

Neurodegenerasi dan Respon Microglia pada Hippocampus Tikus dengan Perlakuan Nitro-LArginine Methyl Ester (L-NAME)

Arief Budi Yulianti

D86.0.046/0409076001



Bagian Biologi Medik dan Histologi,
Fakultas Kedokteran, Unisba

2018

1. Latar Belakang.

Neurodegenerasi adalah proses penurunan secara progresif struktur dan fungsi neuron dan diikuti dengan kematian sel saraf, yang disebabkan oleh penyakit neurodegeneratif antara lain, Parkinson, Alzheimer dan Huntington. Ketiga penyakit ini berdasarkan hasil riset mempunyai kemiripan ditingkat sub-selular.

Penyakit neurodegeneratif dapat terjadi disebabkan kelainan genetik, seperti penyakit polyglutamine, terjadi mutasi pada triplet nukleotida, CAG, terjadi pada penyakit Huntington, atau alpha synuclein, terjadi agregasi fibril tidak larut, sehingga terbentuk Lewy body, seperti pada penyakit Parkinson, dan fragmen dari alpha synuclein, disebut non abeta component (NAC) ditemukan pada amyloid plaque pada penyakit Alzheimer

Sistem saraf dibangun oleh sel-sel saraf dan sel pendukung yang terdiri antara lain dari oligodendrosit, astrosit, dan microglia. Dalam paper ini yang akan dibahas adalah microglia karena sel ini merupakan sel pendukung yang berada secara random di didalam jaringan otak dan mempunyai peran sebagai makrophag, secara embriogenik sel ini berasal dari *bone marrow* (Junqueira, 2005). Pada saat pembentukan dan pematangan otak, sel microglia berperan dalam proses apoptosis. Microglia sangat sensitif terhadap perubahan *microenvironment* dan menjadi aktif dalam merespon infeksi atau sel injuri (Liu, 2003). Pengaktifan microglia, melibatkan *up-regulation* reseptor membran permukaan, seperti *major histocompatibility complex* (MHC) dan reseptor komplemen, microglia pun secara morfologi dapat berubah menjadi amoeboid microglia.

Microglia mensekresi *glia derived neutrophilic factor* yang berperan dalam *neuroprotective* dengan mengaktifkan astrosit. Produk lain yang disekresi microglia adalah *pro inflammatory* dan neurotoxic, seperti cytokines, antara lain *tumor necrosis factor α* (TNF α), interleukin -1 β (IL-1 β), dan radikal bebas, seperti nitric oxide (NO) dan superoxide.

NO banyak berperan dalam proses fisiologi, seperti dalam sistem imun, relaksasi vaskular, neuro transmisi dan sitotoksitas. NO disintesa dari asam arginin dengan bantuan enzim nitric oxide synthase, kemudian akan menjadi bentuk constitutive (cNOS) dan bentuk inducible (iNOS). Pada otak, cNOS isomorf dapat dibedakan menjadi neuronal NOS (nNOS) dan endothelial NOS (eNOS), keduanya kalsium dependent/calmodulin dan

memproduksi NO dalam periode pendek sebagai respon aktivasi reseptor. Di Otak iNOS, terutama dilokalisasi di astrosit dan microglia yang berasosiasi sebagai respon infeksi, isemia dan trauma.

Sitokinin dan endotoksi meningkatkan aktivitas biologi dari NO melalui stimulus iNOS. NO akan segera diproduksi setelah beberapa jam terpapar sitokinin atau produk microbial dan iNOS mengatur transkripsi melalui aktivasi NF- κ B. NO berperan sebagai molekul efektor memediasi sitotaksis dan efek sitotoksik.

L-arginin menghambat pembentukan NOS dan L-NMMA dan L-NAME merupakan senyawa yang menghambat pembentukan NO dengan menghambat cNOS dan iNOS. L-NAME menghambat NO synthase dalam vaskular endotel dan jaringan sistem saraf. Peningkatan NOS akan merusak sel saraf. Untuk melihat peran NO pada fungsi otak, maka yang diamati astrosit, microglia dan neuron dengan menghambat NO synthase. Tikus diberi perlakuan dengan dosis L-NAME yang berbeda dan yang diamati adalah hippocampus. Dalam 30 hari L-NAME menyebabkan neurodegenerasi dan astrogliosis di CA1 hippocampus dengan meningkatkan mRNA level dari GFAP dan pro inflammatory, sitokinin. Hal ini menunjukkan bahwa NO level berperan dalam menjaga kestabilan hippocampus.

