

Apoptosis Neuronal pada Penyakit Neurodegeneratif

Sigit Sutanto

Koasisten Bagian Neurologi
Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia

Abstrak

Selama dekade terakhir, penelitian mengenai mekanisme apoptosis yang kompleks pada kerusakan sel saraf akut maupun kronik telah mengalami banyak kemajuan. Mekanisme apoptosis yang terdiri atas berbagai jalur telah banyak dimengerti, hal itu membuka kemungkinan untuk menghambat jalur tersebut untuk membatasi kerusakan yang diakibatkan kematian sel. Selain trauma saraf akut dan iskemia, penyakit neurodegeneratif kronik seperti Alzheimer, Huntington, Parkinson, dan Lou-Gehrig (*amyotrophic lateral sclerosis*; ALS) juga menarik perhatian mengingat kesamaan proses yang terjadi yakni apoptosis neuronal.

Kata kunci : kematian sel terprogram, neuronal, kaspase, proses neurodegenerasi.

Neuronal Apoptosis in Neurodegenerative Diseases

Abstract

During the last decade, the investigation of complicated apoptotic mechanisms in the acute and chronic neuronal cells' injury have been improved significantly. The understanding of apoptosis events and its regulation indicate a possible alternate pathway to inhibit the neuronal cells' death. Beside the acute neuronal trauma and ischemia, chronic neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Huntington's, Parkinson's and amyotrophic lateral sclerosis (ALS; Lou Gehrig's disease) are of particular interest due to the same cause of neuronal apoptosis underlying the diseases. This article will deal with the basic mechanisms of neuronal apoptosis of the above-mentioned disorders. Furthermore, the potential as well as the limitation in clinical applications will be discussed. Finally, this article will also discuss potential implications for the neuronal degenerative diseases' future studies.

Keywords: programmed cell death, neuronal, caspases, neurodegeneration.

Pendahuluan

Pada manusia sebagai organisme multiselular, jumlah sel sangat terkendali dan pengendaliannya diatur melalui kecepatan pembelahan sel dan kematian sel. Sel yang tidak lagi diperlukan akan mati dengan mengaktifkan program "bunuh diri" intraselular. Fenomena ini dinamakan kematian sel terprogram (*programmed cell death*) atau apoptosis. Hal itu pertama kali dideskripsikan oleh Kerr et al.¹ pada tahun 1972. Tipe kematian sel lainnya ialah nekrosis, yang merupakan kematian sel akibat faktor eksternal misalnya trauma. Sel yang mengalami nekrosis biasanya membengkak dan pecah, melepaskan komponen intrasel yang

memicu proses inflamasi ke sekelilingnya.^{1,2} Bila sel hidup diibaratkan bola lampu yang menyala, apoptosis ialah matinya bola lampu tersebut secara meredup perlahan, sedangkan nekrosis mematikan bola lampu dengan memecahkannya.³ Pada keadaan normal, antara apoptosis dan pembelahan sel (mitosis) berada dalam keadaan seimbang. Oleh satu dan lain hal, keseimbangan itu dapat terganggu. Bila apoptosis ditekan, akan terjadi pembelahan sel tak terkendali, seperti pada keganasan. Sebaliknya bila apoptosis tidak terkendali, akan terjadi degenerasi atau kematian sel masif dan kontinyu, seperti pada penyakit-penyakit neurodegeneratif.³⁻⁵

Dalam konteks fisiologis, apoptosis tidak hanya bertanggungjawab dalam pemeliharaan ukuran dan jumlah sel pada jaringan proliferasif seperti kulit, mukosa usus atau sistem imun, namun juga berperan penting selama perkembangan sistem saraf pusat dan tepi. Apoptosis neuronal terjadi antara lain saat pembentukan sinaps, berfungsi membuang sel-sel saraf yang tidak diperlukan sehingga terbentuk jaring yang teratur sesuai sel target yang memerlukan inervasi.¹⁻³

Degenerasi sel saraf merupakan ciri utama penyakit saraf akut maupun kronik. Kematian sel selama perjalanan penyakit neurodegeneratif kronik banyak memenuhi kriteria apoptosis. Karenanya perkembangan strategi terapeutik untuk penyakit neurodegeneratif memerlukan pemahaman mekanisme molekular yang mendasari apoptosis neuronal.

Pada makalah ini akan dibahas mengenai dasar mekanisme apoptosis, peranan apoptosis neuronal pada penyakit neurodegeneratif, potensi aplikasi klinis dan keterbatasannya serta prospektif masa depan pada studi dan strategi terapi penyakit neurodegeneratif.

Mekanisme Dasar Apoptosis Neuronal

Pada apoptosis terjadi rangkaian reaksi biokimia mengaktifkan protease yang menghancurkan molekul yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidup sel serta memperantarai program "bunuh diri" sel. Pada proses tersebut, sitoplasma berkondensasi, terjadi agregasi antara mitokondria dan ribosom, agregasi kromatin, dan kondensasi nukleus. Setelah mati, sel berfragmen menjadi badan apoptotik (*apoptotic bodies*) dan kromosom DNA secara enzimatis membelah menjadi fragmen internukleosomal. Ciri lain ialah terjadinya reduksi potensial membran mitokondria, asidifikasi intrasel, pembentukan radikal bebas, serta eksternalisasi residu fosfatidilserin.³ Badan apoptotik mengalami opsonisasi *in vivo* oleh sel sekitar tanpa disertai inflamasi karena integritas membran plasma dan organel sel terpelihara sehingga pelepasan komponen intrasel yang memicu inflamasi tidak terjadi selama proses apoptosis.^{1,5}

