pemulihan neovaskularisasi pada seluruh jaringan yang rusak baik secara vivo dan in vitro, yang menunjukkan kemungkinan menjadi modalitas terapi yang berguna pada stroke iskemik. MiRNA-143/145 dapat menargetkan *ATP binding cassette transporter 1* (ABCA1), sedangkan miRNA-92a dapat menargetkan *Kruppel-like transcription factor* yang memodulasi gen *shear stress*, memberikan efek perlindungan lain pada fisiologi pembuluh darah selama aterosklerosis (Bonauer et al., 2009). MiRNA-145 sangat penting untuk pemrograman *vascular smooth muscle cell* (VSMC) yang dimediasi miokardin. MiRNA ini mampu menginduksi diferensiasi sel punca *neural crest* multipoten untuk menghasilkan otot polos vaskular (Cordes et al., 2009). Misalnya, miRNA-145 mendorong diferensiasi VSMC dengan meningkatkan protein Myocd sementara miRNA-143 dan miRNA-145 secara kooperatif menargetkan Klf4 (*Kruppel like factor 4*), miokardin, dan Elk-1 untuk menentukan nasib VSMC (Cordes et al., 2009). MiRNA-181a mengalami penurunan regulasi dalam monosit pasien obesitas, dan pengobatan dengan prekursor miRNA-181a akan mengurangi *oxidized low-density lipoprotein* yang memediasi inflamasi pada *bone marrow-derived dendritic cells* dengan menargetkan *c-Fos* (Bulygin et al., 2020). Selanjutnya, miRNA-155 terlibat dalam perkembangan inflamasi terkait dengan aterogenesis, dan terbukti ateroprotektif dengan menargetkan *pro-inflammatory transcription factor Ets1* dan AT1R pada sel endotel manusia (Ceolotto et al., 2011). Penurunan kadar miRNA-155 pada tikus hiperlipidemia menunjukkan peningkatan pada proses perkembangan aterosklerosis, kemungkinan menargetkan reseptor *colony stimulating factor 1* (CSF) *receptor* atau *MAP kinases* (G. Zhu et al., 2013).

MiRNA-155 yang spesifik dalam makrofag terbukti menurunkan *Fas-associated death domain-containing protein* yang diketahui sebagai faktor inflamasi yang menyerupai *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ), dengan menargetkan *calcium-regulated heat stable protein 1* (Li et al., 2016). Selanjutnya *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B), yang merupakan target miRNA-155, mengontrol transkripsi miRNA-155 dalam *feedback loop* (Wu et al., 2014). Pada makrofag manusia, LDL yang teroksidasi merangsang peningkatan kadar miRNA-155 dan inhibisi miRNA-155 akan mengakibatkan pengambilan lipid yang buruk dan beban inflamasi (Huang et al., 2010a). Sebaliknya, beberapa penelitian juga melibatkan miRNA-155 dalam perkembangan aterosklerotik dengan menurunkan regulasi faktor anti-inflamasi *HMG 1*, protein *B-cell lymphoma-6* (*Bcl-6*), dan protein *suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS1) (G. Li et al., 2018; G. Zhu et al., 2013).



**Gambar 2.3** Aktivitas biologi dari beberapa miRNA yang terkait dengan patofisiologi stroke. MiRNA yang berifat proaterogenik (merah) dan ateroprotektif (hijau) (Dikutip dari Teixeira et al., 2022)

Dalam kultur sel endotel manusia, miRNA-221/222 ditunjukkan menargetkan banyak molekul pengontrol terkait *inflamasi*, termasuk *transcription factor Ets1*, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha*, *adiponectin receptor 1*, dan *signal transducer and activator of transcription 5A*, dan karenanya mungkin membantu mengendalikan aterosclerosis dan miRNA-221/222 menargetkan Kip1, Kip2 dan c-kit mempromosikan proliferasi sel otot polos pembuluh darah (VSMC) (X. Liu et al., 2009, 2012; Mackenzie et al., 2014). Secara klinis, kadar miRNA-221/222 terlihat semakin menurun pada lesi lanjut aterosclerosis, sehingga penurunan kadarnya dikaitkan dengan kejadian ruptur plak, dan penyelidikan praklinis kalsifikasi vaskular pada mencit menunjukkan bahwa *upregulasi* miRNA-221/222 dapat memperburuk kalsifikasi aorta (Mackenzie et al., 2014)(G. Li et al., 2018; Mackenzie et al., 2014). MiRNA-221/222 dapat menargetkan banyak molekul pengatur terkait inflamasi dalam sel endotel manusia, termasuk faktor transkripsi ETS1 yang kondusif untuk aktivasi PGC-1 $\alpha$ , reseptor adiponektin 1, dan STAT-5 (Bulygin et al., 2020).

#### **2.2.4 Sel-sel yang berkontribusi pada etiologi aterosclerosis**

Sel hepar memainkan peran penting dalam mengatur homeostasis lipoprotein dan mengontrol baik produksi dan eliminasi lipoprotein, termasuk mengantarkan lipid ke jaringan dengan LDL dan menghilangkan lipid dari jaringan dengan HDL. Gangguan homeostasis ini (seperti produksi berlebihan atau pengambilan lipid yang tidak mencukupi) adalah salah satu faktor utama yang menyebabkan hiperkolesterolemia, karena jumlah monosit meningkat 1,5 kali dan selanjutnya menyebabkan aterosclerosis (Q. Jiang et al., 2021b; Solly et al., 2019).

Makrofag adalah sel inflamasi utama yang berada pada lesi aterosklerotik. Setelah inisiasi inflamasi, mereka tertarik ke area lesi dan diaktifkan. Makrofag yang teraktivasi bersifat proinflamasi (fenotipe M1) atau antiinflamasi (fenotipe M2), bergantung pada sinyal

berbeda yang memulai dua program aktivasi yang berlawanan ini. Fenotipe M1 diinduksi oleh sitokin proinflamasi seperti lipopolisakarida (LPS), TNF- $\alpha$  dan interferon (IFN- $\gamma$ ) yang diproduksi oleh sel Th1, sedangkan penginduksi fenotipe M2 termasuk IL-4, IL-10, IL-13 dan *tumor growth factor* (TGF)- $\beta$  yang diproduksi oleh sel Th2. Predominan makrofag M1 yang berada pada lesi dikaitkan dengan perkembangan ateroma, sedangkan makrofag M2 memediasi regresi ateroma. Terlepas dari fenotipe M1 atau M2, akumulasi makrofag (sel busa) merupakan komponen dominan plak dan berhubungan dengan stabilitas plak (Q. Jiang et al., 2021a; Y. Jiang et al., 2022; Solly et al., 2019).

Sel endotel (EC) berfungsi sebagai tempat berlabuhnya monosit dan memainkan peran penting dalam memicu inflamasi. Dalam kondisi hiperlipidemia, EC (terutama sel yang terletak di area predileksi pembuluh darah yang terkena aliran darah yang terganggu) rentan terhadap cedera yang disebabkan oleh LDL teroksidasi. Akibat adanya gangguan aliran darah ini leukosit akan melepaskan TNF- $\alpha$  yang mengaktifkan sinyal kaskade yang pada akhirnya mengubah ekspresi gen dalam sel endotel. Perubahan ini menginisiasi proses inflamasi, mengaktifkan sel endotel, meningkatkan permeabilitas, dan meningkatkan regulasi molekul adhesi pada permukaan sel, yang memungkinkan leukosit untuk menempel pada endotel, memasuki matriks ekstraseluler di bawah endotel dan menginduksi respon inflamasi (Herrero-Fernandez et al., 2019; Q. Jiang et al., 2021a).

Sel otot polos pembuluh darah (VSMC) berasal dari beragam jenis sel yang berkontribusi pada pembentukan ateroma, seperti *collagen-releasing cells* dan *macrophage-like cells*. VSMC juga membentuk sel busa dengan mengekspresikan reseptor LDL ke lipid endositosis. Selain itu, VSMC memainkan peran penting dalam *inflamasi* dengan mengekspresikan molekul adhesi seperti VCAM-1 dan ICAM-1 yang memfasilitasi adhesi dan migrasi monosit. Sepanjang perkembangan aterosklerosis, terjadi proliferasi VSMC

sedangkan apoptosis, penuaan dan diferensiasi VSMC menjadi *macrophage-like cells*, seluruhnya berkontribusi pada aterosklerosis. Pada lesi lanjut, proliferasi VSMC memainkan peran penting dalam melindungi plak dari ruptur karena VSMC adalah komponen sel utama dari *fibrous cap*, dan *fibrous cap* yang lebih tebal menunjukkan plak yang lebih stabil (Q. Jiang et al., 2021a; Y. Jiang et al., 2022; J. C. Wang & Bennett, 2012).

### **2.3 Peran microRNA pada Kerusakan Otak Pasca Stroke**

Cedera iskemik/reperfusi serebral menginduksi kaskade patofisiologi yang kompleks yang mencakup berbagai proses seluler yang menyimpang. Dalam keadaan fase iskemik, berkurangnya suplai darah dengan cepat menyebabkan kegagalan gradien ionik, eksitotoksisitas dan kematian neuron. Suplai darah yang rendah selama peristiwa iskemik dapat menyebabkan gangguan gradien ion yang melintasi neuron, eksitotoksisitas, dan kematian neuron. Mekanisme rumit yang berkaitan dengan iskemik otak adalah proteolisis dan secara bersamaan memicu hilangnya transduksi sinyal kelangsungan hidup sel. Selanjutnya, iskemik menyebabkan kerusakan substansia alba dengan pelepasan cepat glutamat di neuron untuk memediasi masuknya *heavy calcium* melalui saluran kalsium ke dalam neuron diikuti oleh aktivasi berkelanjutan jalur apoptosis melalui *mu-calpain*, *calcineurin*, dan lipase (Xue et al., 2015).

Selama fase reperfusi, kembalinya oksigen berkontribusi dalam terbentuknya stres oksidatif, dan reperfusi aliran darah merangsang pengeluaran faktor-faktor inflamasi dan terjadinya edema, sehingga semakin meningkatkan kerentanan jaringan yang terdampak proses neurodegenerasi. Selama periode reperfusi, reoksigenasi menyebabkan stres oksidatif, inflamasi dan edema progresif. Peristiwa ini dapat memperburuk kerentanan jaringan otak yang terkena terhadap neurodegenerasi melalui mekanisme apoptosis. Tingkat ekspresi ratusan miRNA terbukti mengalami perubahan setelah iskemik fokal sementara sekitar 30 menit dan paling lambat 7 hari pasca reperfusi (Jenny et al., 2019; White et al., 2000). Sebagai contoh, iskemik fokal sementara pada tikus

jantan kondusif untuk ekspresi berlebih miRNA-19b, miRNA-290, dan miRNA-292-5p selama reperfusi. Namun, profil ekspresi miRNA-150, miRNA-195, dan miRNA-320 dilaporkan menurun pada tikus jantan ini setelah reperfusi. MicroRNA lain yaitu, rno-miRNA-206, miRNA-214, miRNA-223, miRNA-298, miRNA-327, dan miRNA-494 dilaporkan diekspresikan secara berlebihan selama periode iskemik/reperfusi pada model tikus. Pola ekspresi miRNA ini dapat dipakai sebagai biomarker diagnostik dan prognostik pada proses neuropatologi stroke terkait (Jeyaseelan et al., 2008; Martinez & Peplow, 2016). MiRNA-21-5p eksosomal, miRNA-30a-5p dilaporkan diekspresikan dalam model SI. Tingkat ekspresi eksosomal miRNA-422a dan miRNA-125b-2-3p secara signifikan menurun pada model stroke iskemik. MiRNA eksosomal dapat menjadi biomarker yang menjanjikan untuk mendiagnosis stroke iskemik dan memiliki nilai klinis untuk meningkatkan luaran klinis (W. Wang et al., 2018; X. Yu & Li, 2014).

### **2.3.1 MicroRNA dan eksitotoksisitas pasca-iskemik**

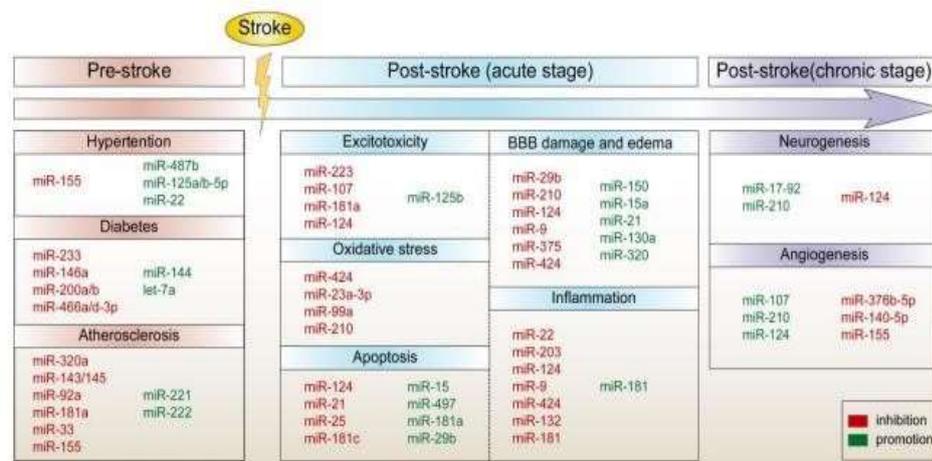
Selama iskemik, pelepasan glutamat yang berlebihan dan kegagalan transporter glutamat menyebabkan overaktivasi reseptor glutamat dan eksitotoksik kematian neuron (Paschen, 1996; Castillo et al., 2016). Di hipokampus, ekspresi miRNA-223 berlebih, terbukti menurunkan kadar reseptor glutamat 2 (GluR2) dan N subunit reseptor methyl-D-aspartate (NMDA)2B/(NR2B) dan mencegah kematian neuron mengikuti iskemik global sementara (Harraz et al., 2012). Selanjutnya dengan *knockout* miRNA-223 meningkatkan ekspresi NR2B dan GluR2, lebih lanjut merangsang arus postsinaptik, memperburuk defisit memori dan meningkatkan kematian neuron pada hipokampus (Harraz et al., 2012). Ekspresi miRNA-223 yang beredar terbukti meningkat setelah stroke pada hewan pengerat (Dharap et al., 2009) dan berhubungan positif dengan penurunan keparahan dan volume infark pada manusia setelah SI (Wang et al., 2014e). MiRNA-223 tampaknya mencegah eksitotoksisitas yang diinduksi iskemik, sebaliknya miRNA-125b terlibat dalam

memperburuk eksitotoksisitas dengan meningkatkan subunit reseptor NMDA NR2A (Edbauer et al., 2010). Kedua studi secara *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa peningkatan regulasi NR2A mempromosikan kematian neuron kortikal yang dimediasi NMDA (Morikawa et al., 1998; von Engelhardt et al., 2007).