2. Metoda

2.1. Bahan

Trimethyltin hydroxide (TMT), glial fibrillary acidic protein (GFAP) polyclonal antibody, Vectastain T M Elite immunohistochemistry kit, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), lectin (*Bandeiraea simplicifolia* BS I-B4), Nw-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), Alpha 32[p]-dCTP, Gene Screen Plus nylon

membranes, PCR kits, reverse tran- scriptase enzyme (SuperScript™), PCR primers, Ultrapure agarose from Gibco.

2.2. Hewan Percobaan.

Tikus jantan dewasa Long –Evanas dengan berat antara 175 – 250 g, dipelihara di kandang dengan temperature konstan (72 ± 0.5), kelembaban ($50\% \pm 5\%$), dan pencahayaan (7:00- 19:00hr), makanan disterilkan dan deionisasi. Hewan bebas pathogenic, bakteri, jamur, virus, parasit. Tikus diberi saline atau L-NAME (50 mg/Kg Bwt,ip) satu atau dua kali/hari selama 4 hari berturut-turut. Sebagian perbandingan kelompok hewan kedua, diberi salin atau trimethyltin (6mg TMT/kg bwt. sc.), segera setelah memberian L-NAME. Hewan diamati setelah 4, 10 dan 30 hari pemberian dosis.

2.3. Prosedur Histologi.

Enam(6) hewan dari masing-masing kelompok, 4, 10 dan 30 hari setelah pemberian dosis terakhir, dibius dengan pentobarbital (68 mg/Kg btw), perfusi via cardiac puncure dengan salin dan paraformaldehyde 4% dalam buffer fosfat salin (0.1M, pH 7.2)dan post fixed sepanjang malam pada suhu 4°C . Otak dibagi dua secara midsagital, dehidrasi dalam etanol dan diembeding dalam paraffin dan dipotong dengan ketebalan 6 micron. Karakteristik nekrosis, seperti pyknosis, karyorrhesis, atau karyolysis diidentifikasi dengan pewarnaan Hematoxylin and Eosin (H & E).

Astrocytes diidentifikasi dengan immunohistokimia dari GFAP. Sayatan direhidrasi dengan peroksida % selama 10 menit, kemudian dicuci dengan PBS, diinkubasi dengan non-immune goat serum (1% BSA/PBS) selama 20 menit, sebelumnya a 60 rain incubation dengan rabbit polyclonal anti-rat GFAP (1 : 2000), diikuti dengan sekunder IgG antibody 30 menit. Sediaan dicuci dengan PBS dan diinkubsasi dengan ABC reagen untuk 30 rain, cuci dan diberi pewarnaan dengan DAB substrate containing CoC12 and NiCl₂.

Pewarnaan microglia dengan lectin (*Bandeiraea Simplicifolia* BS I-B4) diikat dengan metoda Streit and Kreutzberg (1987). Sediaan dicuci dengan PBS yang mengandung 0,1mM CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂ dan Triton X-100 selama 20 menit, kemudian direndam di PBS

yang mengandung perosida -label lectin (BS-I-B4) pada suhu 4 °C sepanjang malam, visualisasi dengan DAB yang mengandung CoCl₂ 1% dan NiCl₂

2.4. Northern Hibridisasi untuk GFAP mRNA

15 µg RNA diisolasi dari hippocampus dari 4 -7 ekor tikus/ kelompok.. difraksinasi dengan agarose gel electroporesis, transfer ke fiber nilon dan dihibridisasi dengan 32[p] labeled cDNA probe untuk GFAP. Total radioaktifitas dideterminasi dan sebelumnya dilakukan autoradiography.