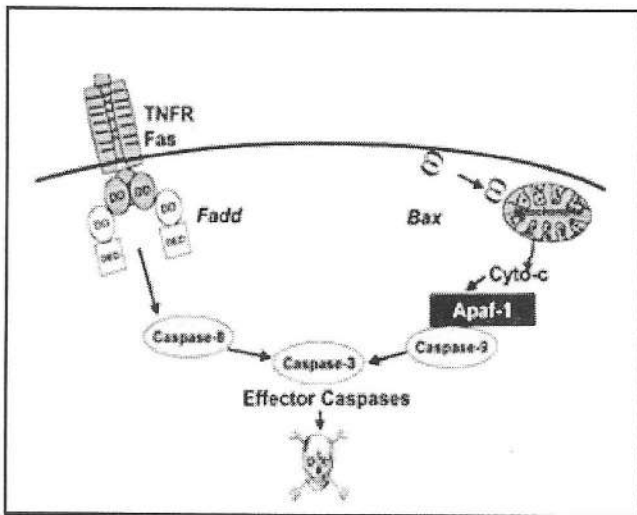
Perubahan morfologis dan biokimia selama apoptosis diperantarai oleh kelompok enzim protease sistein intrasel yang dinamakan *cysteine aspartyl-specific proteases* (kaspase), yang memotong substratnya pada residu aspartat. Kaspase disintesis intrasel dalam bentuk prekursor inaktif (prokaspase), yang dapat diaktifkan dengan cara memutus gugus aspartat oleh kaspase lain. Bila telah diaktifkan, kaspase akan mengaktifkan kaspase lainnya sehingga terjadi serangkaian proses kaspase proteolitik. Telah dikenal setidaknya 14 jenis kaspase, 11 diantaranya ditemukan pada genom manusia. Kaspase biasanya digolongkan menjadi kaspase inisiator (*upstream*) dan kaspase efektor (*downstream*) berdasarkan karakteristik prodomain terminal-N yang dimilikinya. Kaspase inisiator (misalnya kaspase-1, -8, dan -9) dapat berinteraksi dengan protein aktivator lain melalui prodomain panjang yang dimilikinya. Sementara kaspase efektor dengan prodomain pendek sampai saat ini belum sepenuhnya diketahui fungsinya (misalnya kaspase-3). Kaspase-8, suatu inisiator pada jalur sinyal ekstrinsik, mengandung protein yang dinamakan *death effector domain* (DED) pada bagian N terminal. DED dapat berinteraksi dengan protein DED lain (setidaknya 12 protein DED telah dikenal sampai saat ini). Salah satu kelompok protein DED yakni Fadd mengandung protein yang dinamakan *death domain* (DD) yang berinteraksi dengan reseptor kelompok *tumor necrosis factor* (TNF) dan saat ini telah dikenal 24 macam protein DD.^{1,5,10}

Apoptosis secara umum terjadi melalui dua jalur, yakni ekstrinsik dan intrinsik. Jalur ekstrinsik diinisiasi oleh aktivasi reseptor sitokin kelompok *tumor necrosis factor* (TNF) pada permukaan sel, sementara jalur intrinsik bergantung pada integritas dan fungsi mitokondria sel.^{1,2} Dalam kenyataannya terdapat persilangan antar jalur (*crosstalk*) mediator-mediator apoptosis intrinsik maupun ekstrinsik.⁴

Aktivasi prokaspase dipicu secara ekstrinsik dengan cara aktivasi reseptor kematian sel yang terletak di membran plasma sel. Sebagai contoh, limfosit pembunuh dapat menginduksi apoptosis dengan cara memproduksi protein yang dinamakan *Fas ligand* yang berikhtan dengan protein reseptor kematian *Fas* pada permukaan sel target. Protein

Fas yang berkelompok kemudian merekrut protein adaptor intraselular untuk mengikat dan mengumpulkan molekul-molekul prokaspase-8, yang kemudian saling memecah dan mengaktifkan satu sama lain. Molekul kaspase-8 aktif kemudian mengaktifkan prokaspase efektor dibawahnya untuk memulai apoptosis.²

Pada sel saraf, terdapat bukti adanya aktivasi kaspase-8 setelah diberikan stimuli kematian, sementara induksi apoptosis oleh ligand dan reseptornya masih kontroversial. Penelitian menggunakan hewan coba tikus transgenik mencoba membuktikan relevansi jalur transduksi sinyal intrinsik apoptosis neuronal. Kerusakan DNA pada tikus transgenik dapat meningkatkan ekspresi gen supresor tumor p53. Protein p53 dapat mengaktifkan transkripsi gen yang mengkode protein yang membebaskan sitokrom c mitokondria.^{6,10} Reseptor faktor pertumbuhan saraf p75 (p75 *nerve growth factor receptor*, p75NGFR) ternyata juga mengandung sejenis DD dan dibawah pengaruh tertentu dapat mencetuskan apoptosis pada sel saraf.^{2,6}



Gambar 1. Jalur apoptosis ekstrinsik (kiri) dan intrinsik (kanan). Jalur ekstrinsik dipicu reseptor sitokin kelompok TNF seperti Fas. Jalur intrinsik dipicu pelepasan sitokrom c dari mitokondria, dicetuskan oleh berbagai stimuli, termasuk peningkatan kadar protein kelompok Bcl-2 seperti Bax. Pada sitosol, sitokrom c berikatan dan mengaktifkan Apaf-1, kemudian mengikat dan mengaktifkan prokaspase-9. Kaspase-9 aktif (intrinsik) dan kaspase-8 (ekstrinsik) kemudian pecah dan mengaktifkan kaspase-3, yang kemudian mengeksekusi apoptosis.

