

Pengaruh Homocystein pada Proses Apoptosis

Sel Saraf Otak Tikus (*Rattus sp*)

Arief Budi Yulianti

D86.0.046/0409076001



Bagian Biologi Medik dan Histologi,
Fakultas Kedokteran, Unisba

2017

1. Latar belakang.

Homocystein (Hcy) adalah asam amino mengandung sulfur dan tidak ada dalam protein atau pun DNA, tetapi merupakan metabolit perantara dari methionine. Peningkatan kadar homocysteine pada plasma akan meningkatkan resiko terjadinya serangan jantung (Prieto, R.G, dkk, 2009) , atherosclerosis, stroke, gagal ginjal dan kemungkinan penyakit Alzheimer (Seshadri, S, dkk, 2002), tetapi bagaimana mekanismenya belum dapat diketahui (Kruman, I, dkk, 2001).

Kadar Hcy dalam plasma dapat dijadikan indikator kesehatan, bila kadarnya lebih dari 15 $\mu\text{mol/L}$ maka resiko terjadinya penyakit jantung, stroke, diabetes, gagal ginjal meningkat. Pada penderita neurodegeneratif pun kadar Hcy dalam plasma meningkat, tetapi perannya belum jelas, diduga Hcy bersifat toksik pada sel-sel otak yang menyebabkan kerusakan sel saraf dan mengakibatkan kematian sel.

Ada dua macam proses kematian sel, pertama disebut necrosis, yaitu kematian sel karena sel mengalami kerusakan, penyebab dapat secara fisik, kimia atau agen biologi. Kedua adalah apoptosis, yaitu kematian sel yang terprogram, misalnya karena sel tersebut sudah tua, atau sel-sel yang mengalami kesalahan program. Untuk mengetahui apakah homocystein menyebabkan kerusakan sel saraf, maka pada penelitian ini akan diamati pengaruh Hcy pada proses apoptosis sel saraf otak tikus.

Sel saraf yang akan diisolasi adalah sel-sel microglia hippocampal dari embrio tikus berusia 18 hari (Kruman, I, 2001). Kemudian kultur sel saraf tersebut dipaparkan pada Hcy dengan kadar dan waktu pemaparan yang berbeda, kemudian diamati kerusakan sel yang terjadi. Apakah ada korelasi antara kadar dan lama paparan Hcy pada kerusakan sel saraf.

1.2.Rumusan Masalah.

1. Mengapa Hcy bersifat toksik pada sel otak, bagaimana prosesnya sehingga sel otak mengalami apoptosis dan akhirnya terjadi kematian sel ?
2. Berapa kadar dan lama paparan Hcy yang dapat merusak sel otak.?

3. Bagaimana metabolisme Hcy, sehingga dapat meningkat dalam darah ?

1.3. Maksud dan Tujuan Penelitian.

Maksud penelitian ini adalah ingin mengetahui apakah homocystein bersifat toksik pada sel-sel saraf yang menyebabkan kerusakan sel dan menyebabkan kematian sel dan bagaimana metabolisme homocystein sehingga meningkat dalam plasma, dan tujuan penelitian ini adalah

1. Mengetahui proses apoptosis yang disebabkan oleh homocystein.
2. Mengetahui kadar dan lama paparan homocystein yang dapat merusak sel otak
3. Mengetahui metabolisme homocystein, sehingga dapat meningkat dalam darah.

2. Homocystein.

Homocystein (Hcy) adalah asam amino mengandung sulfur dengan berat molekul 135.2 Da, dan formulanya, $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$. Homocystein tidak diperoleh dari makanan, tetapi merupakan biosintesa dari methionine dan beberapa asam amino, antara lain cystein, aspartat. (Gambar 1). Ada beberapa jalur metabolisme yang menghasilkan homocystein, yaitu