Penghapusan cepat glutamat dari celah sinaptik diperlukan untuk mencegah eksitotoksisitas, dan ini dimediasi oleh transporter glutamat, seperti astrositik glutamat transporter 1 (GLT-1) (Raghavendra et al., 2000; Yeh et al., 2005). Korelasi antara peningkatan miRNA-107 dan penurunan level GLT-1 ditunjukkan setelah SI (Yang et al., 2014; Yang et al., 2015d). Pada sel neuron yang mengalami hipoksia, miRNA-107 akan mencegah downregulasi GLT-1, akumulasi glutamat dan apoptosis (Yang et al., 2014). Sebaliknya, studi *in vivo* menunjukkan bahwa penghambatan miRNA-107 memperburuk infark setelah iskemik fokal permanen pada mencit, menunjukkan bahwa miRNA-107 mungkin bersifat neuroprotektif (Li et al., 2015d). Namun, peran miRNA-107 setelah iskemik mungkin kompleks karena targetnya RNase Dicer, yang penting untuk pemrosesan miRNA (Li et al., 2015d). Eksosom yang mengangkut miRNA mungkin penting untuk mempertahankan neuronal-glia *cross-talk*, yang penting untuk mempertahankan homeostasis glutamat setelah iskemik (Lachenal et al., 2011).

Morel et al. (2013) menunjukkan bahwa miRNA-124a ditransfer dari neuron ke astrosit oleh eksosom meningkatkan kadar protein GLT-1, yang berpotensi dengan mekanisme tidak langsung. Injeksi antagomiRNA-124a ke otak tikus dewasa lebih lanjut terbukti mengurangi ekspresi GLT-1 dan serapan glutamat (Morel et al., 2013). *Upregulasi* miRNA-124 juga terbukti terkait dengan penurunan ekspresi berbagai reseptor dan subunit glutamat termasuk  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoxazole propionate (AMPA)<sub>2</sub>, AMPA<sub>3</sub> dan GluR<sub>2</sub>, menunjukkan tambahan miRNA-124 target yang terlibat dalam pensinyalan glutamat (Dutta et al., 2013; Ho et al., 2014). Namun,

peran miRNA-124a kontroversial karena beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa hal itu juga dapat melindungi otak setelah iskemik (Doepner et al., 2013; Sun et al., 2013; Zhu et al., 2014). Tingkat miRNA-124 setelah iskemik terbukti meningkat oleh Sun et al. (2013), sedangkan penelitian lain menunjukkan pengurangan substansial miRNA-124 mengikuti iskemik fokal pada tikus (Liu et al., 2011).



**Gambar 2.4 Proses iskemik serebral disertai dengan mekanisme patogen yang berkontribusi dalam kerusakan dan perbaikan pasca stroke iskemik serta miRNA yang terlibat (Dikutip dari Li et al., 2018)**

MiRNA-181a juga terbukti mengatur eksitotoksisitas dengan menargetkan reseptor glutamat dan transporter glutamat. *Upregulasi* miRNA-181a terbukti mengurangi ekspresi GluR2 dan frekuensi arus rangsang postsinaptik (Saba et al., 2012). Menariknya, level miRNA-181a terbukti meningkat pada inti tetapi menurun di area otak yang resisten terhadap cedera iskemik (penumbra setelah iskemik fokal) dan girus dentata hipokampus setelah iskemik global (Yuan et al., 2010; Ouyang et al., 2012b). Selanjutnya, dengan memblokir miRNA-181a terbukti melindungi otak dan meningkatkan hasil fungsional setelah iskemik (Ouyang et al., 2012b; Moon et al., 2013; Xu et al., 2015). MiRNA-181a juga terbukti menurunkan kadar GLT-1 (Moon et al., 2013). Peran miRNA dalam eksitotoksisitas pasca-iskemik ditunjukkan pada Gambar. 2.4 (Bulygin et al., 2020; G. Li et al., 2018).

### 2.3.2 MicroRNA dan stres oksidatif pasca stroke

Ketidakeimbangan antara produksi radikal bebas dan aktivitas antioksidan menyebabkan stres oksidatif, yang merupakan mekanisme patologis utama kerusakan otak sekunder setelah SI (Walder et al., 1997; Guldiken et al., 2009). Baik iskemik maupun reperfusi diketahui mempromosikan pembentukan ROS, yang meliputi superoksida anion, hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radikal hidroksil, oksigen singlet dan peroksinitrit (Abramov et al., 2007; Radak et al., 2014; Jung et al., 2015). Peningkatan kadar ROS dapat menyebabkan kerusakan pada neuron dan meningkatkan disfungsi mitokondria dengan aktivasi berurutan dari *calpain*, inflamasi, dan akhirnya kematian neuron. Faktor-faktor ini dapat memengaruhi volume infark setelah SI, sebagai faktor predisposisi SI (Warner et al., 2004; Chen et al., 2011b).

*Upregulasi* miRNA-424, miRNA-23a-3p dan miRNA-99a terbukti menurunkan stres oksidatif dan karenanya dapat melindungi otak setelah serangan iskemik (Zhao et al., 2014; Liu et al., 2015a; Tao et al., 2015b). Pengobatan dengan agomiR-424 mengurangi volume infark dan meningkatkan ekspresi faktor transkripsi *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2), yang dikenal sebagai anti-inflamasi/anti-oksidan dan neuroprotektif (Shih et al., 2005; Liu et al., 2015a). Terapi dengan AgomiR-424 juga meningkatkan ekspresi *Manganese Superoxide Dismutase* (Mn-SOD) dan mengurangi tingkat ROS. *In vitro*, efek perlindungan miRNA-424 terhadap stres oksidatif neuronal terbukti menurun oleh penurunan Nrf2 atau penghambatan SOD, mengkonfirmasi mekanisme aksi antioksidan miRNA-424 (Liu et al., 2015a).

Terapi dengan AgomiR-23a-3p juga menurunkan volume infark, meningkatkan Mn-SOD dan mengurangi kadar NO dan 3-nitrotirosin (3-NT) (Zhao et al., 2014). Secara *in vitro*, miRNA-23a-3p lebih lanjut terbukti mengurangi kematian sel yang diinduksi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan mengurangi produksi NO dan 3-NT dan mempromosikan aktivitas

SOD di sel neuron 2a (Zhao et al., 2014). *Upregulasi* miRNA-99a juga melindungi sel neuron-2a setelah pengobatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan mengurangi volume infark setelah SI (Tao et al., 2015b).

Proses hipoksia dan iskemik ditunjukkan untuk menginduksi ekspresi miRNA-210 melalui *hypoxia-inducible factor 1 alpha* (HIF1- $\alpha$ ) baik dalam kondisi in vivo maupun in vitro (Pulkkinen et al., 2008; Lou et al., 2012; Qiu et al., 2013). Baru-baru ini, ekspresi miRNA-210 terbukti diinduksi oleh stimulasi nervus vagus (VNS) (Jiang et al., 2015), prosedur yang melindungi otak dari cedera iskemik/reperfusion serebral dengan mengatur status redoks seluler (Ekici et al., 2013; Jiang et al., 2014). *Knockdown* miRNA-210 melemahkan sel neuron dan respons stres antioksidan efek VNS di korteks setelah oklusi sementara arteri serebri media (MCA) (Jiang et al., 2015). Meskipun mekanisme spesifik yang memediasi miRNA-210, perlindungan terhadap stres oksidatif pasca-iskemik belum jelas, miRNA-210 sebelumnya ditunjukkan untuk menargetkan banyak miRNA yang mengkode protein yang terlibat dalam fungsi mitokondria, metabolisme, dan kelangsungan hidup sel (Chan dan Loscalzo, 2010) dan karenanya mungkin memiliki efek neuroprotektif pleiotropik setelah iskemik. Peran dari miRNA dalam stres oksidatif pasca-iskemik ditunjukkan pada Gambar. 2.4 (Bulygin et al., 2020; G. Li et al., 2018).

Stimulasi nervus vagus (VNS) mampu menginduksi efek neuroprotektif selama SI; ini digambarkan dengan model cedera iskemik/reperfusion (I/R) in vivo. VNS biasanya dapat mendorong aktivasi  $\alpha 7$ nAChR neuronal dan astrosit, secara bersamaan memblokir stres redoks dan kematian neuron selama SI. Ini dicapai melalui "ekspresi ekstensif miRNA-210" dan "Akt-fosforilasi". Dengan demikian, VNS bisa menjadi modalitas terapi potensial untuk mengobati SI. Namun, mekanisme spesifik dimana miRNA-210 memfasilitasi perlindungan terhadap stres oksidatif belum dijelaskan sepenuhnya. Selain itu, miRNA-210 menargetkan beberapa mRNA

yang mengkodekan protein yang terlibat dalam fungsi mitokondria, metabolisme, kelangsungan hidup sel, dan menghasilkan efek neuroprotektif pleiotropik setelah SI (G. Li et al., 2018).

### **2.3.3 MicroRNA dan inflamasi pasca-iskemik**

Inflamasi pasca iskemik serebral melibatkan proses perkembangan patologis yang kompleks yang dimulai dengan aktivasi sel mikroglia, infiltrasi leukosit yang bersirkulasi (seperti neutrofil, limfosit dan makrofag) dan pelepasan mediator sitokin pro-inflamasi oleh sel iskemik dan sel imun (Hallenbeck, 1996; Zheng dan Yenari, 2004; Wu et al., 2015). Meskipun inflamasi dimulai dalam beberapa menit setelah iskemik focal, infiltrasi neutrofil, yang merupakan ciri khas inflamasi, terjadi dalam waktu 3 jam dan berlangsung hingga 24 jam reperfusi (Liu et al., 2001). Peningkatan kadar molekul proinflamasi seperti kemokin dan sitokin, juga mengikuti alur waktu ini setelah stroke (Liu et al., 1994; Wang et al., 1997; Clark et al., 1999). Model eksperimental menunjukkan bahwa penghambatan mekanisme inflamasi neutrofilik mengurangi neurodegenerasi dan meningkatkan hasil fungsional setelah iskemik serebral (Prestigiacomo et al., 1999; Zhang et al., 2003). Namun sampai saat ini belum ada terapi anti inflamasi yang menunjukkan kemanjuran pada manusia setelah stroke (Enlimomab Acute Stroke Trial Investigators, 2001; Becker, 2002; Krams et al., 2003). (G. Li et al., 2018)

Banyak miRNA yang ditemukan menunjukkan mekanisme kerja yang memodulasi pensinyalan inflamasi setelah otak mengalami iskemik. Mekanisme utamanya adalah dimana microRNA mengatur inflamasi dengan menargetkan ekspresi sitokin dalam sel imun. Ekspresi berlebihan miRNA-22 pada kultur neuron kortikal terbukti menurunkan sitokin pro-inflamasi TNF- $\alpha$  dan interleukin (IL)-6 dan meningkatkan sitokin anti-inflamasi IL-10 pasca kekurangan oksigen dan glukosa (Yu et al., 2015). Selanjutnya, miRNA-22 juga terbukti mengurangi inflamasi, volume infark, dan defisit neurologis pasca iskemik focal yang diinduksi sementara (Yu et al., 2015). Modulasi

inflamasi oleh miRNA-22 melibatkan penekanan pensinyalan pro-inflamasi dengan menargetkan reseptor *nuclear receptor coactivator 1*, dan *NF-κB coactivator* (Yu et al., 2015). Sebelumnya telah terbukti bahwa mencegah ekspresi NF-κB dapat menginduksi perlindungan neuron pasca iskemik serebral (Buchan et al., 2000; Ueno et al., 2001; Xu et al., 2012).

Terdapat microRNA/miRNA lain juga yang terkait dengan jalur NF-κB dalam paradigma stroke, meskipun target spesifik pada mRNA belum jelas. Misalnya, ekspresi berlebih miRNA-181a meningkatkan NF-κB yang juga merupakan *activator glucose-regulated protein 78* dan memperburuk cedera stroke (Nakajima et al., 2011; Ouyang et al., 2012b). Terapi pasca-iskemik dengan pemberian antagomiR-181a terbukti menurunkan aktivasi NF-κB, infiltrasi leukosit, ukuran infark dan defisit neurobehaviour jangka panjang pasca MCAO (Xu et al., 2015). Pada jalur yang lain, *upregulasi* dari miRNA-203 menghambat pensinyalan NF-κB dengan menurunkan regulasi faktor diferensiasi myeloid 88 (MyD88), adaptor akhir utama dari *toll-like receptors* dan reseptor IL-1 yang memediasi translokasi nuklear NF-κB. Selanjutnya, miRNA-203 terbukti menekan produksi sitokin pro-inflamasi IL-8 dan TNF-α dan dengan demikian menurunkan inflamasi pasca iskemik dan menurunkan kematian neuronal setelah penurunan oksigen dan glukosa (Yang et al., 2015c).

Pasien stroke dengan penanda inflamasi sistemik tinggi menunjukkan luaran fungsi yang lebih buruk (Elkind et al., 2004; McCol et al., 2007). Analisis miRNA dalam sampel serum dari pasien dengan stroke iskemik akut menunjukkan penurunan yang signifikan kadar miRNA-124 dan miRNA-9, yang dikaitkan dengan volume infark yang lebih besar dan peningkatan kadar molekul proinflamasi, termasuk *matriks metaloproteinase-9* (MMP-9) dan *high-sensitivity C-reactive protein* (hs-CRP) dalam plasma (Liu et al., 2015b). MMP-9 mendegradasi lamina basal BBB, dan hs-CRP adalah molekul pro-

inflamasi yang berkorelasi dengan tingkat keparahan stroke (Kamada et al., 2007; Youn et al., 2012).