(Diadaptasi dari Reed²)

Perubahan fungsi mitokondria yang kemudian mencetuskan apoptosis dikendalikan oleh protein kelompok Bcl-2. Kelompok Bcl-2 tersebut ada yang bersifat pro-apoptotik misalnya Bax, Bad, Bid dan anti-apoptotik misalnya Bcl-2, Bcl XL. Keseimbangan antara kelompok pro dan anti-apoptotik Bcl-2 menentukan sensitivitas sel terhadap stimuli apoptotik.⁴ Terdapat kelompok protein yang berikatan dengan kelompok Bcl-2, diantaranya memiliki aktivitas antiapoptotik yakni kelompok BAG. Telah diidentifikasi enam anggota kelompok BAG pada manusia, seluruhnya berikatan dengan *chaperon heat shock protein 70* (Hsp70) melalui ranahnya dan menghubungkan respons stres selular dengan program apoptosis. Pada sel saraf, BAG1 diidentifikasi sebagai neuroprotektan yang kuat dan pengatur diferensiasi sel saraf. Secara *in vivo*, BAG1 memperantarai pertahanan terhadap *stroke* dan meningkatkan ekspresi Hsp70 pada tingkat posttranskripsional.

Protein lain yang berikatan dengan Bcl-2 yang juga memiliki aktivitas neuroprotektif ialah *bifunctional apoptosis regulator* (BAR). BAR merupakan protein multidomain yang pertama kali ditemukan sebagai inhibitor kematian sel yang diinduksi Bax. BAR mampu menghambat apoptosis yang diinduksi reseptor kelompok TNF (jalur ekstrinsik) maupun apoptosis mitokondria-dependen (jalur intrinsik). Interaksi BAR dengan Bcl-2 atau Bcl-XL dapat membantu kemampuan anti-apoptotik BAR. Protein BAR juga memiliki ranah yang mirip dengan ranah efektor kematian sel klasik yang dinamakan *pseudo DED* yang memperantarai pengikatan kaspase-8, sehingga BAR memberi kesan dapat berfungsi sebagai penghubung komponen jalur ekstrinsik dan intrinsik. *Bax inhibitor-1* (BI-1), suatu protein dengan enam ranah transmembran, muncul sebagai senyawa anti-apoptotik pada tumbuhan dan baru-baru ini diidentifikasi sebagai antigen penting pada glioma manusia. Fungsinya pada sel saraf belum sepenuhnya diketahui.⁴

Sitokrom c pada jalur intrinsik setelah dilepaskan dari mitokondria membentuk kompleks oligomer bersama *apoptotic protease activation factor-1* (Apaf-1) dan kaspase-9 yang dinamakan apoptosom, kemudian mengaktifkan kaspase-9.

Interaksi kaspase-9 dan Apaf-1 diperantarai ranah *caspase-associated recruitment domain* (CARD) yang terkandung dalam kedua protein tersebut. Setelah berikatan dengan Apaf-1, beberapa prekursor kaspase-9 inaktif terbawa saling berdekatan satu sama lain. Karena memiliki aktivitas protease, molekul prekursor kaspase yang bergabung akan saling memecah sehingga menjadi bentuk aktif. Selain prokaspase dengan ranah CARD (kaspase-1, -2, -4, -5 dan -9), genom manusia juga mengekspresikan setidaknya 20 protein CARD yang dapat mempercepat atau menahan apoptosis. Kaspase-9 aktif membelah dan mengaktifkan kaspase-3 efektor, yang bertanggung jawab terhadap eksekusi program bunuh diri sel.^{4,6}

Selain protein Bcl-2 dan CARD dengan efek pro- dan antiapoptosis, dikenal juga kelompok supresor apoptosis yang dinamakan *inhibitor of apoptosis proteins* (IAP) dengan ranah *baculovirus*

IAP repeat (BIR). Dikenal enam anggota IAP pada manusia, setidaknya ada satu yang diekspresikan pada sel saraf (IAP neuronal). IAP mencegah aktivasi kaspase efektor yang tidak dikehendaki, sehingga rangkaian proses apoptosis hanya terjadi setelah ada stimuli yang sesuai.¹¹

Banyak jalur sinyal yang tidak secara langsung berhubungan dengan proses apoptosis, namun mampu mempengaruhi atau menahannya. Jalur itu termasuk PI3K/Akt dan jalur proteinkinase yang diaktivasi mitogen. Sinyal anti-apoptotik lain diperantarai oleh c-jun amino terminal kinase (JNK) atau aktivasi faktor transkripsi seperti *cAMP-responsive element binding protein* (CREB) dan NF- κ B.¹⁻³

Protein kunci dalam proses apoptosis neuronal yang telah dibahas diatas dirangkum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Kelompok Protein Penting dalam Apoptosis Neuronal.