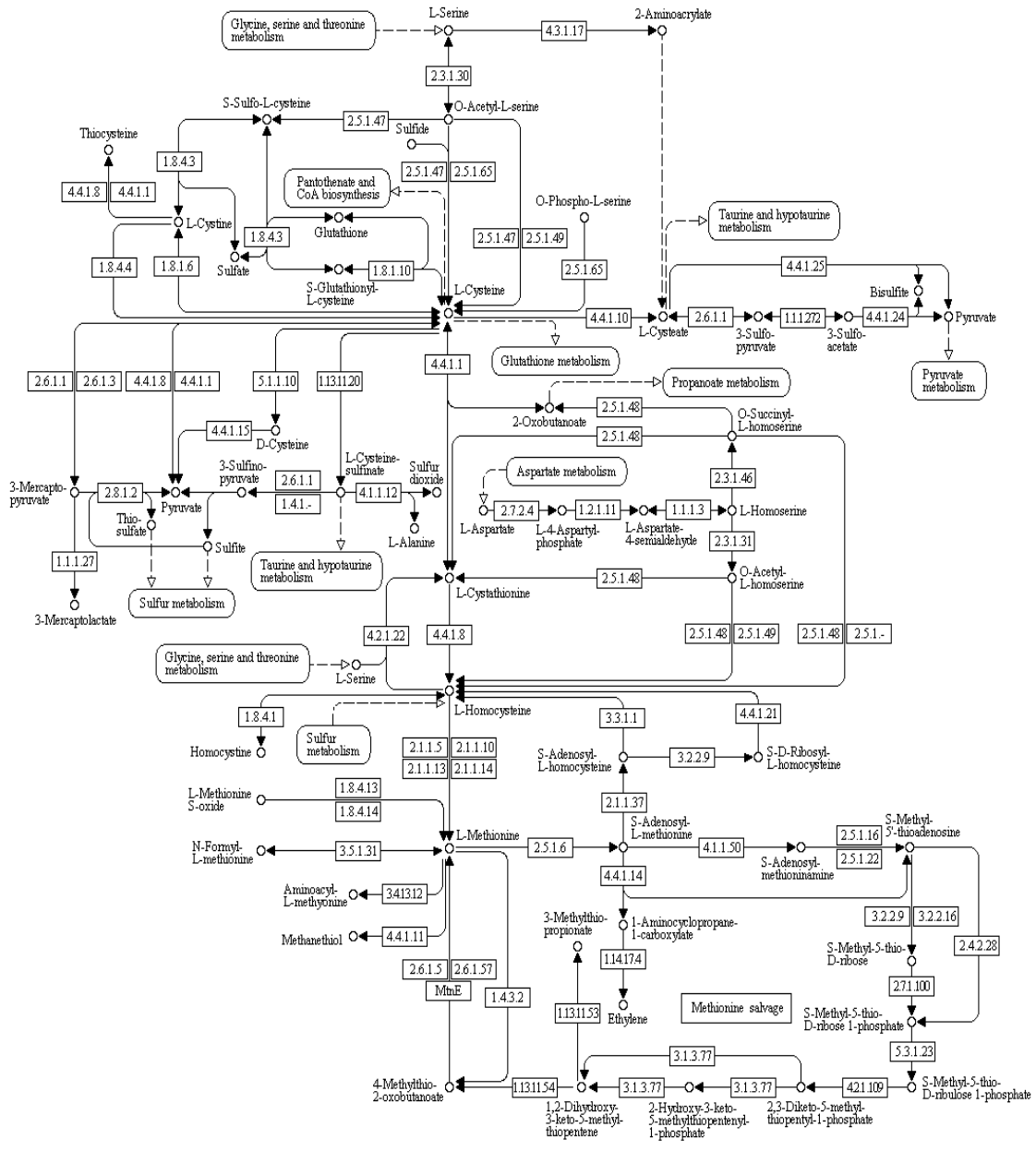
1. L aspartat dimetabolisme dengan bantuan enzim **aspartate kinase** menjadi L aspartyl phosphate, kemudian dimetabolisme kembali dengan bantuan enzim **aspartate-semialdehyde dehydrogenase** menjadi L aspartat 4-semialdehid, kemudian dimetabolisme kembali dengan bantuan enzim **homoserine dehydrogenase** menjadi L homoserine,, kemudian dengan bantuan enzim **homoserine O-acetyltransferase** dimetabolisme menjadi asetil L homoserine, kemudian dengan bantuan enzim **cystathionine gamma-synthase** dan **O-acetylhomoserine (thiol)-lyase** dimetabolisme menjadi L-homocystein.

2. L methionne dimetabolisme dengan bantuan enzim **S-adenosylmethionine synthetase** menjadi S adenosyl methionine, kemudian dimetabolisme kembali dengan bantuan enzim **DNA (cytosine-5-)-methyltransferase** menjadi L adenosyl homocystein, kemudian dimetabolisme kembali dengan bantuan enzim **adenosylhomocysteinase** menjadi L homocystein.
3. L Cystein dimetabolisme dengan bantuan enzim **cystathionine gamma-lyase** menjadi L cystathionine, kemudian dimetabolisme kembali dengan bantuan enzim **cystathionine beta-lyase** menjadi L- homocystein.