Studi in vitro lebih lanjut menunjukkan bahwa *upregulasi* miRNA-124 menurunkan sitokin, seperti TNF- $\alpha$ , dan menghambat aktivasi mikroglial pada model eksperimental ensefalomielitis alergi (Ponomarev et al., 2011). Menjadi pemeran utama dalam sistem kekebalan sel imun di otak, mikroglia sangat sensitif terhadap sinyal inflamasi setelah terjadinya SI (Benakis et al., 2014). Setelah diaktifkan, mikroglia melepaskan ROS, kemokin proinflamasi dan sitokin serta enzim proteolitik untuk memediasi kerusakan otak (Kim et al., 2013; Benakis et al., 2014). Meskipun aktivasi moderat dari mikroglia diperlukan untuk plastisitas dan membersihkan sisa-sisa sel yang mati, aktivasi berlebihan mereka menyebabkan neurotoksisitas dan kerusakan otak setelah SI (Del et al., 2007).

Sejumlah miRNA mengatur aktivasi mikroglial, pasca-iskemik otak dapat diproteksi dengan memodulasi miRNA tersebut. Pada model hewan pengerat yang dilakukan MCAO permanen, ekspresi berlebih miRNA-424 menghambat aktivasi mikroglial dan mengurangi ukuran infark (Zhao et al., 2013). Selain itu, miRNA-424 terbukti menekan aktivasi kultur mikroglial dengan represi translasi aktivator siklus sel, termasuk cyclin D1, siklus-siklus pembelahan sel 25A dan pembelahan sel protein kinase 6 (Zhao et al., 2013). Aktivasi mikroglial yang diinduksi OGD terbukti memerlukan adaptor MyD88, dengan menargetkan dan merepresi MyD88 oleh miRNA-203 mencegah aktivasi mikroglial dan cedera saraf setelah OGD (Yang et al., 2015c). Lebih lanjut dengan pemberian miRNA-203 intraserebral menyerupai MCAO akan menurunkan MyD88, mengurangi inflamasi dan kerusakan otak sekunder (Yang et al., 2015c).

MiRNA-181a juga berperan dalam aktivasi mikroglial selain kemampuannya untuk mengatur NF- $\kappa$ B, seperti yang dijelaskan sebelumnya. Terapi pasca-iskemik dengan antagomiR-181a menurunkan kadar *microglia-specific protein Iba1* dan menurunkan

neurodegenerasi pasca MCAO (Xu et al., 2015). Ada bukti bahwa efek yang dimediasi miRNA-181 pada inflamasi setelah iskemik serebral berpotensi terjadi pada astrosit juga. Dalam model inflamasi *in vitro* menggunakan astrosit yang dikultur, *downregulasi* miRNA-181 akan meningkatkan produksi sitokin pro-inflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, dan *high mobility group box-1 protein*), sedangkan *upregulasi* miRNA-181 meningkatkan ekspresi sitokin anti-inflamasi IL-10 (Hutchison et al., 2013). Perubahan dalam miRNA-132, miRNA-146a, dan miRNA-155 juga telah diamati pada astrosit yang dikultur pasca induksi inflamasi, dimana miRNA-132 ditunjukkan memediasi regulasi umpan balik negatif IL-1 $\beta$  dan IL-6 dengan menargetkan reseptor interleukin-1 kinase 4 (Kong et al., 2015). Secara keseluruhan, studi ini menunjukkan bahwa miRNA mengatur neuroinflamasi pasca-iskemik (Bulygin et al., 2020; G. Li et al., 2018).

#### **2.3.4 MicroRNA, kerusakan BBB, dan edema setelah stroke**

Edema otak pasca stroke menyebabkan kerusakan fisiologis dengan meningkatkan tekanan intrakranial dan mengurangi suplai darah ke jaringan otak (Nag et al., 2009). Edema yang diinduksi stroke dapat bersifat vasogenik, dimana kerusakan BBB menyebabkan akumulasi cairan ekstraseluler, atau sitotoksik karena akumulasi cairan intraseluler (Michinaga dan Koyama, 2015). Pada tingkat fisiologis, edema otak dikaitkan dengan berbagai faktor, seperti disfungsi endotel, MMPs, dan aquaporin (AQPs). Beberapa miRNA telah terbukti terlibat dalam edema otak yang diinduksi stroke melalui mekanisme langsung atau tidak langsung (Rom et al., 2015; Bukeirat et al., 2016). Endotel sel diperkaya dengan berbagai miRNA yang dianggap mengontrol fungsi BBB dalam keadaan normal dan patologis (Suarez dan Sessa, 2009).

Pada model tikus MCAO permanen, *upregulasi* miRNA-150 terbukti menyebabkan peningkatan permeabilitas BBB, dan ekspresi berlebih miRNA-150 dalam sel endotel mikrovaskular menurunkan ekspresi claudin-5, protein *tight junction* utama meningkatkan

permeabilitas endotel dan kematian sel pasca OGD (Fang et al., 2016). Efek ini berlawanan dengan reseptor angiopoietin Tie-2 (target miRNA-150), dan terapi dengan antagomiR miRNA-150 akan mencegah kerusakan BBB dan mengurangi degenerasi pasca stroke, dan berpotensi untuk mengatur kelangsungan hidup endotel (Fang et al., 2016). Ketika sel endotel serebral mengalami OGD, ekspresi *peroxisome proliferator-activated receptors- $\delta$*  (PPAR- $\delta$ ) menurun dengan peningkatan miRNA-15a, yang bersifat menekan anti-apoptosis Bcl-2 (Yin et al., 2010a). PPAR- $\delta$  merangsang *downregulasi* miRNA-15a yang menyebabkan penurunan apoptosis dan fragmentasi DNA pada pembuluh darah mikro otak, yang menyebabkan perbaikan kerusakan BBB dan penurunan ukuran infark setelah MCAO (Yin et al., 2010a).

Stroke diketahui menginduksi MMPs, yang merusak integritas sel endotel, mengakibatkan peningkatan permeabilitas BBB (Seo et al., 2012). Secara khusus, MMP-9, yang adalah isoform utama yang mendorong kerusakan BBB terjadi pada astrosit, mikroglia, neuron dan sel endotel setelah SI (Planas et al., 2001; Lee et al., 2004). Pada model tikus yang diinduksi mengalami iskemik global, kadar miRNA-21 dan MMP 9 terbukti meningkat secara signifikan selama periode 24 jam di hipokampus, dan penekanan miRNA-21 mengakibatkan *downregulasi* MMP-9 (Deng et al., 2013). Hubungan mekanistik antara miRNA-21 dan MMP-9 tidak diketahui dengan jelas tetapi mungkin efek tidak langsung dari penargetan kontrol MMP-9 oleh miRNA-21. Menariknya, penghambatan farmakologis dengan *mitogen-activated protein kinase* terbukti menghambat peningkatan iskemik yang diinduksi oleh miRNA-21 dan MMP-9, menunjukkan keterlibatan dari jalur protein kinase yang diatur ekstraseluler (Deng et al., 2013).

*Aquaporin* (AQP) termasuk dalam kelompok protein kanal air yang memodulasi transportasi cairan melintasi membran plasma dan memainkan peran penting dalam mempertahankan homeostasis air baik intraseluler dan maupun ekstraseluler (Lehmann et al., 2004;

Sepramaniam et al., 2012). Sampai saat ini, setidaknya 13 sub tipe AQP yang telah diidentifikasi, dan AQP1, AQP4 dan AQP9 paling banyak di sistem saraf pusat (SSP) dengan AQP4 memiliki yang tingkat tertinggi (Papadopoulos dan Verkman, 2013). AQP4 ditemukan pada ujung kaki astrositik yang berada pada BBB dan dianggap sebagai regulator utama dan kontributor utama pada edema vasogenik pasca iskemik fokal (Manley et al., 2000; Yao et al., 2015; Chu et al., 2016). MiRNA-130a terbukti menjadi penekan transkripsional dari *AQP4 M1 transcript*, yang mengkode isoform AQP4 yang menunjukkan permeabilitas air yang besar (Sepramaniam et al., 2012). Oleh karena itu, penekanan miRNA-130 terhadap *AQP4 M1 transcript* dan proteinnya lebih lanjut akan menyebabkan pengurangan volume infark (Sepramaniam et al., 2012).

Pasca iskemik fokal, *upregulasi* miRNA-320 menyebabkan penurunan kadar protein AQP1 dan AQP4, sedangkan inhibisi akan menyebabkan peningkatan AQP1 dan AQP4 (Sepramaniam et al., 2010). Demikian pula, penghambatan miRNA-320 mengurangi volume infark dan akumulasi air di otak 1 hari setelah MCAO dengan meningkatkan regulasi AQP1 dan AQP4 (Sepramaniam et al., 2010). Menariknya, AQP4 juga terbukti menjadi target miRNA-29b, dan ekspresi berlebih dari miRNA-29b pada model tikus iskemik fokal mengakibatkan penurunan ekspresi AQP4, mengurangi kerusakan BBB, mengurangi edema dan mengurangi ukuran infark (Wang et al., 2015). Selanjutnya, miRNA-29b secara signifikan menurun dalam sel darah putih setelah stroke pada manusia dan secara negatif berkorelasi dengan tingkat keparahan stroke (Wang et al., 2015).

Semua studi ini menunjukkan bahwa miRNA mengontrol ekspresi spasial atau temporal dari AQPs dan dengan demikian berpengaruh pada proses edema otak setelah stroke. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa miRNA memodulasi edema otak melalui mekanisme tidak langsung. Misalnya, inhibisi terhadap miRNA-210 yang terbukti meningkatkan secara signifikan kandungan

air otak setelah hipoksia pada neonatal, dan *upregulasi* miRNA-210 dapat menyebabkan pengurangan edema otak yang nyata (Zhao et al., 2016).

*Upregulasi* miRNA-124 dan miRNA-375 terbukti mengurangi edema setelah MCAO setelah terpapar lithium atau *calycosin fitoestrogen* (Wang et al., 2014d; Doeppner et al., 2016). *Upregulasi* miRNA-424 juga terbukti mengurangi edema otak dan ukuran infark setelah MCAO (Zhao et al., 2013), disamping itu miRNA-424 juga terbukti mengatur target yang terlibat dalam angiogenesis, stres oksidatif dan aktivasi mikroglial (Chamorro Jorganes et al., 2011; Zhao et al., 2013; Liu et al., 2015a). Oleh karena itu, beberapa mekanisme dapat berkontribusi pada kemampuan miRNA untuk mengontrol edema otak pasca stroke (Bulygin et al., 2020; G. Li et al., 2018).

### **2.3.5 MicroRNA dan jalur apoptosis pasca-iskemik**

Area penumbra berpotensi pulih dengan intervensi terapeutik, tetapi harus didasari oleh beberapa faktor seperti waktu terapi, eksitotoksisitas, stres oksidatif, dan inflamasi dimana faktor-faktor ini dapat memengaruhi proses apoptosis neuron pada area penumbra dalam beberapa jam hingga beberapa hari setelah serangan iskemik (Broughton et al., 2009). Studi menunjukkan bahwa penurunan protein pro-apoptosis atau meningkatnya protein pro-survival melindungi otak pasca iskemik serebral (Nakka et al., 2008).

Sampai saat ini, beberapa miRNA diketahui menargetkan proses translasi protein dari jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik dan dengan demikian dapat mengubah luaran pasca stroke. Diketahui bahwa banyak miRNA menargetkan *antiapoptotic protein Bcl-2* pada mekanisme kerjanya. Misalnya, kelompok miRNA-15 meningkatkan iskemik fokal dengan menargetkan Bcl-2, dan dengan demikian, penghambatan miRNA-15 akan meningkatkan kadar protein Bcl-2 sehingga melindungi sel endotel dan sel neuron yang menyebabkan penurunan ukuran infark dan penurunan gangguan vaskular setelah iskemik fokal (Yin et al., 2010a; Shi et al., 2013).

MiRNA-497, diinduksi oleh iskemik fokal, juga menargetkan Bcl-2 dan pengobatan dengan antagomiR-497 meningkatkan kadar Bcl-2 yang pada akhirnya menurunkan volume infark (Yin et al., 2010b). Setelah iskemik serebral global, represi miRNA-181a telah terbukti meningkatkan kadar Bcl-2 dan mengurangi kehilangan neuron CA1 di hipokampus (Bulan et al., 2013). Selanjutnya, menurunkan miRNA-181a dalam kultur astrosit akan meningkatkan kadar baik *protein Bcl-2* maupun *myeloid cell leukemia-1* (Mcl-1) dan berkurangnya disfungsi mitokondria dan apoptosis sebagai respons terhadap kekurangan glukosa (Ouyang et al., 2012a). Dalam neuron kortikal, miRNA-124 agomiRs meningkatkan ekspresi *anti-apoptotic Bcl-2* dan Bcl-xl tanpa mengubah ekspresi *pro-apoptotic Bax* atau *Bad Bax* yang lebih lanjut akan melindungi neuron dari OGD (Sun et al., 2013).

MirNA-29b telah diketahui menekan beberapa dari kelompok famili Bcl-2, termasuk Bcl-2, Mcl-1, dan Bcl-w (Bcl2L2) (Mott et al., 2007; Shi et al., 2012). Ekspresi miRNA-29b meningkat secara signifikan pada otak tikus setelah iskemik fokal sementara dan juga merangsang kematian neuron pada kultur neuron kortikal (Shi et al., 2012). Overekspresi Bcl-w pada neuron yang selamat melawan miR-29b yang menginduksi kematian sel menunjukkan bahwa miR-29b dapat merangsang kematian neuron dengan menekan Bcl-w dan menyebabkan terjadinya apoptosis lebih lanjut.