| Kelompok Protein | Anggota yang telah teridentifikasi | Fungsi |
|------------------|--|--|
| Kaspase | 14 kaspase, 11 kaspase pada genom manusia | membelah substrat pada residu Asp dan memperantarai apoptosis |
| DED | 12 jenis | interaksi protein pada rangkaian apoptosis, misalnya kaspase-8/Fadd |
| DD | 24 jenis, Fadd yang terpenting, mengandung DD dan DED | interaksi protein pada rangkaian apoptosis, misalnya Fadd/kelompok reseptor TNF |
| Sitokrom c | protein tunggal | dilepaskan mitokondria, membentuk apoptosom bersama Apaf-1 dan kaspase-9 |
| Bcl-2 | 25 jenis, bersifat pro- dan anti-apoptosis | membentuk homo-heterodimer, mengendalikan kematian sel dengan mengatur pelepasan protein berikatan dengan Bcl-2 dan Hsp70, |
| BAG | 6 jenis pada genom manusia | menghubungkan respons stres selular dengan program apoptosis |
| BAR | belum diketahui anggota lainnya | berikatan dengan Bcl-2 dan kaspase-8, menghubungkan jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik |
| BI-1 | belum diketahui anggota lainnya | inhibitor kematian yang diinduksi Bax |
| CARD | setidaknya 20 jenis | pembentukan apoptosom |
| IAP | 6 jenis pada manusia, setidaknya satu jenis terekspresi pada sel saraf | menginhibisi kaspase aktif |

Keterangan : Kaspase, *cysteine aspartyl-specific proteases*; DED, *death effector domain*; DD, *death domain*; Bcl-2, *B-cell lymphoma-2*, BAR, *bifunctional apoptosis regulator*; BI-1, *Bax inhibitor-1*; CARD, *caspase-associated recruitment domain*; IAP, *inhibitor of apoptotic proteins*. (diadaptasi dari Kermer P et al²⁰)

Apoptosis Neuronal pada Penyakit Neurodegeneratif

Pada penyakit neurodegeneratif yang telah disebutkan, insidens apoptosis neuronal selama perjalanan penyakit ditunjukkan oleh penelitian terhadap model hewan dan kultur jaringan. Penelitian pada jaringan otak manusia post mortem sulit untuk mendapatkan bukti proses apoptosis. Kesulitan menunjukkan bukti apoptosis pada otak itu dapat dijelaskan oleh fakta bahwa kematian sel pada penyakit kronik ini telah berlangsung bertahun-tahun, sementara program bunuh diri pada sel tunggal dilaksanakan hanya dalam beberapa jam, sehingga deteksi sejumlah sel saraf apoptotik pada suatu kurun waktu tampaknya mustahil dilakukan. Selain itu hanya sedikit studi yang menggunakan senyawa yang mempengaruhi rangkaian proses apoptosis pada penyakit neurodegeneratif. Spesifisitas dan sensitivitas yang rendah pada senyawa tersebut memberikan efek samping yang tak diinginkan dan mengganggu hasil penelitian. Sebaliknya, penelitian pada hewan coba mengenai mekanisme patologis apoptosis neuronal pada penyakit neurodegeneratif hereditas terbukti sangat bermanfaat dan seringkali membuktikan kaitan antara apoptosis dengan stres oksidatif dan disfungsi mitokondria.⁷⁻⁹ Dibawah ini akan dibahas keterlibatan apoptosis neuronal pada penyakit Alzheimer, *amyotrophic lateral sclerosis* (ALS), penyakit Huntington, dan penyakit Parkinson.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)

ALS (penyakit Lou-Gehrig) merupakan salah satu penyakit motorneuron tersering dengan onset pada usia dewasa. Insidens diperkirakan 1-2 per 100.000 orang. ALS ditandai oleh kehilangan motorneuron progresif pada korteks dan kornu anterior pada medula spinalis. Paralisis progresif seluruh ekstremitas serta otot pernafasan dapat berakibat kematian dalam 3-5 tahun setelah timbulnya penyakit.¹²

Seperti kasus penyakit neurodegeneratif lain, stres oksidatif, aktivasi berlebihan reseptor glutamat, dan kelebihan beban (*overload*) kalsium diduga sebagai mekanisme kausatif. Pada kasus

hereditas autosom dominan (sekitar 5% dari seluruh kasus), mutasi gen pada penyandi superoksida dismutase telah diidentifikasi. Enzim itu secara fisiologis mendesak efek anti-oksidatif dan sitoprotektif serta berperan sebagai *scavenger radical* bebas. Ada empat hipotesis berbeda terhadap perubahan superoksida dismutase menjadi neurotoksik: (1) dengan pembentukan radikal hidroksil; (2) nitrosilasi residu tirosin pada protein dengan derivat peroksinitrit; (3) toksisitas tembaga dan seng; dan (4) agregasi patologis protein dengan pembentukan badan inklusi. Seluruh hipotesis tersebut menuju pada peningkatan stres oksidatif, mengakibatkan disfungsi mitokondria dan aktivasi apoptosis jalur intrinsik pada sel saraf yang berkaitan.^{11,14}

Peningkatan ekspresi protein pro-apoptotik Bax, bersamaan dengan penurunan ekspresi Bcl-2, dan juga fragmentasi DNA telah ditemukan pada tikus transgenik model ALS dan kornu anterior medula spinalis postmortem pasien ALS. Peningkatan aktivitas kaspase-1 dan -3 juga ditemukan pada korteks motorik dan medula spinalis penderita ALS. Rangkaian apoptosis pada ALS ditegaskan dengan kenyataan bahwa inhibitor kaspase bersifat neuroprotektif baik pada model hewan maupun kultur jaringan. Selain mekanisme diatas, diketahui ada kontribusi gen supresor tumor p53 terhadap degenerasi sel saraf penderita ALS, namun hal itu masih merupakan kontroversi.¹⁴

Penyakit Alzheimer

Penyakit Alzheimer menyebabkan demensia yang menyerang sekitar 10% populasi orang berumur diatas 65 tahun dan 50% diatas umur 85 tahun. Gejala klinis klasik penyakit Alzheimer meliputi gangguan memori tipe amnestik, kemunduran berbahasa, dan defisit visuospasial. Gangguan motorik dan sensorik, gangguan berjalan, serta kejang dapat terjadi pada fase lanjut.¹⁵