Dan homocystein yang terbentuk akan dimetabolisme menjadi methionine.dengan bantuan enzim **betaine-homocysteine S-methyltransferase, 5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase, homocysteine S-methyltransferase, 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate—homocysteine methyltransferase.**

(<http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00270.html>)

CYSTEINE AND METHIONINE METABOLISM



00270 8/28/09
© Kanehisa Laboratories

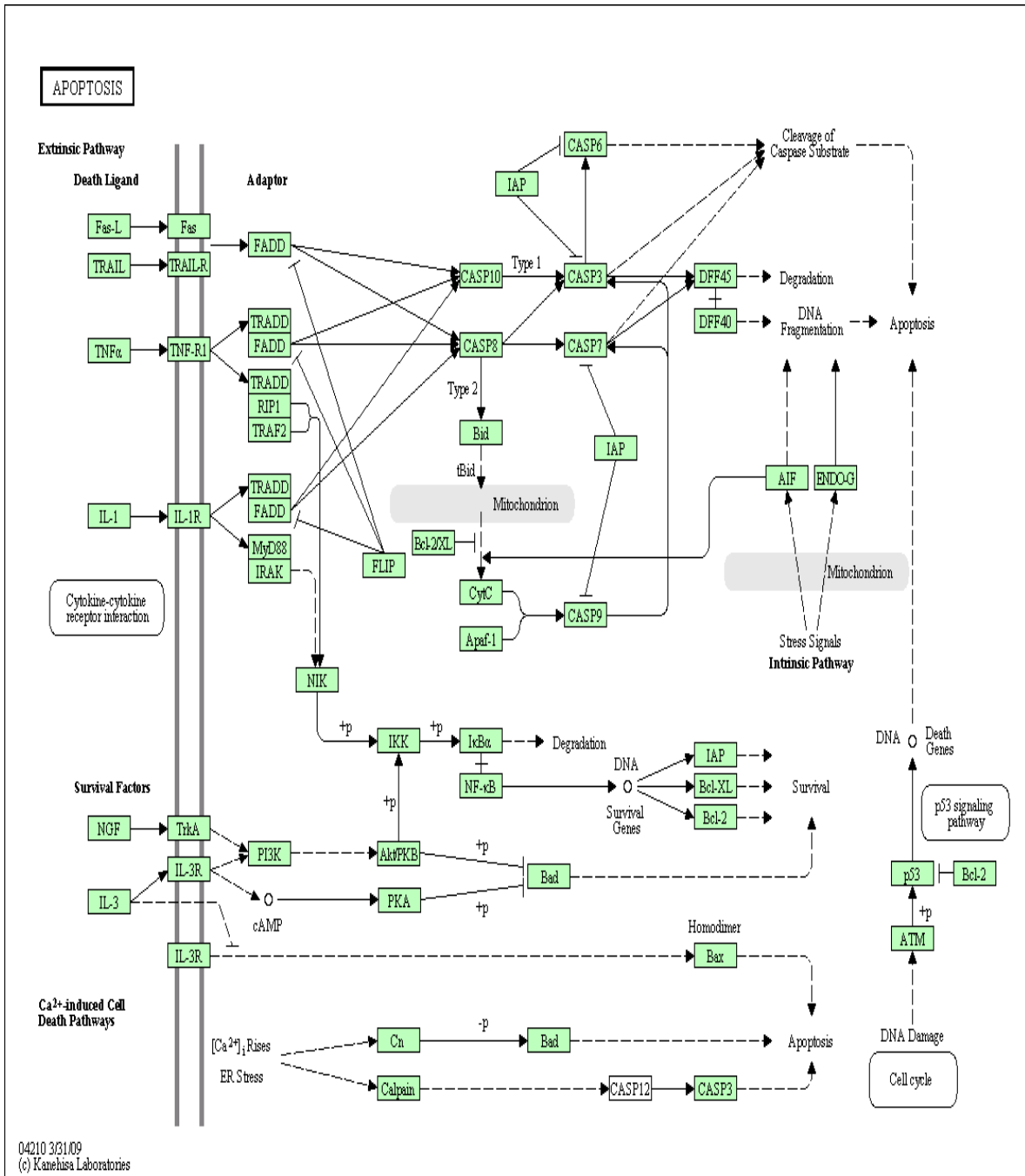
Gambar 1 : Metabolisme cysteine dan methionine