Meskipun sebagian besar miRNA yang diidentifikasi sejauh ini menargetkan jalur intrinsik apoptosis, studi *in vitro* menunjukkan bahwa miRNA-21, miRNA-25, miRNA-181c mengatur sinyal TNF- $\alpha$  melalui jalur apoptosis ekstrinsik. Dalam kultur neuron kortikal, ekspresi berlebih dari miRNA-21 menurunkan ekspresi *Fas ligand* dan mencegah apoptosis pasca OGD (Buller et al., 2010). Demikian pula, ekspresi berlebih miRNA-25 pada sel neuron mencegah apoptosis yang diinduksi OGD dengan menurunkan kadar Fas (Zhang et al., 2016a). Pada kultur mikroglial, OGD meningkatkan ekspresi TNF- $\alpha$

sementara secara bersamaan menekan ekspresi miRNA-181c (Zhang et al., 2012a).

Menariknya, miRNA-181c terbukti menekan TNF- $\alpha$  dan sebagian mencegah terjadinya apoptosis neuron pasca OGD (Zhang et al., 2012a). Semua studi ini menunjukkan potensi miRNA dalam mempromosikan atau mencegah apoptosis pasca iskemik serebral (Gambar 2.4). Selain apoptosis, autofagi juga memainkan peran penting dalam kelangsungan hidup neuron dalam kondisi hipoksia. Semakin banyak bukti yang terungkap bahwa miRNA secara ekstensif terlibat dalam stroke iskemik melalui proses patofisiologi autofagi. MiRNA-30a dan miRNA-30c adalah bagian dari keluarga miRNA30, mereka adalah regulator penting kelangsungan hidup dan kematian neuron dalam kondisi hipoksia dari penelitian sebelumnya (Ouzounova et al., 2013). Studi in vivo mengungkapkan bahwa miRNA-30a di otak mengalami peningkatan pada model iskemik serebral fokal permanen, sementara mengalami penurunan pada model iskemik/reperfusi. Penurunan miRNA-30a mengurangi kematian neuron dan meningkatkan luaran behaviour pada tikus yang mengalami stroke iskemik melalui peningkatan *Beclin 1-mediated autophagy* (Wang et al., 2014b).

Hasil serupa diamati pada cedera iskemik/reperfusi sumsum tulang belakang pada model tikus, *upregulasi* miRNA-30c dapat memperburuk iskemik/reperfusi cedera sumsum tulang belakang melalui penekanan *Beclin 1-mediated autophagy* (Li et al., 2015a). Sebuah studi juga menyebutkan bahwa RNA panjang *noncoding Malat1* memainkan peran penting pada iskemik/reperfusi atau BMEC OGD. Studi lain menyebutkan bahwa Malat1 adalah suatu spons endogen untuk menurunkan regulasi ekspresi miRNA-26b, yang potensi targetnya adalah gen yang berhubungan dengan *autophagy* ULK2. Jadi, menekan ekspresi miRNA-26b dapat merangsang autofagi BMEC dan meningkatkan kelangsungan hidup pada kondisi OGD (Li et al., 2017). Selain itu, diketahui juga miRNA-207,

mengalami penurunan pasca stroke iskemik, dapat mengurangi jumlah autofagosome dan meningkatkan jumlah vakuola autofagi di daerah kortikal iskemik, yang menurunkan volume infark dan memperbaiki defisit neurologis (Tao et al., 2015a; Li et al., 2018).

### 2.3.6 MicroRNA dan neurogenesis pasca stroke

Stroke telah terbukti menginduksi neurogenesis sel punca pada area *subventricular zone* (SVZ) dan *hippocampal dentate gyrus* (DG), dan migrasi sel-sel neuron baru ke area kerusakan iskemik dan berdiferensiasi di seluruh area otak yang rusak menjadi fenotipe neuron baru yang dewasa (Bulygin et al., 2020).

MiRNA-17-92 dan miRNA-124 diketahui mengatur neurogenesis selama perkembangan otak. MiRNA-17-92 dan miRNA-124 dikenal sebagai regulator neurogenesis embrionik. Iskemik fokal dapat meningkatkan regulasi ekspresi kelompok miRNA-17-92 dalam sel progenitor saraf pada tikus dewasa; *upregulasi* miRNA-17-92 biasanya meningkatkan proliferasi dalam sel progenitor yang dikultur pada zona subventrikular wilayah iskemik (Bulygin et al., 2020).

Kelompok miRNA-17-92 terlihat mengalami peningkatan pada *neural progenitor cells* setelah iskemik fokal pada tikus dewasa, dan overekspresi miRNA-17-92 meningkatkan proliferasi sel progenitor yang dikultur dan pada SVZ pasca iskemik (Liu et al., 2013b) dan sebaliknya penekanan miRNA-18a atau miRNA-19a dari kelompok miRNA-17-92 menghentikan proliferasi sel dan meningkatkan kematian sel (Liu et al., 2013b). Faktor transkripsi c-Myc sebelumnya telah terbukti mengaktifkan ekspresi miRNA dari kelompok miRNA-17-92, termasuk miRNA-17-5p dan miRNA-20a (O'Donnell et al., 2005). Pada SVZ dimana *neural progenitor cells* berada, kejadian iskemik mempromosikan pengikatan c-Myc ke wilayah promotor miRNA-17-92 dan meningkatkan *upregulasi* miRNA-17-92 (Liu et al., 2013b). Selanjutnya, *sonic hedgehog protein* menunjukkan *upregulasi* miRNA-17-92 setelah MCAO, diduga melalui pensinyalan c-Myc (Liu et al., 2013b). Sebuah studi menunjukkan kelompok miRNA-17-92 kaya

eksosom secara signifikan menunjukkan peningkatan pemulihan fungsional dan peningkatan oligodendrogenesis, neurogenesis, dan remodeling neurit/plastisitas dendrit neuron pada zona batas iskemik pada tikus coba. Mekanisme yang mendasari mungkin melibatkan penargetan fosfatase dan tensin homolog untuk mengaktifkan *PI3K/protein kinase B/mechanistic* dari jalur pensinyalan *rapamycin/glycogen synthase kinase 3 $\beta$*  (Xin et al., 2017a).

MiRNA124 juga diketahui sebagai regulator penting pada otak yang sedang berkembang dan juga diekspresikan secara konstitutif pada neuron otak dewasa (Delaloy et al., 2010). Iskemik fokal ditunjukkan mengurangi ekspresi miRNA-124 dalam sel progenitor saraf SVZ, dan transfeksi miRNA-124 menurunkan proliferasi yang diinduksi iskemik dengan menekan *Jagged-1*, yang memodulasi *Notch* (Liu et al., 2011). Pensinyalan *Notch* akan mempertahankan *neural stem cell* pada SVZ (Hitoshi et al., 2002; Androutsellis-Theotokis et al., 2006) dan juga diperlukan untuk induksi neurogenesis pasca stroke (Wang et al., 2009a; Wang et al., 2009b).

Baik miRNA-210 dan *Notch* diregulasi pada otak yang iskemik, dan overekspresi miRNA-210 terbukti secara signifikan meningkatkan ekspresi *Notch* (Lou et al., 2012). Juga ditunjukkan bahwa *upregulasi* miRNA-210 secara kuat mendorong neurogenesis pada otak orang dewasa (Zeng et al., 2014). Salah satu studi menunjukkan bahwa overekspresi miRNA-210 meningkatkan proliferasi progenitor neuron dan meningkatkan luaran neurobehavioral pasca MCAO (Zeng et al., 2016). Dalam darah pasien stroke terlihat juga mengalami *downregulasi* miRNA-210 dan berkorelasi positif dengan prognosis (Zeng et al., 2011; Zeng et al., 2016), hal ini menunjukkan potensi biomarker miRNA-210 dalam klinis (Bulygin et al., 2020)

*Mesenchymal stromal cells* (MSC) dengan *upregulasi* miRNA-133b secara signifikan meningkatkan pemulihan fungsional pada tikus pasca MCAO dan bahwa eksosom yang dihasilkan dari MSC memediasi manfaat terapeutik untuk stroke (Xin et al., 2013). Studi

berikut menemukan eksosom yang diisolasi dari MSC dengan *upregulasi* miRNA-133b meningkatkan perbaikan fungsional, dan neurit *remodeling*/plastisitas otak pada area batas iskemik (Xin et al., 2017b). Mekanisme proteksi yang melibatkan eksosom dari MSC memediasi transfer miRNA-133b ke astrosit dan neuron sebagai kendaraan, dimana mengatur ekspresi gen target (faktor pertumbuhan jaringan ikat dan anggota keluarga gen homolog ras A), selanjutnya mempromosikan *remodeling* neurit dan pemulihan fungsional pasca stroke pada tikus (Bulygin et al., 2020; G. Li et al., 2018).

### **2.3.7 MicroRNA dan angiogenesis pasca stroke**

Studi terbaru menunjukkan keterlibatan beberapa miRNA dalam angiogenesis pasca-iskemik, yang sangat penting untuk mengembalikan suplai darah ke daerah iskemik untuk mendorong pemulihan dan plastisitas setelah stroke (Liu et al., 2014b). Mekanisme molekuler yang mendasari angiogenesis dalam kondisi pasca stroke melibatkan proses yang rumit yang diatur oleh faktor angiogenik, seperti VEGF, *fibroblast growth factor-2* (FGF-2), netrins, *platelet-derived growth factor* (PDGF), mendorong pertumbuhan endotel, perkembangan vaskular dan proliferasi dan migrasi perisit (Saharinen et al., 2008; Augustin et al., 2009; Beenken dan Mohammadi, 2009; Ferrara, 2009; Gaengel et al., 2009; Lu et al., 2012; Morancho et al., 2015; Yin et al., 2015).

Faktor-faktor ini biasanya dapat meningkatkan sintesis endotelium, dan proliferasi serta migrasi perisit yang mendorong angiogenesis melalui neovaskularisasi. MiRNA yang diinduksi hipoksia memodulasi angiogenesis pasca-stroke dengan mengatur aktivitas VEGF misalnya, miRNA-107 dapat meningkatkan angiogenesis setelah stroke melalui faktor 1A yang diinduksi hipoksia (HIF-1A) (Chen et al., 2011a; Chen et al., 2013). Studi lebih lanjut menunjukkan bahwa miRNA-107 meningkatkan angiogenesis dengan menginduksi ekspresi endogen VEGF dengan menurunkan regulasi Dicer-1 (Li et al., 2015d). *Upregulasi* miRNA-107 juga meningkatkan

angiogenesis pada daerah penumbra, dan dengan pemberian antagomiR-107 akan mengurangi kepadatan kapiler di penumbra dan meningkatkan volume infark setelah iskemik fokal (Li et al., 2015d).

*Upregulasi* dari miRNA-210 juga dilaporkan dapat mengaktifkan *Notch signaling* yang meningkatkan angiogenesis pasca stroke iskemik otak. MiRNA-210 diregulasi dalam iskemik otak juga terbukti berkontribusi pada angiogenesis dengan meningkatkan kadar VEGF pada tikus dewasa (Lou et al., 2012; Zeng et al., 2014). *Upregulasi* miRNA-210 mengaktifkan *Notch signaling*, yang terbukti menyebabkan migrasi sel endotel dan pembentukan struktur seperti kapiler dalam sel endotel yang dikultur (Lou et al., 2012). Berbeda dengan miRNA ini, miRNA-376b-5p menekan angiogenesis yang diinduksi MCAO dan terbukti menghambat angiogenesis in vitro dengan menargetkan *HIF-1 $\alpha$ -mediated VEGF-A/Notch1 signaling pathway* (Li et al., 2014b). Ekspresi VEGF-A juga dapat dikurangi dengan miRNA-140-5p, yang secara langsung menargetkan 3' UTR VEGF-A (Sun et al., 2016). Pasca MCAO, ekspresi miRNA-140-5p menurun dan level VEGF-A meningkat, dan dalam kultur endotel, miRNA-140-5p menghambat proliferasi, migrasi, dan tuba pembentukan setelah OGD (Sun et al., 2016), menunjukkan efek penghambatan miRNA-140-5p pada angiogenesis.

MiRNA lain telah terbukti mengatur angiogenesis pasca-iskemik melalui jalur yang tidak terkait dengan VEGF. Misalnya, *upregulasi* miRNA-124 dimulai dengan perubahan neurovaskular yang menyebabkan peningkatan angiogenesis 8 minggu setelah induksi MCAO, berpotensi melalui degradasi pada Usp14 dari *RE1-silencing transcription factor* (REST) (Doepfner et al., 2013). *Downregulasi* miRNA-155 mengurangi ukuran infark, menjaga integritas mikrovaskular dan *tight junction* kapiler, dan meningkatkan aliran darah pada daerah penumbra setelah MCAO distal dengan menargetkan *Rheb*, yang menstabilkan *zonula occludens-1* dan *tight junction* (Caballero-Garrido et al., 2015). Secara keseluruhan,

perubahan ekspresi miRNA setelah stroke dapat berkontribusi pada perlindungan neuron dengan mendorong proses angiogenesis. Mirip dengan miRNA yang dibahas dalam mekanisme iskemik lainnya, meningkatkan miRNA pelindung dan menghambat miRNA perusak dapat mengurangi kerusakan otak iskemik dan berkontribusi pada pemulihan klinis (Bulygin et al., 2020)

Telah dilaporkan bahwa miRNA-145 terlibat dalam pengaturan metabolisme glukosa darah, yang juga memainkan peran penting pada tikus diabetes yang dilakukan MCAO. Studi *in vitro* menunjukkan bahwa *BMSCs derived from type 1 diabetes rats* (DM-BMSCs) meningkatkan pembentukan tabung kapiler dan pertumbuhan aksonal dalam kultur neuron kortikal primer, dihambat oleh overekspresi miRNA-145. Demikian pula pengobatan dengan DM-BMSC secara signifikan meningkatkan luaran fungsional, peningkatan pembuluh darah dan remodeling pada substansia alba dengan menurunkan ekspresi miRNA-145 serum pada tikus diabetes tipe 1 yang dilakukan MCAO. Jadi, downregulasi miRNA-145 dapat memainkan efek menguntungkan pada neurorestorasi dan fungsional pada DM-BMSC yang dilakukan MCAO (Gambar 2.4) (Cui et al., 2016; (Bulygin et al., 2020; G. Li et al., 2018).