Degenerasi sel saraf pada basal otak depan, hipokampus dan korteks patognomonik pada penyakit itu. Selain peningkatan densitas sinaptik dan degenerasi neuron, otak pasien dengan Alzheimer menunjukkan perubahan karakteristik histologis pada tingkat neuronal, misalnya pembentukan plak senilis (*senile plaq. e*) yang

tersusun atas protein beta-amiloid. Di bagian sentral tiap plak terdapat kumpulan jaringan saraf yang berdegenerasi membentuk sebuah lingkaran prosesus neuron yang abnormal yang mengelilingi terminal sinaps. Bagian ini berisi neurofibril intraselular yang sangat banyak, kusut dan melingkar, serta membentuk anyaman neurofibrilar.

Anyaman neurofibrilar tersebut merupakan agregasi protein tau mikrotubular yang mengalami hiperfosforilasi.¹⁶

Perubahan metabolisme beta-amiloid dipercaya berperan penting dalam proses patologi.

Beta-amiloid dibentuk melalui pemecahan protein prekursor amiloid, yang mengalami kerusakan akibat mutasi gen pada penyakit Alzheimer. Pada Alzheimer diketahui terjadi mutasi pada gen 1 dan 2 presenilin. Mutasi ini juga mengubah pemecahan proteolitik normal dari protein prekursor amiloid. Paparan terhadap beta-amiloid menginduksi apoptosis pada sel saraf. Kematian sel didahului oleh aktivasi kaspase dan perubahan tingkat aktivitas protein kelompok Bcl-2. Mekanisme induksi kematian sel oleh beta-amiloid turut melibatkan peroksidasi lipid membran, stres oksidatif yang dicetuskan influks kalsium serta disfungsi mitokondria.¹⁵

Penurunan ekspresi faktor neurotrofik *nerve growth factor* (NGF) dan *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) ditemukan pada studi postmortem jaringan otak penderita Alzheimer. Penurunan kadar faktor neurotrofik endogen terbukti meningkatkan kepekaan sel saraf terhadap stres oksidatif serta berperan mengurangi densitas sinaps. Seperti kasus penyakit neurodegeneratif lainnya, fragmentasi DNA, aktivasi kaspase, dan ekspresi gen yang berkaitan dengan apoptosis juga ditemukan. Pada kasus Alzheimer, beberapa hal masih belum sepenuhnya dipahami, misalnya belum jelas apakah proses apoptosis secara langsung bertanggung jawab terhadap kematian sel saraf. Apoptosis mungkin bukan penyebab utama degenerasi neuronal pada Alzheimer, namun kematian sel terprogram tampaknya berperan dalam perjalanan perburukan penyakit ini selanjutnya. Karena itu penghambatan apoptosis masih merupakan perhatian utama dalam strategi terapeutik yang terus dikembangkan, mengingat saat ini belum ada terapi efektif bagi penyakit tersebut.^{10,15}

Penyakit Huntington

Penyakit Huntington merupakan kelainan neurodegeneratif yang diturunkan secara autosom dominan, dengan prevalensi sekitar lima per 100.000 orang di Eropa Barat. Penyakit itu menyebabkan disfungsi motorik, ditandai dengan gerakan abnormal khas (korea Huntington), berakibat pada perburukan progresif pada pergerakan volunter terkordinasi. Bersama dengan restriksi kognitif progresif, yang sering menyebabkan demensia, penyakit tersebut biasanya fatal pada 15-20 tahun setelah onset. Mutasi gen huntingtin diidentifikasi sebagai penyebab.^{5,17}

Fungsi fisiologis protein huntingtin masih belum diketahui. Mutasi gen huntingtin ditandai dengan pengulangan penyandi sekuens trinukleotida CAG untuk asam amino glutamin, yang berakibat pada pembentukan badan inklusi dan degenerasi terutama neuron GABAergik di striatum. Individu dengan pengulangan 35 kali atau kurang biasanya asimtomatik, sedangkan pengulangan CAG 36 kali atau lebih diketahui menimbulkan gejala. Makin dini onsetsnya makin banyak pengulangan CAG yang terjadi. Hingga kini belum ada terapi kausal.¹⁷

Dragunow *et al*¹⁶ untuk pertama kali menunjukkan adanya pemecahan rantai DNA pada sel saraf yang terkena. Pemecahan rantai DNA tersebut kemudian menjadi petanda non-spesifik apoptosis. Selain itu, huntingtin mutan ternyata dapat mengaktifkan jalur sinyal JNK yang kemudian menuju rangkaian proses apoptosis neuronal. Huntingtin juga merupakan substrat bagi kaspase-3 efektor. Bila asam amino eksitatorik seperti kainat diinjeksikan pada striatum hewan coba akan tampak gejala menyerupai penyakit Huntington, sehingga eksotoksisitas juga dipertimbangkan sebagai faktor patogenetik pada penyakit itu.