3. Apoptosis.

Apoptosis adalah program kematian sel pada organisme multiselular. Program kematian sel ini melibatkan reaksi biokimia yang akan menyebabkan perubahan morfologi sel, dengan karakteristik perubahannya antara lain, sel mengalami pembengkakan, karena membran sel kehilangan kemampuan mempertahankan ketidaksimetrisan membran dan kemampuan untuk melekatkan molekul, sel mengecil, fragmentasi nuclear, kromosom berkondensasi dan DNA fragmentasi. Apoptosis akan menyelesaikan kematian sel dengan tidak merusak organisme dan ini yang membedakan dengan nekrosis.

.Sel mempunyai sistem imun, dan salah satunya adalah apoptosis, bila sel mengalami kerusakan, maka sel akan melakukan apoptosis dengan tujuan menghilangkan sel rusak dengan membuat suatu lesi yang menyebabkan infeksi tidak menyebar. Apoptosis juga merupakan mekanisme homeostatis, misalnya menjaga keseimbangan jumlah sel pada jaringan dengan menyeimbangkan proses mitosis dan kematian sel.

Proses apoptosis diatur oleh sel signaling yang berasal dari, pertama, ekstraselular atau induksi ekstraselular, seperti toksin, hormon, faktor tumbuh, nitric oxide atau sitokin, mereka harus melalui membran sel atau menggunakan signal transduksi, signal positif, misalnya trigger, sedangkan signal negatif, misalnya menghambat atau menekan apoptosis. Kedua, intraselular atau induksi intrinsik, merupakan respon dari stres yang menyebabkan sel bunuh diri, antara lain pengikatan nuclear reseptor dengan glucocorticoid, radiasi, tidak ada nutrisi, infeksi virus, hipoksia, meningkatnya kalsium atau sejumlah komponen selular, seperti poly ADP ribose polymerase yang mengatur proses terjadinya apoptosis. Proses kematian sel adalah pemisahan komponen sel dengan enzim. Signal apoptotik menyebabkan protein regulasi mengawali proses apoptosis, ada dua jalur yang terpenting, yaitu target fungsi mitokondria dan signal transduksi melalui protein adaptor (gambar 2).



Gambar 2 : Proses apoptosis

Apoptosis adalah mekanisme kontrol kematian sel secara genetik, melibatkan pengaturan homeostatis jaringan. Dua jalur utama proses apoptosis, pertama secara ekstrinsik melalui Fas dan TNFR superfamily dan ligan. Kedua, secara intrinsik melalui jalur mitokondria.

Jalur ekstrinsik dipicu oleh reseptor kematian, kemudian mengaktifkan signal cascade, yang dimulai dengan mengaktifkan caspase 8. Caspase 8 akan mengaktifkan caspase 3 dengan melepaskan sitokrom c oleh mitokondria. Dengan aktifnya caspase 3 terjadi degradasi protein selular, terutama protein –protein yang mengatur pertahanan sel dan integrasi.

Jalur intrinsik terjadi bila stimulus apoptotik dipicu oleh pelepasan sitokrom c dari mitokondria, kemudian sitokrom c berinteraksi dengan Apaf-1 dan caspase 9 untuk mengaktifkan caspase 3. Kompartemen sel lain yang terlibat dalam proses apoptosis adalah reticulum endoplasma (RE). Perubahan homeostatis kalsium dan akumulasi salah lipat protein di RE menyebabkan RE stress RE yang stres akan mengaktifkan BAD dan atau caspase 12, maka proses apoptosis berjalan. (Gambar 2)

4. Kultur sel microglia.

Kultur microglia primer dilakukan seperti yang dilakukan sebelumnya (Caggiano and Kraig,1999) menggunakan Dulbecco's Modified Medium (#D5976; Sigma) plus 10% fetal bovine serum (#10082–147; Invitrogen) dan 10 µg/ml gentamicin (Invitrogen) (DMEM-10). Kultur sel dipaparkan pada larutan homocysteine dengan konsentrasi 5 µMol/L, 15 µMol/L dan 30 µMol/L dengan waktu pemaparan 24 jam, 48 jam dan 96 jam.