### **2.3.8 MicroRNA dan toleransi iskemik**

Toleransi iskemik adalah suatu kondisi dimana terjadi aktivitas neuroprotektif endogen yang diinduksi oleh cedera iskemik subletal dimana bisa terjadi pada berbagai organ, termasuk otak, jantung, hati dan ginjal, yang jika berlanjut akan menyebabkan cedera iskemik yang berat (Liu et al., 1992; Tsutsui et al., 2013; Liu et al., 2014a; Rachmat et al., 2014; Zhao dan Nowak, 2015; Ma et al., 2016). *Preconditioning* (PC) iskemik telah berulang kali dilakukan untuk mengubah profil microRNA secara global dalam model eksperimental (Sun et al., 2015a). Sebagai contoh, PC iskemik serebral pada tikus *Spontaneously Hypertensive Rat* (SHR) ditunjukkan untuk memodulasi ekspresi beberapa miRNA setelah 3 jam, dan perubahan

dipertahankan setidaknya selama 3 hari (Dharap dan Vemuganti, 2010). Yang penting, miRNA yang menargetkan jalur neurotoksik diinduksi, dan miRNA yang menargetkan jalur pemulihan berkurang setelah PC, mengindikasikan bahwa mereka mempromosikan lingkungan untuk melindungi otak dari efek merusak dari stroke (Dharap dan Vemuganti, 2010). PC iskemik pada tikus dewasa juga mengubah banyak level microRNA, dan yang terpenting, represi miRNA-132 dan lainnya menargetkan protein pengikat metil-CpG 2, regulator transkripsi yang terlibat dalam plastisitas sinaptik, dianggap sebagai neuroprotektif (Lusardi et al., 2010).

Penelitian lain juga mengkonfirmasi bahwa PC iskemik pada tikus dewasa mengubah profil miRNA dan, dalam khususnya, menunjukkan bahwa *upregulasi* miRNA-200 yang menargetkan *prolyl hidrosilase 2*, protein yang mencegah akumulasi HIF-1 $\gamma$  (Lee et al., 2010). PC iskemik juga telah terbukti mengubah level miRNA dan melindungi terhadap cedera iskemik/reperfusi pada jantung tikus (Yin et al., 2009; Varga et al., 2014). Injeksi ventrikel miRNA murni yang diekstraksi dari jantung tikus yang dikondisikan sebelumnya mengurangi infark miokard pada tikus, menunjukkan peran penting miRNA untuk kardioproteksi yang diinduksi PC (Yin et al., 2009).

#### **2.4 MicroRNA sebagai Biomarker Stroke Iskemik**

Karena dapat dideteksi pada banyak cairan tubuh, termasuk darah dan cairan serebrospinal (CSF), miRNA dapat berfungsi sebagai biomarker diagnostik stroke pada manusia (Tan et al., 2009; Tan et al., 2013; Li et al., 2015b; Vilar-Bergua et al., 2016). Sebuah studi sampel plasma pasien stroke iskemik telah mengidentifikasi *upregulasi* miRNA-125b-2\*, miRNA-27a\*, miRNA-422a, miRNA-488, dan miRNA-627 pada pasien stroke akut (1, 2 dan 7 hari setelah onset stroke) tetapi tidak selama fase pemulihan (6 bulan dan 2 tahun setelah stroke) (Sepremaniam et al., 2014). Studi lain menunjukkan bahwa miRNA-106b-5p dan miRNA-4306 mengalami *upregulasi* dan miRNA-320e dan *downregulasi* miRNA 320d dalam darah

pasien stroke yang dikumpulkan pada 3, 6, 12, dan 24 jam setelah onset stroke (Wang et al., 2014c).

Perbandingan profil microRNA CSF dan plasma menunjukkan peningkatan kadar miRNA-151a-3p dan miRNA-140-5p dalam plasma dan peningkatan level let-7c dan miRNA-221-3p dan penurunan level miRNA-18-5p dalam CSF pasien pada 3 hari setelah onset stroke dibandingkan pasien dengan penyakit neurologis lainnya (Sorensen et al., 2014). Menariknya, beberapa microRNA, termasuk miRNA-523-3p, ditemukan secara eksklusif di CSF (Sorensen et al., 2014). Pada 1 hari setelah serangan stroke pada manusia, level miRNA-32-3p, miRNA-106-5p, dan miRNA-1246 mengalami *upregulasi* dan miRNA-532-5p mengalami *downregulasi* dibandingkan dalam plasma kontrol yang sehat (Li et al., 2015b). Dalam studi kohort pasien yang lebih muda (18-49 tahun), kadar miRNA-145 meningkat secara signifikan selama fase akut setelah stroke dan kembali ke tingkat basal setelah beberapa bulan dibandingkan dengan kontrol yang sehat (Gan et al., 2012).

**Tabel 2. 1 Disregulasi miRNA yang terkait dengan stroke iskemik (Dikutip dari Vasudeva and Munshi, 2020)**

miRNAs	Sample analysed			
	Whole blood	Plasma	Serum	CSF
Upregulated	miR-363, -487b (Jickling et al., 2014); miR-125b-2, -1261, -1321, -27a, -488, -545, -627, Let-7c, -135b, -145, -184, -187, -196a, -198, -200b, -210, -214, -220c, -25, -26b, -34b, -370, -381, -422a, -483-5p, -488, -490-3p, -494, -498, -525-5p, -549, -552, -553, -585, -602, -611, -617, -623, -627, -637, -638, -659, -668, -671-5p, -675, -920, -933, -943, -99a, miR-125b-2, -1261, -1321, -27a, -422a, -488, -549, -617, -627, -129-5p, -196a, -370, -381, -525-5p, -920, -933, let-7c, -135b, -145, -184, -187, -198, -200b, -210, -214, -220c, -25, -26b, -34b, -483-5p, -490-3p, -494, -498, -552, -553, -585, -602, -611, -623, -637, -638, -659, -668, -671-5p, -675, -943, -99a (Sepamaniam et al., 2014)	miR-144, (Chen et al., 2016) -107, -128b and -153 (Yang, Li, et al., 2016); miR-877-5p, -124-3p, and -320d, hsa-miR-656-3p, -3615, -941 (Mick et al., 2017); let-7i, miR-15a (Xiang et al., 2017); miR-21-5p, -30a-5p (Wang et al., 2018); miR-222, -218, -185, -221, -206, -185 (Jin & Xing, 2017)	miR-221-3p (Wang, Suofu, et al., 2017); miR-146b and -21 (Chen et al., 2018); miR-9 and -124 (Ji et al., 2016); miR-32-3p, -106-5p, -124e, and -532-5p (Li, Mao, et al., 2015); miR-223 (Chen et al., 2017); miR-210 (Wang, Zhang, & Xu, 2018); miR146b (Chen et al., 2018); PC-3p-57664, PC-5p-12969, miR-122-5p, miR-211-5p (Vijayan et al., 2018)	miR-9-5p, -9-3p, 124-3p and -128-3p (Sorensen et al., 2017); let-7e (Peng et al., 2015)
Downregulated	miR-122, -148a, let-7i, miR-19a, -320d, and -4429 (Jickling et al., 2014); hsa-let-7a, -7b*, -7c, -7d*, -7f, -7g, -7i, -106b*, -126, -151-5p, -182, -183, -186, -18a*, -20a, -222, -23b, -324-5p, -331-3p, -335, -342-3p, -342-5p, -361-5p, -362-5p, 363, -500, -500*, 501-5p, -502-5p, -502-3p, -505*, -532-5p, -576-5p, -625, -629, -652, -7, let-7d, miR-1299, -130a, -208a, -22, -23a, -320b, -30c, -340, -423-3p, -502-5p, -574-3p, -886-5p, -92a, -93, let-7a, -7g, miR-192, -26b, -30b, -30c, -493, -652, -96	miR-223 (Yang, Li, et al., 2016); miR-126, -130a, -378, 19a, -296, -101 (Jin & Xing, 2017)	miR-221-3p and -382-5p (Wang, Suofu, et al., 2017)	-

Baru-baru ini penelitian menunjukkan *upregulasi* miRNA-145 dalam studi kohort pasien pada 1 hari setelah stroke, yang berkorelasi dengan

volume infark, skor *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS), plasma IL-6 dan hs-CRP (Jia et al., 2015). Pada 1 hari setelah stroke pada manusia, ditunjukkan dengan *upregulasi* miRNA-16 dan *downregulasi* penurunan kadar miRNA-21 dan miRNA-24 dibandingkan dengan kontrol yang sehat (Leung et al., 2014; Zhou dan Zhang, 2014). Selain itu, tingkat miRNA spesifik otak miRNA-107, miRNA-128b, dan miRNA-153 terbukti mengalami *upregulasi* dalam plasma pasien stroke dan secara positif berkorelasi dengan skor NIHSS (Yang et al., 2016b). Selanjutnya, tingkat sirkulasi dua miRNA spesifik otak lainnya, miRNA-124 dan miRNA-9, diamati menurun dalam plasma pasien stroke dan dikaitkan dengan volume infark yang lebih luas, CRP dan MMP9 (Liu et al., 2015b). Level miRNA-29b yang terdapat dalam plasma pasien yang dikumpulkan pada 3 hari setelah stroke telah diamati dan mungkin terkait dengan gangguan BBB dan edema karena *aquaporin-4* adalah target miRNA-29b (Wang et al., 2015).

Studi juga menunjukkan bahwa miRNA-30a dan miRNA-126 mengalami *downregulasi* dan let-7b mengalami *upregulasi* dalam plasma pasien selama fase akut setelah stroke, yang kembali ke tingkat basal dalam 15 hingga 48 hari (Long et al., 2013; Peng et al., 2015). Plasma dari pasien stroke akut juga menunjukkan bahwa miRNA-99a menurun secara signifikan dibandingkan dengan subyek sehat (Tao et al., 2015b). Selain stroke, iskemik organ perifer juga terbukti terkait dengan perubahan tingkat microRNA darah. Iskemik tungkai terbukti terkait dengan peningkatan level ekspresi miRNA-15a dan miRNA-16in sel proangiogenik yang bersirkulasi (Spinetti et al., 2013), dan iskemik miokard dan/atau penyakit arteri koroner terbukti meningkatkan sirkulasi kadar miRNA-15a dan miRNA-17-5p (Liu et al., 2012a; Chen et al., 2015c; G. Li et al., 2018; Vasudeva & Munshi, 2020).

## **2.5 Peran MicroRNA Dalam Kerusakan Otak Pada Stroke Hemoragik**

Stroke hemoragik, yang menyumbang sekitar 15% dari semua kasus stroke, terdiri dari: perdarahan intraserebral (ICH) dan perdarahan subarakhnoid (SAH) (*American Heart Association*) (Passos et al., 2016). Meskipun penyebab pasti dari stroke hemoragik tidak diketahui, lebih sering pada pasien dengan penyakit penyerta tertentu, seperti diabetes dan

hipertensi. Studi terbaru menunjukkan bahwa kedua jenis stroke hemoragik dikaitkan dengan perubahan profil miRNA otak dan darah. Pada tikus dewasa yang mengalami ICH yang diinduksi dengan menyuntikkan darah autologus ke otak, beberapa miRNA terbukti diubah di otak dan darah (Liu et al., 2010). Khususnya, 29 miRNA mengalami perubahan (17 naik dan 12 menurun regulasinya >2 kali lipat) di otak setelah ICH. Menariknya, miRNA-542-3p mengalami *upregulasi* dan miRNA-155, miRNA-362-3p, miRNA-122, dan miRNA-450a-5p mengalami *downregulasi* pada ICH serta SI (Liu et al., 2010). Pada tikus yang sama, 41 miRNA juga mengalami perubahan dalam darah (21 naik dan 20 menurun). Juga dalam darah, miRNA-96, miRNA-152, miRNA-298, miRNA-333, dan miRNA-505 mengalami *upregulasi* dan miRNA-125a-5p, miRNA-130b, miRNA-142-3p, miRNA-330, miRNA-342-5p, miRNA-685, dan miRNA-347 mengalami *downregulasi* pada ICH serta SI, menunjukkan bahwa mereka mungkin merupakan biomarker stroke yang umum (Liu et al., 2010).

Perubahan dalam microRNA yang bersirkulasi terbukti berfungsi sebagai biomarker untuk memprediksi pembesaran hematoma pada pasien dengan ICH (Zheng et al., 2012). Tiga puluh microRNA terkait dengan inflamasi yang diamati, mengalami *upregulasi* dalam darah pada kedua pasien pria dan wanita dengan ICH (Guo et al., 2013). Selain itu, tingkat miRNA-130a yang tinggi terbukti menjadi penanda edema dan hasil yang lebih buruk setelah ICH pada tikus (Wang et al., 2016). Pada pasien ICH, edema perihematoma juga terbukti terkait dengan perubahan miRNA serum yang mencakup miRNA-126, miRNA-146, Let-7a dan miRNA-26a (Zhu et al., 2015). Level miRNA-132-3p dan miRNA-324-3p juga terbukti meningkat secara signifikan dalam darah pasien dengan SAH (Su et al., 2015). Banyak miRNA juga terbukti diubah dalam CSF pasien dengan SAH (Powers et al., 2016; Stylli et al., 2016).

MiRNA juga terbukti memodulasi kerusakan otak sekunder setelah ICH. Penghambatan Let7c, yang diinduksi setelah ICH, terbukti mengurangi edema, kematian sel apoptosis dan inflamasi pada tikus dewasa (Kim et al., 2014). Pada tikus dewasa, miRNA-223 terbukti menargetkan dan

mensupresi NLRP3 yang bersifat proinflamasi dan dengan demikian mencegah edema pasca-ICH yang mengarah ke peningkatan luaran neurologis (Yang et al., 2015b). Aktivasi mikroglial dihasilkan setelah ICH dan inflamasi diketahui telah dimodulasi oleh *interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK4) mengalami peningkatan setelah ICH, yang merupakan bagian penting dari jalur yang bergantung pada MyD88 (Yuan et al., 2015). Menariknya, IRAK4 adalah target miRNA-367, dan ICH menyebabkan *downregulasi* kadar miRNA 367 dalam mikroglia (Yuan et al., 2015). Pengobatan tikus dewasa yang mengalami ICH dengan mimik miRNA 367 menghambat IRAK4, NF- $\kappa$ B, p65, IL-6, IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  dan dengan demikian menghasilkan penurunan inflamasi yang menyebabkan kerusakan otak sekunder yang terbatas dan edema serebri (Yuan et al., 2015; G. Li et al., 2018).