Inhibisi pada kaspase-1 terbukti bermanfaat selama perjalanan penyakit pada model tikus dengan penyakit Huntington. Baru-baru ini ditunjukkan bahwa huntingtin mutan memiliki penurunan afinitas terhadap partner pengikatnya yakni *Huntingtin interacting protein-1* (Hip-1). Hip-1 bebas berinteraksi dengan *Hip-1 protein*

interactor (HIPPI) melalui ranah pseudo DED dan berikatan dengan protein DED kaspase-8 dalam suatu kompleks, ketika rangkaian apoptosis diduga dimulai. Karena sampai kini terapi kausal untuk penyakit ini belum tersedia, pengaturan rangkaian apoptosis dipertimbangkan sebagai intervensi terapeutik yang menjanjikan.^{16,20}

Penyakit Parkinson

Penyakit Parkinson disebabkan kehilangan 50-60% neuron dopaminergik pada substansia nigra dalam waktu 10-20 tahun. Penyakit itu ditandai dengan trias tremor, rigor, dan akinesia dengan aksentuasi gejala yang berbeda pada tiap individu. Insidensnya sekitar satu per 5000 orang pada usia diatas 50 tahun. Secara umum pada penyakit Parkinson terjadi defisit dopaminergik. Defisit dopaminergik itu untuk sementara dapat dikompensasi dengan pemberian obat oral prekursor L-Dopa, agonis dopamin dan substansi lain, namun terapi kasual yang menjanjikan saat ini belum tersedia.¹⁷

Jaringan otak postmortem pasien Parkinson menunjukkan sel apoptotik dan fragmentasi DNA pada substansia nigra. Proses itu diduga merupakan proses apoptosis yang dilaksanakan oleh kaspase-3. Dilaporkan bahwa kaspase-3 merupakan faktor penting dalam kematian sel pada substansia nigra pasien Parkinson. Hal itu diperkuat oleh kenyataan bahwa kaspase inisiator diekspresikan kuat, yang menunjukkan peranannya dalam kematian sel neuron.¹⁸

Mutasi genetik pada protein parkin dan sinuklein menunjukkan kontribusinya terhadap patogenesis penyakit Parkinson. Agregat tak larut sinuklein membentuk komponen yang dinamakan badan Lewy (*Lewy bodies*). Fungsi fisiologis sinuklein belum dipahami sepenuhnya, diduga berperan dalam konversi vesikel sinaptik dan plastisitas sinaptik. Mutasi gen Parkin menimbulkan kehilangan fungsi protein itu. Sebagai suatu E3-ligase, Parkin terlibat dalam ubiquitinasi protein dan degradasi oleh komplekproteosom s. Substrat protein Parkin seperti CDCrel-1 dan sinfilin-1 dapat ditemukan pada badan Lewy.¹⁷

Akumulasi patologis protein *misfolded* dalam sel yang mengakibatkan mutasi salah satu gen yang berujung pada peningkatan neurotoksisitas.

Hipotesis tersebut didukung oleh pengamatan bahwa ekspresi Parkin meningkat dibawah kondisi stres sel. Protein *misfolded* seperti *Parkin-associated endothelin receptor-like receptor* (Paelr) dibuang dari retikulum endoplasmik. Kenyataan bahwa Parkin bekerja sebagai supresor stres oksidatif mungkin menjadi sangat penting bagi neuron dopaminergik di substansia nigra, yang ternyata peka terhadap stres oksidatif. Relevansi stres oksidatif dalam patogenesis penyakit Parkinson didukung penelitian yang menunjukkan defisit glutation anti-oksidatif diikuti dengan minimnya mitokondria kompleks I dan dopamin pada neuron substansia nigra. Rendahnya kadar glutation bertanggungjawab atas kerusakan mitokondria yang akan diikuti apoptosis neuronal.¹⁸

Penelitian apoptosis pada penyakit Parkinson semakin maju dengan penggunaan hewan coba dan kultur jaringan. Digunakan neurotoksin 1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPP+) atau 6-hidroksidopamin (6-OHDA) untuk mendapatkan kondisi hewan coba yang menyerupai penyakit Parkinson. Pada pemberian neurotoksin di atas ditemukan peningkatan aktivitas JNK yang patognomonik apoptosis. Pemberian inhibitor JNK (CEP-1347) secara simultan terbukti bersifat neuroprotektif. Selain aktivasi kaspase-3 pada neuron dopaminergik, peningkatan ekspresi Bax dapat ditemukan pada model diatas dengan jelas.

Hewan coba yang mengekspresi protein Bcl-2 protektif secara berlebih terbukti resisten terhadap stimuli kematian sel pada penyakit Parkinson. Protein Parkin baru-baru ini diidentifikasi sebagai substrat kaspase-3 yang membuktikan relevansinya dalam proses apoptosis neuronal penyakit Parkinson.^{17,20}

Penyebab dasar proses penyakit Parkinson belum sepenuhnya dipahami. Disfungsi mitokondria dengan inisiasi rangkaian apoptosis yang ditimbulkannya memainkan peranan penting dalam hampir semua model patogenesis penyakit Parkinson. Strategi terapeutik saat ini ditujukan untuk menstabilkan dan melindungi fungsi mitokondria dari pengaruh stres oksidatif.¹⁷

Kemajuan Penelitian, Strategi Terapeutik dan Keterbatasannya

Penelitian mengenai penyakit neurodegeneratif di atas masih terus berlangsung. Saat ini penggunaan model hewan dan kultur jaringan masih merupakan pilihan utama untuk mendapatkan gejala klinis yang menyerupai penyakit neurodegeneratif. Dari sejumlah senyawa anti-apoptosis yang ada, baru sedikit yang digunakan pada objek manusia. Senyawa itu antara lain faktor neurotrofik, agen stabilisator mitokondria, anti-oksidan, antitoksin, antibiotik, reseptor glutamat, dan penyekat saluran kalsium (*calcium channel blocker*) sebagai inhibitor kaspase.