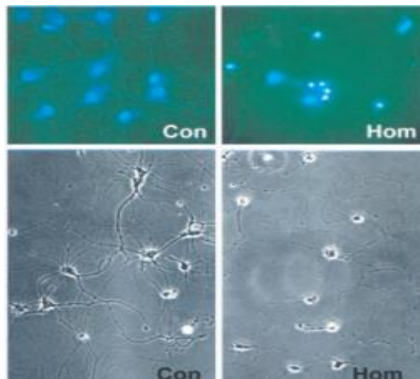
5. Kerusakan DNA

Untuk melihat kerusakan DNA, dan apoptosis digunakan Comet assay (Trevigen), yang sensitif dan reliable untuk mengukur kerusakan DNA, sedangkkan untuk menghitung secara kuantitatif sel yang mengalami apoptosis, kultur sel difiksasi dalam paraformaldehyde 4 %

dan diwarnai dengan DNA-binding dye Hoechst 33342 (Kruman et al., 1997). Hoechst-stained cells diamati dengan mikroskop fluorescence .

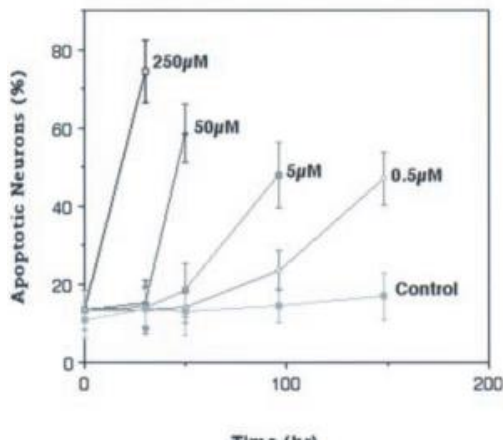
6. Pembahasan.

Homocystein dengan konsentrasi 250 $\mu\text{Mol/L}$ (Hom) dan larutan garam (con) yang dipaparkan selama 28 jam menyebabkan kerusakan DNA dan apoptosis pada kultur sel hippocampal. Dengan pewarnaan DNA-binding dye Hoechst 33342 (atas) atau difoto dengan menggunakan phase-contras (bawah). Terjadi fragmentasi DNA dan kerusakan sel saraf terutama pada kultur yang dipaparkan pada homocystein. (Gambar3)



Gambar 3 : Kultur sel neron hippocampal dengan pewarnaan DNA-binding dye Hoechst 33342

D



Gambar 4 : Persentase sel apoptosis pada kultur sel neron hippocampar yang dipaparkan pada homocystein

Konsentrasi dan waktu paparan homocystein berkorelasi positif terhadap proses apoptosis.(Gambar. 4). Pada semua konsentrasi homocystein setelah terpapar selama 28 jam terjadi apoptosis, hanya yang konsentrasi homocystein 0.5 $\mu\text{Mol/L}$ apoptosis mulai muncul setelah terpapar selama 4 hari dan diperpanjang sampai 6 hari.

7. Penutup.

Pengaruh homocystein pada proses apoptosis sel saraf perlu diteliti lebih lanjut, terutama konsentrasi homocystein yang harus mendekati kondisi invitro. Lama pemaparan harus lebih diperhatikan lagi mengingat homocystein invivo bersifat kronik. Peningkatan kadar homocystein dalam plasma disebabkan metabolisme yang tidak sempurna dan ini perlu diteliti lebih lanjut.

8. Daftar Pustaka.

1. Kruman, I; Culmsee, C; Chan, S.L.; Kruman, Y; Guo, Z; Penix, L; Mattson, M.P. 2000. *Homocysteine Elicits a DNA Damage Response in Neurons That Promotes Apoptosis and Hypersensitivity to Excitotoxicity*, The Journal of Neuroscience, 20(18):6920- 6926.

2. Prieto , R.G; Hernandez , V; Cano, B; Oya, M; Gil, A. 2009, *Plasma homocysteine in adolescents depends on the interaction between methylenetetrahydrofolate reductase genotype, lipids and folate: a seroepidemiological study*. Nutrition & Metabolism 6:39
3. Seshadri, S; Beiser, A; Selhub, J., Jacques, P.F; . Rosenberg, I.R., D'Agostino, R.B; . Wilson, P.W.F. and Philip A. Wolf, P.A., 2002., *Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease*, The New England Journal of Medicine, Volume 346:476-483
4. <http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04210.html>
5. <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00270.html>