## **2.6 MicroRNA/miRNA-21 Pada Aterosklerosis dan Stroke Iskemik**

MiRNA-21 berimplikasi pada berbagai variasi proses biologi, termasuk proses proliferasi, apoptosis dan inflamasi. Telah banyak diketahui bahwa miRNA-21 terlibat dalam proses aterosklerosis dan SI. Aterosklerosis adalah salah satu dari penyakit inflamasi kronik yang ditandai dengan proses akumulasi kolesterol dan sel imun pada dinding arteri yang menyebabkan terbentuknya plak. MiRNA-21 juga ditemukan dalam jumlah banyak dalam makrofag, tipe sel imun yang terlibat dalam perkembangan dan progresifitas aterosklerosis. Pada lesi aterosklerosis terjadi *upregulasi* miRNA-21 dan memberikan kontribusi dalam progresifitas penyakit yang mempromosikan proses inflamasi dan terbentuknya sel busa. Pada konteks aterosklerosis dan SI, miRNA-21 telah dipelajari dan diketahui terlibat secara potensial dalam patogenesis dan progresifitas penyakit kardiovaskular dan serebrovaskular.

### **2.6.1 MicroRNA-21 pada aterosklerosis**

Aterosklerosis adalah suatu kondisi inflamasi kronik yang ditandai dengan terbentuknya plak pada dinding dalam arteri. *Upregulasi* miRNA-21 pada lesi aterosklerosis dipercaya memberikan

kontribusi dalam perkembangan dan progresivitas aterosklerosis dalam berbagai variasi mekanisme:

#### **2.6.1.1 Inflamasi**

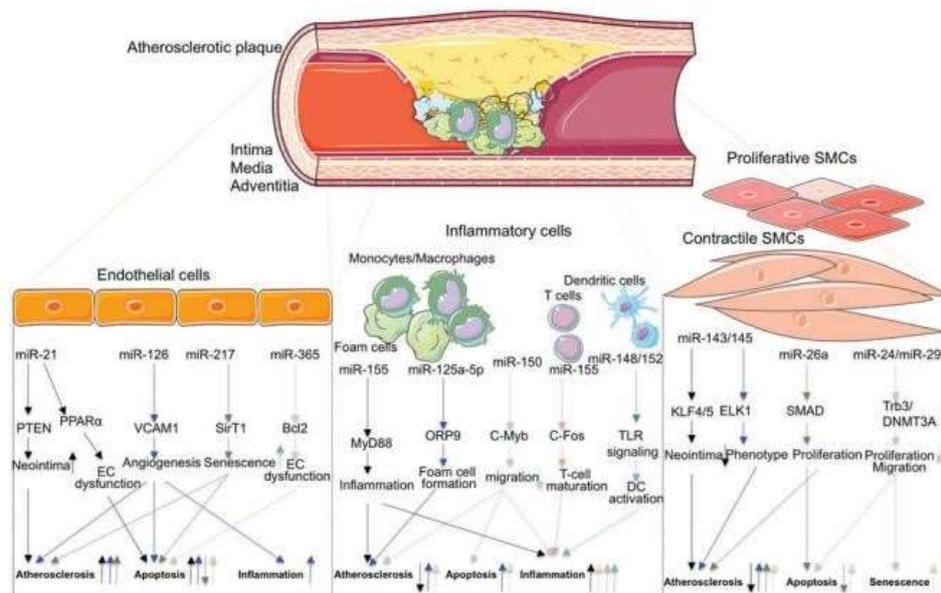
MiRNA-21 berhubungan dengan regulasi proses inflamasi. MiRNA-21 dapat memodulasi ekspresi gen yang terlibat dalam proses modulasi respon inflamasi termasuk yang berhubungan dengan rekrutmen sel imun pada dinding vaskular (Sheedy, 2015). Lebih lanjut, miRNA-21 telah menjadi target intervensi terapi pada penyakit yang terkait dengan inflamasi (Jenike & Halushka, 2021). Inhibisi miRNA-21 telah disarankan sebagai pendekatan terapi yang potensial dalam regulasi disfungsi sel endotel dan inflamasi vaskular (Dai et al., 2020).

MiRNA-21 berhubungan dengan proses induksi aterosklerosis, nekrosis plak dan inflamasi vaskular dan menjadi sorotan yang esensial dalam pengalihan regulasi inflamasi (Canfrán-Duque et al., 2017). MiRNA-21, diekspresikan dalam makrofag dan berimplikasi dalam perkembangan dan proses aterosklerosis (Canfrán-Duque et al., 2017). Tidak hanya mempromosikan inflamasi tetapi juga berkontribusi dalam pembentukan sel busa, proses penting dalam pembentukan plak aterosklerosis. Penelitian menunjukkan bahwa jika miRNA-21 tidak ada dalam makrofag akan menyebabkan akselerasi aterosklerosis, nekrosis plak dan inflamasi vaskular. Lebih lanjut menunjukkan retikulum endoplasma yang sensitif menginduksi apoptosis, fagositosis yang akan menimbulkan banyak dampak (Canfrán-Duque et al., 2017).

Selain itu, dasar mekanistik keterlibatan miRNA-21 dalam aterosklerosis telah dijelaskan, menyoroti perannya dalam mendorong induksi jalur sinyal yang meningkatkan apoptosis makrofag dan berkontribusi terhadap degradasi pasca-translasi dari *ATP binding cassette subfamily G member 1* (ABCG1), pengatur penting pengurangan kolesterol di makrofag. Selain

dampaknya terhadap inflamasi dan pembentukan sel busa, miRNA-21 juga terlibat dalam mengatur fungsi, kelangsungan hidup, dan proliferasi sel endotel. Bukti menunjukkan bahwa ekspresi miRNA-21 dapat memengaruhi perkembangan aterosklerosis dengan memodulasi inflamasi EC, produksi nitrat oksida, dan proliferasi, sekaligus memainkan peran penting dalam regulasi apoptosis. Selain itu, miRNA-21 telah dikaitkan dengan fungsi sel otot polos pembuluh darah, dengan ekspresinya terkait dengan apoptosis dan proliferasi VSMC, proses kunci dalam transisi fenotipik VSMC selama perkembangan aterosklerosis. Peran miRNA-21 yang begitu banyak dalam aterosklerosis meluas ke pengaturan proses yang terlibat dalam fungsi sel yang tepat, kelangsungan hidup, dan proliferasi, serta dampaknya terhadap sinyal inflamasi. Tidak adanya miRNA-21 dalam sel hematopoietik telah terbukti mempercepat perkembangan aterosklerosis dan mengarah pada perkembangan lesi yang ditandai dengan area nekrotik yang luas, penipisan *fibrous cap*, dan apoptosis masif, menunjukkan peran penting miRNA-21 dalam patogenesis dan perkembangan aterosklerosis. Dalam konteks stroke iskemik, keterlibatan miRNA-21 dalam mengatur autofag makrofag dan dampaknya terhadap polarisasi makrofag M2 merupakan bidang yang semakin diminati. Penelitian telah menjelaskan peran penghambatan miRNA-21 dalam autofag makrofag yang disebabkan oleh pengobatan IL4/IL13, menjelaskan modulasi polarisasi makrofag M2. Implikasi miRNA-21 dalam mengatur proses seluler yang terkait dengan stroke iskemik menunjukkan adanya interaksi yang rumit antara miRNA dan mekanisme patofisiologis yang mendasari penyakit serebrovaskular. Temuan ini menunjukkan bahwa miRNA-21 memainkan peran penting dalam perkembangan aterosklerosis dan SI, memengaruhi proses seperti inflamasi, pembentukan sel busa, fungsi sel endotel, transisi fenotip sel otot polos pembuluh darah, serta autofagi dan polarisasi makrofag. Penting untuk

mempertimbangkan perspektif alternatif mengenai peran miRNA-21 dalam aterosklerosis.



**Gambar 2.5 Fungsi dari miRNA dalam berbagai sel vaskular dalam proses aterosklerosis (Dikutip dari Hosen et al., 2020)**

Meskipun penelitian yang dikutip menyajikan bukti kuat mengenai keterlibatan miRNA-21 dalam memicu inflamasi dan berkontribusi terhadap patogenesis aterosklerosis, penting juga untuk dicatat bahwa mungkin ada faktor tambahan yang berperan. Penting untuk mengeksplorasi potensi peran ganda miRNA-21, karena telah dikaitkan dengan resolusi inflamasi dan pengaturan negatif respon pro-inflamasi yang disebabkan oleh berbagai stimulus. Selain itu, meskipun miRNA-21 telah dikaitkan dengan regulasi sel endotel dan fungsi sel otot polos pembuluh darah, penting untuk menyelidiki dampak yang lebih luas dari miRNA-21 pada beragam jenis sel dan peran potensialnya dalam jaringan kompleks jalur sinyal yang terlibat dalam aterosklerosis. Sifat keterlibatan miRNA-21 yang beragam dalam aterosklerosis memerlukan penyelidikan lebih lanjut untuk memahami sepenuhnya implikasinya dan target terapi potensial. Interaksi miRNA-21 dengan mekanisme pengaturan lain dan jalur sinyal

dalam konteks aterosklerosis memerlukan eksplorasi yang komprehensif dan seimbang dalam penelitian selanjutnya.

#### **2.6.1.2 Proliferasi sel otot polos**

MiRNA-21 terlibat dalam mendorong proliferasi sel otot polos, yang terlibat dalam pembentukan plak aterosklerotik. MiRNA-21 terlibat dalam mendorong proliferasi sel otot polos, yang terlibat dalam pembentukan plak aterosklerotik (Dai et al., 2020). Selain itu, miRNA-21 telah dikaitkan dengan proliferasi sel otot polos sebagai respons terhadap cedera ligasi karotis, sehingga menyoroti perannya dalam remodeling vaskular dan aterosklerosis (Jin et al., 2018). Selain itu, defisiensi miRNA-21 pada makrofag telah dikaitkan dengan apoptosis, nekrosis plak, dan inflamasi pembuluh darah selama aterogenesis, yang semakin menekankan keterlibatannya dalam pembentukan plak aterosklerotik (Canfrán-Duque et al., 2017). Temuan ini secara kolektif mendukung peran miRNA-21 dalam mendorong proliferasi sel otot polos dan implikasinya pada aterosklerosis.

Selain itu, miRNA-21 telah terlibat dalam regulasi proses inflamasi pada plak aterosklerotik. Telah diamati bahwa miRNA-21 memainkan peran penting dalam menghentikan inflamasi dan mengatur respons pro-inflamasi secara negatif di berbagai jenis sel, termasuk makrofag. Tidak adanya miRNA-21 pada makrofag telah terbukti meningkatkan ekspresi sitokin inflamasi seperti TNF, IL-1b, dan IL-6, menunjukkan bahwa miRNA-21 dapat bertindak sebagai pengatur utama proses inflamasi pada aterosklerosis dan SI. Lebih lanjut, miRNA-21 telah terlibat dalam mendorong proliferasi sel otot polos dalam pembentukan plak aterosklerotik dan proses remodeling pembuluh darah.

MiRNA-21 juga terlibat dalam mendorong proliferasi sel otot polos melalui perannya dalam regulasi gen yang terlibat dalam proses ini. Penelitian telah menunjukkan bahwa miRNA-21 terlibat dalam *remodeling* vaskular dan aterosklerosis dengan mendorong

proliferasi sel otot polos sebagai respons terhadap cedera ligasi karotis, menyoroti kontribusinya terhadap patologi vaskular dan pembentukan plak aterosklerotik. Defisiensi miRNA-21 pada makrofag juga telah dikaitkan dengan apoptosis sel otot polos, nekrosis plak, dan inflamasi pembuluh darah selama atherogenesis, yang semakin menggarisbawahi peran penting miRNA-21 dalam aterosklerosis (Canfrán-Duque et al., 2017).

Penting untuk mempertimbangkan perspektif alternatif mengenai peran miRNA-21 dalam aterosklerosis. Meskipun penelitian yang dikutip menyajikan bukti kuat mengenai keterlibatan miRNA-21 dalam memicu inflamasi dan berkontribusi terhadap patogenesis aterosklerosis, penting juga untuk dicatat bahwa mungkin ada faktor tambahan yang berperan. Beberapa penelitian terbaru menunjukkan bahwa miRNA-21 juga memiliki sifat anti-inflamasi dan dapat berkontribusi pada penyelesaian inflamasi dengan mengatur secara negatif respons pro-inflamasi yang disebabkan oleh berbagai rangsangan. Temuan ini menunjukkan bahwa peran miRNA-21 dalam aterosklerosis mungkin lebih kompleks dari perkiraan sebelumnya dan mungkin melibatkan keseimbangan antara meningkatkan inflamasi dan mengatasinya.

Selain itu, meskipun miRNA-21 telah dikaitkan dengan regulasi sel endotel dan fungsi sel otot polos pembuluh darah, penting untuk menyelidiki potensi peran gandanya dan dampaknya terhadap jaringan kompleks jalur sinyal yang terlibat dalam aterosklerosis. Interaksi miRNA-21 dengan mekanisme pengaturan lain dan jalur sinyal dalam konteks aterosklerosis memerlukan eksplorasi yang komprehensif dan seimbang dalam penelitian selanjutnya. Hanya melalui penyelidikan menyeluruh terhadap kompleksitas ini implikasi penuh miRNA-21 pada aterosklerosis dapat dipahami.