Salah satu obat anti-apoptosis yang diakui FDA dalam penggunaan klinis ialah Akatinol® (memantin). Awalnya obat ini dirilis 10 tahun lalu untuk terapi Parkinson dan demensia. Obat ini mengalami “renaisans” setelah sukses melalui trial fase III terhadap terapi Alzheimer. Memantin diklasifikasikan sebagai inhibitor non-kompetitif reseptor glutamat tipe-NMDA yang terbukti mampu mengganggu proses apoptosis yang diinduksi glutamat. Saat ini derivatnya sedang dikembangkan agar kemampuan neuroprotektifnya lebih optimal dan mengurangi efek samping.²⁰

Selain memantin, dikenal juga minosiklin sebagai senyawa antiapoptosis. Minosiklin merupakan tetrasiklin generasi kedua dengan kemampuan neuroprotektif yang nyata. Minosiklin bersifat neuroprotektif dan mampu menurunkan derajat keparahan cedera jaringan akibat iskemia dan disfungsi neurologis yang diakibatkannya. Minosiklin mampu menginhibisi iskemia yang dipicu NO sintase, kaspase-1 dan mikrogliosis reaktif. Efek neuroproteksinya telah diteliti pada model tikus dengan penyakit Huntington, ALS, trauma serebral, penyakit Parkinson dan multipel sklerosis.

Mekanisme utama minosiklin adalah menghambat secara langsung pelepasan sitokrom-c, sehingga menghambat proses aktivasi kaspase yang berakibat kematian sel, terutama pada aktivasi kaspase 3. Minosiklin dapat diberikan per oral, mampu menembus sawar otak, dan terbukti aman

pada manusia. Saat ini sedang dilakukan uji klinis pada pasien penyakit Huntington dan ALS.¹⁰

Seringkali dipertanyakan mengapa sekian banyak obat terbukti efektif pada model penelitian gagal memperbaiki penyakit neurodegeneratif pada manusia. Pertama, pasien dan klinikus harus berurusan dengan efek samping yang ditimbulkannya. Efek samping itu sering mengurangi kepatuhan pasien, selain itu telah menggagalkan banyak uji klinis. Profil efek positif dan negatif intervensi terapi erat kaitannya dengan spesifisitas campuran obat, dosis yang digunakan, dan rute pemberiannya. Kesulitan sering terjadi karena obat tidak mampu mencapai otak dalam konsentrasi yang diinginkan tanpa meracuni tubuh, karena untuk melewati sawar otak diperlukan dosis yang tinggi. Sawar otak merupakan penghalang tersulit penghantaran obat menuju SSP terutama yang memiliki berat molekul besar. Selain itu, molekul obat dapat rusak atau inaktif bila diberikan intravena atau oral. Masalah ini jarang terjadi pada model hewan, karena obat biasanya diberikan melalui injeksi stereotaksik langsung ke dalam ventrikel atau dekat dengan lesi.²⁰

Pada model hewan coba, hewan tersebut sebelumnya sehat sehingga saat diberi lesi, hanya daerah itu saja yang sakit. Pada manusia, seringkali pasien neurodegeneratif menderita beberapa penyakit sekaligus, tidak terbatas pada sistem sarafnya saja. Pasien itu diterapi dengan beragam obat, sehingga dapat terjadi interaksi antar obat yang mempersempit pilihan terapi.

Masalah lain yang perlu mendapat perhatian ialah jendela terapeutik (*therapeutic window*). Pada hewan coba, obat diberikan segera setelah lesi, terbentuk pada onset penyakit, atau sebelum gejala timbul. Pada manusia hal itu sulit dilakukan, misalnya pada penyakit Parkinson. Pasien biasanya memberikan gejala bila neuron dopaminergik di substansia nigra telah berkurang hingga 60-80% disertai proses degenerasi neuronal lambat yang setidaknya telah berlangsung satu tahun. Tujuan terapi bukan untuk menyelamatkan sel yang terkena tapi lebih pada pemeliharaan neuron sehat yang tersisa. Kesulitan lain timbul pada perbedaan tipe penyakit Parkinson. Dibedakan antara tipe herediter, idiopatik, toksik, dan sindrom akibat

degenerasi neuron yang tidak hanya terbatas pada substansia nigra tapi juga pada regio otak lain yang terjadi secara bersamaan dan dinamakan atrofi sistem multipel (*multiple system atrophy*).^{20,21} Secara histologis, terdapat keragaman pembentukan badan inklusi Lewy pada manusia. Dengan gejala yang sama, sebenarnya bentuk penyakit Parkinson mewakili entitas yang berbeda dengan jalur patofisiologi yang berbeda pula. Konsekuensinya terapi yang diperlukan juga berbeda.²⁰

Perspektif Masa Depan

Telah diuraikan diatas kesulitan penerapan hasil riset ke dunia klinis. Pendekatan riset dan penanganan klinis terhadap penyakit neurodegeneratif di masa datang lebih dapat ditingkatkan. Interaksi interdisiplin mutlak diperlukan, demikian juga kerjasama erat dengan industri bioteknologi dan farmasi untuk meningkatkan implementasi strategi terapeutik pada uji coba – uji coba klinis.