### 2.6.1.3 Apoptosis

MiRNA-21 dapat memengaruhi apoptosis (kematian sel terprogram) dalam sel pembuluh darah, memengaruhi keseimbangan antara kelangsungan hidup sel dan kematian dalam proses aterosklerotik. MiRNA-21 telah terbukti memengaruhi apoptosis pada sel pembuluh darah, juga keseimbangan antara kelangsungan hidup dan kematian sel dalam proses aterosklerotik (Dai et al., 2020). Ekspresi miRNA-21 yang berlebihan ditemukan melindungi sel yang dikultur terhadap apoptosis dengan mengatur *Programmed Cell Death 4* (PDCD4) dan jalur AP-1 (Dai et al., 2020). Selain itu, miRNA-21 telah terlibat dalam mengurangi apoptosis pada berbagai jenis sel, termasuk sel saraf dan kardiomyosit, melalui penurunan regulasi ekspresi PTEN dan mekanisme yang bergantung pada fosfatase dan tensin homolog (PTEN)/Akt (Bai & Bian, 2022; Yang et al., 2014). Selain itu, miRNA-21 telah dikaitkan dengan represi sumbu PGE2/IL-10, yang menyebabkan respons glikolitik dan inflamasi yang berlebihan selama sepsis (Melo et al., 2020).

Temuan ini secara kolektif mendukung peran miRNA-21 dalam memodulasi apoptosis pada berbagai jenis sel, termasuk sel pembuluh darah, dan potensi implikasinya dalam patofisiologi aterosklerosis. Beragam efek pada apoptosis ini menggarisbawahi sifat miRNA-21 yang bervariasi dan keterlibatannya dalam berbagai proses seluler. Dalam konteks aterosklerosis, memahami peran miRNA-21 dalam memodulasi apoptosis pada sel pembuluh darah sangatlah penting. Keseimbangan antara kelangsungan hidup dan kematian sel secara signifikan berdampak pada perkembangan dan stabilitas plak aterosklerotik. Oleh karena itu, diperlukan eksplorasi lebih lanjut tentang mekanisme rumit yang melaluinya miRNA-21 memengaruhi apoptosis dalam sel pembuluh darah. Selain itu, menyelidiki potensi penargetan terapeutik miRNA-21 untuk memodulasi apoptosis dalam konteks aterosklerosis

memberikan harapan yang signifikan dalam memajukan strategi pengobatan untuk penyakit kardiovaskular. Singkatnya, miRNA-21 memainkan peran penting dalam memodulasi apoptosis pada berbagai jenis sel, termasuk sel pembuluh darah, dan disregulasinya memiliki implikasi besar dalam patofisiologi aterosklerosis.

### **2.6.2 MicroRNA-21 pada stroke iskemik**

Stroke iskemik terjadi ketika aliran darah ke otak tersumbat, menyebabkan kerusakan sel dan berpotensi menimbulkan konsekuensi neurologis yang parah. MiRNA-21 telah diselidiki dalam konteks stroke iskemik, dan perannya sangat kompleks.

#### **2.6.2.1 Neuroproteksi**

Dalam beberapa penelitian, miRNA-21 diduga memiliki peran neuroprotektif. Hal ini mungkin terlibat dalam meningkatkan kelangsungan hidup sel dan mengurangi apoptosis pada neuron setelah kejadian iskemik. Bukti menunjukkan bahwa miRNA-21 mungkin memiliki peran neuroprotektif dengan meningkatkan kelangsungan hidup sel dan mengurangi apoptosis pada neuron setelah kejadian iskemik (Zhan et al., 2023). Zhan et al., 2023) menunjukkan bahwa miRNA-21-5p protektif terhadap stroke iskemik dengan menargetkan IL-6R, yang menunjukkan potensi efek neuroprotektifnya.

Selain itu, Zhou & Zhang (2014) mengidentifikasi miRNA-21 sebagai penanda tahap awal infark serebral akut yang potensial, menunjukkan keterlibatannya dalam kondisi neurologis dan kejadian iskemik. Namun, penelitian yang dilakukan oleh Bai & Bian (2022) membahas potensi berbagai miRNA, termasuk miRNA-21, dalam patogenesis gangguan sistem saraf pusat, menunjukkan peran regulasinya yang serbaguna, namun tidak secara spesifik mendukung peran neuroprotektifnya. Temuan ini secara kolektif mendukung gagasan keterlibatan miRNA-21 dalam neuroproteksi dan potensinya sebagai target terapi pada gangguan neurologis.

Peran rumit miRNA-21 dalam konteks stroke iskemik jelas kompleks, mencakup potensi efek neuroprotektifnya. Efek perlindungan miRNA-21-5p terhadap SI, ditunjukkan dengan menargetkan IL-6R, semakin menggarisbawahi potensinya dalam mengurangi konsekuensi neurologis. Selain itu, identifikasi miRNA-21 sebagai penanda tahap awal infark serebral akut yang potensial oleh Zhou & Zhang menyoroti keterlibatannya dalam kondisi neurologis dan kejadian iskemik. Sementara penelitian oleh Bai & Bian membahas peran pengaturan berbagai miRNA, termasuk miRNA-21, pada gangguan sistem saraf pusat tanpa secara eksplisit mendukung peran neuroprotektifnya, hal ini menggarisbawahi potensi regulasi serba guna miRNA-21 dalam konteks kondisi neurologis.

#### **2.6.2.2 Inflamasi**

Serupa dengan perannya dalam aterosklerosis, miRNA-21 terlibat dalam modulasi respons inflamasi di otak setelah stroke iskemik. Ini dapat memengaruhi aktivitas sel imun dan ekspresi mediator inflamasi. Selain itu, miRNA-21 ditemukan terlibat dalam regulasi inflamasi di otak setelah stroke iskemik. Eksperimen telah menunjukkan bahwa peningkatan regulasi miRNA-21 dapat mengurangi inflamasi dan melindungi sawar darah-otak, berkontribusi terhadap keseluruhan efek neuroprotektif yang diamati. Selain itu, miRNA-21 telah terbukti berperan dalam regulasi inflamasi saraf setelah stroke iskemik.

Peran miRNA-21 dalam modulasi respon inflamasi di otak setelah stroke iskemik telah didukung oleh penelitian yang menunjukkan keterlibatannya dalam resolusi inflamasi dan regulasi negatif respon pro-inflamasi Sheedy (2015). Selain itu, miRNA-21 telah terbukti melindungi terhadap stroke iskemik dengan menargetkan IL-6R, yang menunjukkan potensi efek neuroprotektifnya. Selain itu, miRNA-21 juga terlibat dalam melemahkan respons inflamasi pada penyakit serebrovaskular,

yang menunjukkan peran potensialnya dalam memodulasi inflamasi di otak setelah kejadian iskemik (Feng et al., 2014). Temuan ini secara kolektif mendukung keterlibatan miRNA-21 dalam memengaruhi aktivitas sel kekebalan dan ekspresi mediator inflamasi di otak setelah stroke iskemik.

### **2.6.2.3 Integritas *Blood-Brain Barrier* (BBB)**

MiRNA-21 telah dipelajari karena potensi perannya dalam menjaga integritas BBB, yang sangat penting untuk mencegah zat berbahaya memasuki otak. Peran miRNA-21 dalam modulasi respon inflamasi di otak pasca stroke iskemik telah didukung oleh beberapa penelitian. Sheedy (2015) menyoroti peran kunci miRNA-21 dalam resolusi inflamasi dan regulasi negatifnya terhadap respons pro-inflamasi. Zhan et al. (2023) menunjukkan efek perlindungan miRNA-21-5p terhadap stroke iskemik dengan menargetkan IL-6R, yang menunjukkan potensi peran miRNA-21-5p dalam mengurangi respons inflamasi. Selain itu, Feng et al. (2014) mengemukakan potensi peran miRNA-21 dalam menurunkan respon inflamasi pada penyakit serebrovaskular. Temuan ini secara kolektif mendukung implikasi miRNA-21 dalam memengaruhi aktivitas sel imun dan ekspresi mediator inflamasi dalam konteks stroke iskemik.

Implikasi miRNA-21 dalam modulasi respons inflamasi di otak setelah stroke iskemik melampaui efek neuroprotektifnya. Penelitian telah menggarisbawahi peran penting miRNA-21 dalam resolusi inflamasi, regulasi negatif respon proinflamasi, dan potensinya untuk melindungi terhadap SI dengan menargetkan IL-6R. Selain itu, potensi miRNA-21 dalam menurunkan respons inflamasi pada penyakit serebrovaskular menunjukkan pengaruhnya yang lebih luas dalam memodulasi inflamasi saraf pasca kejadian iskemik.

Pemahaman komprehensif tentang keterlibatan miRNA-21 dalam memediasi lingkungan inflamasi dan potensi efek

neuroprotektifnya dalam konteks stroke iskemik menyoroti pentingnya miRNA-21 sebagai target terapi yang menjanjikan.

## **2.7 MicroRNA/miRNA-221/222 pada Aterosklerosis dan Stroke Iskemik**

MiiRNA-221/222 adalah molekul RNA kecil *non-coding* yang memainkan peran penting dalam regulasi ekspresi gen yang juga terlibat dalam berbagai proses fisiologis dan patologis, termasuk penyakit serebrovaskular seperti aterosklerosis dan stroke iskemik. Penelitian terbaru menunjukkan disregulasi miRNA-221 pada pasien SI, menyoroti potensinya sebagai target terapi untuk pengobatan kondisi ini. Penelitian lebih lanjut mengenai peran miRNA-221 pada stroke iskemik dan regulasi ekspresi gennya dapat membuka jalan bagi pengembangan strategi baru dan efektif untuk pengobatan stroke.

Selain perannya dalam stroke iskemik, miRNA-221 juga dikaitkan dengan aterosklerosis, suatu kondisi yang ditandai dengan penumpukan plak pada arteri. Mekanisme pengaturan dimana miRNA-221 memberikan efek neuroprotektifnya pada cedera otak iskemik akut telah menjadi fokus penelitian terbaru. Studi-studi ini menunjukkan bahwa miRNA-221 dapat mengurangi kerusakan otak pada stroke iskemik akut dengan menghambat respons proinflamasi, memberikan wawasan lebih lanjut mengenai dasar molekuler miRNA-221 dan mengungkap target terapi potensial untuk stroke iskemik dan aterosklerosis.

Temuan dari penelitian ini tidak hanya meningkatkan pemahaman kita tentang patofisiologi stroke iskemik dan aterosklerosis namun juga menjanjikan pengembangan intervensi terapeutik inovatif yang menargetkan miRNA-221. Penyelidikan lebih lanjut mengenai hubungan fungsional circR-284 dan miRNA-221, serta potensi penggunaannya sebagai biomarker diagnostik dan prognostik, akan berperan penting dalam memajukan bidang penelitian serebrovaskular dan meningkatkan luaran pasien.

Sebaliknya mirNA-222, telah terbukti meningkatkan regulasi pada aterosklerosis dan SI. Peningkatan regulasi ini menunjukkan potensinya

sebagai biomarker untuk kondisi ini dan sebagai target intervensi terapeutik. Memahami disregulasi miRNA-222 dan keterlibatannya dalam patogenesis aterosklerosis dan SI dapat memberikan wawasan berharga untuk pengembangan alat diagnostik dan target terapi. Identifikasi serum circR-284 dan miRNA-221 sebagai biomarker diagnostik untuk stroke iskemik terkait arteri karotis dan peran potensialnya dalam ruptur plak aterosklerotik memberikan jalan yang berharga untuk penelitian longitudinal di masa depan. Menjelaskan hubungan fungsional antara circR-284 dan miRNA-221 dapat memberikan wawasan baru tentang kegunaan diagnostik dan prognostiknya dan membuka jalan bagi pengembangan pendekatan efektif untuk menormalkan kadar RNA serum.

Dukungan dari *National Institute of General Medical Sciences* dan *National Heart Lung Blood Institute* dari *National Institutes of Health* menggarisbawahi pentingnya penelitian ini dan potensi akibat terhadap praktik klinis. Dasar ini menetapkan tahapan untuk penyelidikan lebih lanjut mengenai penggunaan tingkat sirkulasi circR-284 dan miRNA-221 sebagai biomarker diagnostik untuk kejadian serebrovaskular iskemik, yang pada akhirnya berkontribusi terhadap peningkatan keberhasilan perawatan dan hasil luaran pasien. Kesimpulannya, studi tentang miRNA, seperti miRNA-221, miRNA-222, dan miRNA-146, pada aterosklerosis dan stroke iskemik memberikan harapan besar untuk memahami mekanisme yang mendasari penyakit-penyakit ini dan mengembangkan strategi diagnostik dan terapeutik yang efektif.

### **2.7.1 MicroRNA/miRNA-221/222 pada aterosklerosis**

Aterosklerosis adalah suatu kondisi yang ditandai dengan penumpukan plak pada arteri, yang menyebabkan berkurangnya aliran darah dan peningkatan risiko kejadian penyakit serebrovaskular. MiRNA-221/222 ditemukan mengalami disregulasi pada lesi aterosklerotik dan dapat berkontribusi pada perkembangan aterosklerosis.

MiRNA-221/222 terlibat dalam aterosklerosis, dengan penurunan regulasi pada plak lanjut yang berkontribusi terhadap

neoangiogenesis (Chistiakov et al., 2015). Selain itu, disregulasi miRNA-221/222 memperburuk hiperplasia neointimal pada diabetes, sehingga meningkatkan risiko komplikasi vaskular (Lightell et al., 2018). Selain itu, ekspresi miRNA-221/222 menurun pada dinding plak aterosklerotik, yang meningkatkan risiko ruptur pada plak (Bazan et al., 2015). Temuan ini menggarisbawahi pentingnya miRNA-221/222 dalam perkembangan aterosklerosis dan potensinya sebagai target terapi.

MiRNA-221 dan miRNA-222 berperan dalam aterosklerosis dengan mengatur proses seperti neoangiogenesis, hiperplasia neointimal, dan stabilitas plak. Mereka ditemukan mengalami penurunan regulasi pada plak lanjut, berkontribusi terhadap hiperplasia neointimal dan meningkatkan risiko komplikasi kardiovaskular pada pasien diabetes. Selain itu, hubungan miRNA-221 dan miRNA-222 dengan ruptur plak aterosklerotik dan potensinya sebagai biomarker diagnostik dalam konteks stroke iskemik terkait arteri karotis memberikan peluang yang menjanjikan untuk penelitian dan translasi klinis lebih lanjut.

Penelitian menunjukkan bahwa microRNA-221/222 dapat memengaruhi proses seluler utama yang terlibat dalam aterosklerosis, seperti fungsi sel endotel, proliferasi sel otot polos pembuluh darah, dan inflamasi. MicroRNA ini dapat menargetkan gen yang terkait dengan proses ini, sehingga memodulasi perkembangan plak aterosklerotik. Disregulasi microRNA-221/222 telah dikaitkan dengan proses seluler utama dalam aterosklerosis, termasuk fungsi sel endotel, proliferasi sel otot polos pembuluh darah, dan inflamasi. Gen target microRNA terlibat dalam proses ini, memengaruhi perkembangan dan progresivitas plak aterosklerotik. Secara spesifik, penurunan regulasi microRNA-221/222 pada plak lanjutan berkontribusi terhadap neoangiogenesis dan memperburuk hiperplasia neointimal pada diabetes, sehingga meningkatkan risiko komplikasi kardiovaskular. Selain itu, penurunan regulasi plak pada

plak lanjutan berkontribusi terhadap hiperplasia neointimal, menurunkan stabilitas plak, dan meningkatkan risiko pecahnya plak.

### **2.7.2 MicroRNA/miRNA 221/222 pada stroke iskemik**

Stroke iskemik terjadi ketika terjadi penyumbatan atau penggumpalan pada pembuluh darah yang menuju ke otak, sehingga mengakibatkan berkurangnya aliran darah dan suplai oksigen. MicroRNA -221/222 telah dipelajari dalam konteks stroke iskemik karena keterlibatannya dalam proses seperti inflamasi saraf, apoptosis, dan kelangsungan hidup saraf. Disregulasi microRNA-221/222 telah dipelajari dalam konteks stroke iskemik karena keterlibatannya dalam proses seperti neuroinflamasi, apoptosis, dan kelangsungan hidup neuron (Lai et al., 2020). MicroRNA ini telah ditemukan menargetkan gen yang terkait dengan proses ini, sehingga berpotensi memodulasi perkembangan dan progresivitas stroke iskemik. Selain itu, microRNA-221/222 telah terlibat dalam meningkatkan sensitivitas sel terhadap cisplatin dalam konteks kanker payudara *triple*-negatif (Li et al., 2020).

## **2. 8 Penerapan Terapi Berbasis MicroRNA/miRNA**

Seperti dijelaskan di atas, miRNA kemungkinan mewakili biomarker baru sebagai target terapi untuk stroke dengan strategi berbasis miRNA yang memberikan manfaat dari onset tindakan yang cepat, faktor penting dalam pengembangan pengobatan stroke. Beberapa perusahaan sedang mengembangkan terapi berbasis miRNA. Percobaan fase 2 yang berhasil dari obat bertarget miRNA pertama, *locked nucleic acid* (LNA) menargetkan miRNA-122 untuk mengobati hepatitis C menunjukkan bahwa pengaplikasian terapi berbasis miRNA ke ranah klinis dimungkinkan hanya jika target kandidat diidentifikasi (Janssen et al., 2013). Namun, tampaknya tidak ada konsensus yang muncul pada titik waktu pengobatan, rute administrasi, modifikasi kimia dan dosis miRNA dalam terapi stroke. Penelitian yang sedang berlangsung mengungkapkan bahwa baik sebelum dan sesudah pengobatan dengan miRNA dapat memengaruhi cedera

iskemik, titik waktu pengobatan mungkin tergantung pada perubahan temporal miRNA selama proses stroke (G. Li et al., 2018).

## 2. 9 Modifikasi Kimia dan Desain MicroRNA/miRNA

Aplikasi terapeutik miRNA dapat dilakukan dengan dua pendekatan, baik dengan menghambat miRNA menggunakan oligonukleotida yang dimodifikasi secara kimia komplementer dengan urutan miRNA (Hutvagner et al., 2004) atau meniru fungsi miRNA dengan menggunakan apa yang disebut miRNA mimik (van Rooij et al., 2008). Kelemahan lain dari paradigma pengobatan berbasis RNA adalah degradasi miRNA oleh RNAase endogen, membatasi kemanjuran farmakologisnya. Namun, miRNA dapat dimodifikasi secara kimia untuk meningkatkan stabilitas transfer melintasi membran sel. Untuk penggunaan *in vivo*, beberapa modifikasi kimia yang berbeda telah dieksploitasi untuk meningkatkan farmakokinetiknya (Port dan Sucharov, 2010; Latronico dan Condorelli, 2011).

Modifikasi ini termasuk antagomiR awal di mana oligonukleotida anti-miR dimodifikasi dengan penggabungan gugus metil (2'-O-metil) bersama dengan ikatan fosforothioat dan konjugasi kolesterol pada ujung 3 untai (yang meningkatkan distribusi jaringan dan serapan seluler), perubahan pada bagian gula dengan 2'-O-methoxyethyl phosphorothioate dan penggunaan LNA. Farmasi Santaris telah meluncurkan uji klinis fase II menggunakan LNA anti-miRNA-122 spesifik hepar untuk pengobatan hepatitis C. Selain itu, microRNA untai ganda yang dimodifikasi meniru dengan untai Tunggal yang mengandung urutan microRNA yang sama mengandung basa uridin dan pasangan nukleotida uridine-quanin yang menginduksi reaksi imun non-spesifik dengan mengaktifkan *Toll-like receptor* (Judge et al., 2005).

Sebagai urutan miRNA mimik tidak dapat diubah tanpa spesifisitas atau kemanjurannya menjadi konsesi, kimia modifikasi berbasis nukleotida ini diperlukan untuk meminimalkan respon gangguan imunologis. Menjelajahi pendekatan yang lebih dapat diterapkan secara klinis untuk mengubah produksi *endogenous* miRNA, seperti pemberian secara

intravena atau inhibitor intraperitoneal dan miRNA yang distabilkan, adalah langkah penting berikutnya untuk klinis yang efisien. Selain itu, dosis pengobatan miRNA pada hewan stroke ditentukan oleh jenis miRNA, rute administrasi, berat hewan, dll. Semua penelitian sekarang menunjukkan bahwa intervensi miRNA dapat memengaruhi prognosis stroke, tetapi ada kekurangan studi langsung pada dosis, jenis microRNA dan rute administrasi. Jadi, selanjutnya riset diperlukan untuk mengeksplorasi fungsi miRNA terkait stroke dalam dosis, rute administrasi dan lebih banyak titik waktu cedera iskemik otak (G. Li et al., 2018).

## **2. 10 National Institute Health Stroke Scale (NIHSS)**

*National Institutes of Health Stroke Scale*, atau *NIH Stroke Scale* (NIHSS), adalah alat yang digunakan oleh penyedia layanan kesehatan untuk secara objektif mengukur kerusakan yang disebabkan oleh stroke. NIHSS terdiri dari 11 item, yang masing-masing memberi skor kemampuan tertentu antara 0 dan 4. Untuk setiap item, skor 0 biasanya menunjukkan fungsi normal dalam kemampuan spesifik tersebut, sedangkan skor yang lebih tinggi mengindikasikan beberapa tingkat penurunan. Skor individu dari setiap item dijumlahkan untuk menghitung total skor NIHSS pasien. Skor maksimum yang mungkin adalah 42, dengan skor minimum 0 (lampiran 1). Dalam upaya untuk menghasilkan penilaian neurologis yang lengkap, NIHSS dikembangkan setelah penelitian ekstensif dan beberapa iterasi. Tujuan NIHSS adalah untuk secara akurat mengukur fungsi neurologis holistik dengan menguji kemampuan tertentu secara individual. Skor total NIHSS didasarkan pada penjumlahan 4 faktor. Faktor-faktor tersebut adalah fungsi motorik kiri dan kanan serta fungsi kortikal kiri dan kanan. NIHSS menilai masing-masing fungsi spesifik ini dengan item skala yang tercantum dalam tabel 2 (Lyden et al., 1999).

Skala Stroke NIH yang dimodifikasi (mNIHSS) adalah versi mNIHSS yang dipersingkat dan divalidasi. Skor ini telah terbukti tetap sama, bahkan lebih akurat daripada NIHSS yang lebih lama. Modifikasi ini menghilangkan pertanyaan 1A, 4, dan 7. Ini membuat mNIHSS lebih pendek dan lebih mudah digunakan. mNIHSS memprediksi pasien dengan risiko tinggi

perdarahan jika diberikan aktivator plasminogen jaringan (tPA) dan pasien mana yang cenderung memiliki hasil klinis yang baik (Lyden et al., 1999). mNIHSS juga baru-baru ini terbukti dilakukan tanpa melihat pasien, dan hanya menggunakan rekam medis. Hal ini berpotensi meningkatkan perawatan saat berada di ruang gawat darurat dan rumah sakit, namun juga memfasilitasi penelitian retrospektif (Kasner et al., 2003). *National Institute Health Stroke Scale* telah berulang kali divalidasi sebagai alat untuk menilai tingkat keparahan stroke dan sebagai prediktor yang sangat baik untuk hasil pasien. Keparahan stroke sangat berkorelasi dengan volume otak yang terkena stroke; stroke yang mempengaruhi bagian otak yang lebih besar cenderung memiliki efek yang lebih merugikan. Skor NIHSS telah ditemukan sebagai prediktor yang dapat diandalkan untuk volume otak yang rusak, dengan skor NIHSS yang lebih kecil menunjukkan volume lesi yang lebih kecil (Weimar et al., 2004).

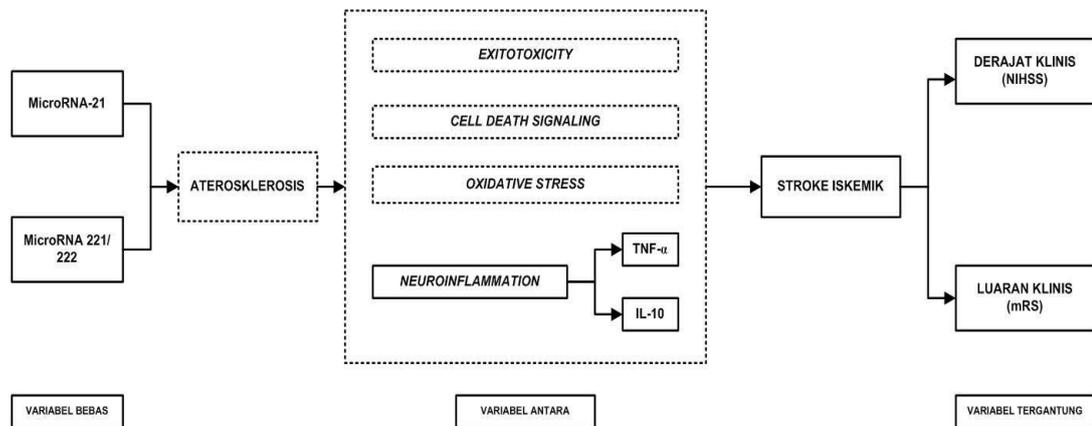
Dari 42 poin NIHSS, 7 poin termasuk keterampilan verbal, 2 poin dari pertanyaan LOC, 2 poin dari perintah LOC, dan 3 poin dari item Bahasa. NIHSS hanya memberikan 2 poin untuk kurangnya perhatian. Sekitar 98% manusia memiliki pemrosesan verbal yang terjadi di hemisfer kiri, yang menunjukkan bahwa NIHSS lebih menghargai defisit di hemisfer kiri. Hal ini menyebabkan lesi menerima skor yang lebih tinggi (lebih buruk) saat terjadi di hemisfer kiri, dibandingkan dengan lesi dengan ukuran yang sama di hemisfer kanan. Karena penekanan ini, NIHSS adalah prediktor volume lesi yang lebih baik pada stroke yang terjadi di belahan otak kiri (Fink et al., 2002). NIHSS telah ditemukan sebagai prediktor yang sangat baik untuk menilai derajat keparahan pasien. Skor dasar NIHSS lebih besar dari 16 menunjukkan kemungkinan kuat kematian pasien, sementara skor dasar NIHSS kurang dari 6 menunjukkan kemungkinan kuat pemulihan yang baik. Rata-rata, peningkatan 1 poin pada skor NIHSS pasien menurunkan kemungkinan hasil yang sangat baik sebesar 17%. Namun, korelasi antara pemulihan fungsional dan skor NIHSS lebih lemah ketika stroke diisolasi ke korteks (Glymour et al., 2007).

### **2.11 Modified Rankin Scale (mRS)**

Dalam menilai luaran klinis pasien stroke iskemik, dapat digunakan uji mRS yang merupakan skala pengukuran yang dapat dipercaya yang memberi penilaian yang lebih efektif terhadap pemulihan fungsional setelah stroke. Skala mRS lebih baik untuk mengukur ketergantungan dari performa aktivitas spesifik, dalam hal ini terdiri dari 6 derajat yaitu 0-5 dimana 0 tidak ada gejala dan 5 berarti cacat/ketidakmampuan yang berat dan 6 adalah kematian. Skala mRS lebih sensitive untuk penilaian pada penderita dengan disabilitas ringan dan sedang (Broderick et al., 2017). Studi de Havenon A., et al. (2021) menyimpulkan gambaran spektrum tingkat pasien dari perubahan mRS dari hari ke 90 sampai 1 tahun setelah stroke iskemik dalam 3 percobaan acak berkualitas tinggi. Pergeseran tingkat pasien terdiri dari jumlah peningkatan dan penurunan mRS yang cukup diimbangi, yang menutupi evolusi klinis yang terjadi pada lebih dari sepertiga pasien (De Havenon et al., 2021). Berbagai jenis bukti membuktikan validitas dan reliabilitas mRS. Data yang dilaporkan mendukung pandangan bahwa mRS adalah instrumen berharga untuk menilai dampak perawatan stroke akut (Banks & Marotta, 2007).



### 2.13 Kerangka Konsep Penelitian



**Gambar 2.7 Kerangka Konsep Penelitian**