Model hewan yang dibuat harus lebih mendekati keadaan pada manusia. Selain menguji satu jenis obat, uji kombinasi agen neuroprotektif yang bekerja pada jalur apoptosis yang berbeda akan lebih bermanfaat. Percobaan menggunakan obat kombinasi juga dapat mengurangi efek samping karena obat yang digunakan dapat diturunkan dosisnya atau mengadakan potensiasi dengan obat lain. Pengurangan efek obat yang tak diinginkan dapat dicapai dengan mengubah karakteristik pengikatan protein, menghapus atau menambah ranah, atau memutasi situs pengikatan molekul obat. Tujuan akhir modifikasi protein ialah menciptakan obat sintesis yang dapat menyerupai efek protektif protein alami dan menghindari efek negatifnya. Rekayasa molekul baru diharapkan berguna untuk mengatasi masalah distribusi obat ke organ sasaran. Sawar otak yang utuh mencegah protein memasuki jaringan otak. Menembus sawar otak dengan intervensi bedah hanya mungkin dikerjakan pada sejumlah kecil pasien. Rancangan substansi yang mampu memfasilitasi transpor ke dalam SSP merupakan alternatif yang menjanjikan. Kemungkinan lain ialah merancang vektor virus yang dimodifikasi

secara genetik untuk membawa senyawa terapeutik yang diperlukan. Strategi “*knockdown*” antisense mengurangi ekspresi gen penyakit. Bila cukup spesifik strategi tersebut antara lain potensi untuk terapi penyakit neurodegeneratif hereditas terutama bila protein mutan bertanggung jawab dalam patofisiologinya. Sebagai pilihan alternatif yang masih terus dikembangkan, vaksinasi terhadap protein patologis telah diciptakan dalam studi terhadap pasien Alzheimer. Penelitian pemetaan genetik yang masih terus berlangsung sampai saat ini akan membantu menyempurnakan klasifikasi penyakit neurodegeneratif, sehingga dapat ditemukan terapi yang lebih spesifik terhadap tiap individu sesuai histologi dan patofisiologinya.²⁰

Kesimpulan

Apoptosis atau kematian sel terprogram merupakan mekanisme alamiah organisme multiselular untuk mempertahankan keseimbangan jumlah sel yang dibutuhkan dalam tubuhnya. Pada keadaan normal, ada keseimbangan antara apoptosis dan mitosis sehingga jumlah sel yang fisiologis terpelihara. Pada keadaan tertentu keseimbangan itu dapat terganggu, sehingga berakibat pertumbuhan maupun kematian sel yang tak terkendali.

Pada penyakit neurodegeneratif seperti penyakit ALS, Alzheimer, Huntington, dan Parkinson, pola kematian sel yang terjadi sesuai dengan apoptosis, sehingga pengertian tentang mekanisme dan jalur yang memperantarai apoptosis neuronal menjadi sangat penting dalam strategi terapeutik. Inhibisi maupun manipulasi protein yang berperan penting telah terbukti menghambat proses apoptosis yang implikasi klinisnya memperbaiki prognosis dan survival penyakit. Senyawa anti-apoptosis terus dikembangkan demi mencapai titik terang pengobatan penyakit tersebut.

Penelitian mengenai apoptosis neuronal dalam penyakit neurodegeneratif memiliki beberapa keterbatasan. Perbedaan keadaan umum model hewan dengan pasien sesungguhnya, kesulitan obat menembus sawar otak dalam dosis yang diinginkan tanpa menyebabkan toksisitas, beragamnya varian penyakit dengan mekanisme

patofisiologi yang berbeda sehingga membutuhkan agen terapi yang berbeda pula, serta keterbatasan jenis agen anti-apoptosis yang digunakan merupakan keterbatasan yang terjadi saat ini. Di masa datang hal itu dapat diantisipasi dengan penyempurnaan metode dan alat penelitian, rekayasa molekular agen anti-apoptosis dan vehikulumnya sehingga diharapkan dapat tercipta obat dan strategi terapeutik yang aman dan efektif terhadap penyakit-penyakit neurodegeneratif, yang dampak jangka panjangnya memperbaiki kualitas hidup penderitanya.

Daftar Pustaka

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Walterok. Apoptosis. Dalam : Molecular biology of cell 4th Edition. New York: Taylor & Francis Group. 2002;1010-26.
2. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;157:1415–30.
3. Diunduh dari; WWW.Celldeath-de/encyclo/aporev/aporev.htm.3 Februari 2007
4. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 1998;17:3225–3236.
5. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:120–9.
6. Epstein FH. Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med* 1999; 340: 1970-8.
7. Haslett C, Savill J. Why is apoptosis important to clinicians. *BMJ* 2001;322:1499-1500.
8. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001;322:1536-8.
9. Gibson RM. Does apoptosis have a role in neurodegeneration? *BMJ* 2001;322: 1539–40.
10. Friedlander RM. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. *N Engl J Med* 2003;348:1365-75.
11. Rowland LP, Shneider NA. Medical progress : Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 2001;344:1688-97.
12. Sathasivam S, Ince PG, Shaw PJ. Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: A review of the evidence. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001; 27:257–74.
13. Martin LJ. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: Possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:459–71.
14. Li M, Ona VO, Guegan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, et al. Functional role of kaspase-1 and kaspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 2000; 288:335–9.
15. Roth KA. Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: Causation, correlation, and confusion. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:829–38.
16. Dragunow M, Faull RL, Lawlor P, Beilharz EJ, Singleton K, Walker EB, Mee E. In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *Neuroreport* 1995;6:1053–7.
17. Andersen JK. Does neuronal loss in Parkinson's disease involve programmed cell death? *Bioessays* 2001;23:640–6.
18. Giasson BI, Lee VM. Parkin and the molecular pathways of Parkinson's disease. *Neuron* 2001; 31:885–8.
19. Oertel WH, Bandmann O. Multiple system atrophy. *J Neural Transm Suppl* 1999;56:155–64.
20. Kermer P, Liman J, Weishaupt JH, Bähr M. Neuronal Apoptosis in neurodegenerative diseases: From basic research to clinical application. *Neurodegenerative Dis* 2004;1:9–19.