2.5. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for TNF α , IL-1 α , and IL-6

Bahan yang digunakan untuk mengukur Reverse transcription (RT) adalah 3.0 µg hippocampus dari 4 – 7 ekor tikus dari semua kelompok. Hot Start PCR dilakukan pada 5µl cDNA (0.1 µg RNA) dan 45µl aliquot mix PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.8 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs), 0.2 µM 5' sense primer, 3' antisense primer (TNF α : 295 bp; IL-6; 614 bp; IL-1 α : 623 bp; G3PDH; 983 bp), 1.25 units Taq DNA polymerase. Hasil PCR dipisahkan dengan electrophoresis dan density optikal relative dari warna band ethidium bromide ditentukan secara langsung dari gel (Eagle Eye II Still Video System; Stratagene, La Jolla, CA). Ditentukan rata-rata (\pm SEM) densitometric dari area puncak dibawah kurva dari masing-masing sampel. Perubahan berdasarkan perlakuan ditentukan dengan semi-quantitative PCR dengan Mimic™

2.6. Citrulline Assay untuk mengukur Constitutive Nitric Oxide Synthase Activity

Aktivitas NOS diukur dengan metoda Bred dan Snyder (1990) dengan monitoring konversi 3[H]-arginine menjadi 3[H]-citrulline. NOS otak diukur dari homogenate spesifik otak dari 3 ekor tikus per kelompok diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit dalam volume reaksi 100 µl dengan 50 mM Tris (pH 7.4), 1 mg/ml serum bovine serum

albumin, 1 mM DTT, 2 mM CaCl₂, 10 μM FAD, 10 μM tetrahydrobiopterin, 3 μM L-arginine mengandung L-2,3-³[H]-arginine pada 300 cpm/pmole, 1 μM NADPH, 50 nM calmodulin. Reaksi dihentikan dengan menambahkan larutan mengandung 10 mM EGTA, 100 mM HEPES, pH 5.5, 1 mM citrulline. ³[H]-Citrulline dipisahkan dengan chromatografi pada Dowex 50 W X-8 cation exchange resin, radioactivity ditentukan dengan liquid scintillation spectroscopy.

3. Perubahan Morfologi Hippocampus Tikus dengan perlakuan L-NAME.

Pada 4 jam atau satu hari setelah pemberian L-NAME (2 x/hari) tidak terjadi perubahan pada sel saraf atau sel glia hippocampus. Setelah 4 hari morfologi interaksi sel saraf masih lengkap, tetapi astrosit dan microglia meningkat (gambar 1). Setelah 10 hari terjadi nekrosis pada sel pyramidal CA 1hippocampal dan berkembang sampai 30 hari. (gambar 2A), terjadi nekrosis pada lapisan granular (gambar 2B,D) dan lebih sedikit terjadi nekrosis pada CA 3-4 (gambar 2B,C). Degradasi neuron yang mengecil dan membentuk sudut dengan peningkatan sitoplasmik dan nuclear basofilia. Pada perlakuan 4 hari, pewarnaan lectin memperlihatkan aktivitas microglia dilihat dari perubahan morfologi dengan membentuk percabangan, tetapi tidak ada aktivitas fagositosis (gambar 1). Pada perlakuan 30 hari, microglia tidak aktif. Pemberian L-NAME satu kali perhari tidak menyebabkan neuron injuri atau respon glial. Pemberian neurotoxicant hippocampal, trimethylin (TMT) menyebabkan degradasi neuronal dan aktivasi microglia. TMT menyebabkan degradasi pada CA 3 -4 neuron pyramidal (gambar 3). Pemberian L-NAME dan TMT menyebabkan kerusakan sel pyramidal pada semua lapisan hippocampal. Pada perlakuan 30 hari terjadi hypertrophy astrocyte dan aktivasi microglia (gambar 4).

4. Level mRNA GFAP Relatif

Dengan perlakuan 4 hari level mRNA GFAP meningkat hamper 100 %, tetapi pemberian L-NAME sekali per hari tidak ada peningkatan level mRNA GFAP. Pemberian TMT meningkatkan mRNA GFAP hamper 100 % dan kombinasi L-NAME (2x/hari) dan TMT

meningkatkan mRNA GFAP hamper 300 % (gambar 5), tetapi tidak ada interaksi yang signifikan kombinasi TMT dan L-NAME (1x/hari).

5. Level mRNA relatif terhadap TNF α , IL-1 α dan IL-6.

Pada pengamatan 4 hari, TNF α , IL-1 α dan IL-6., level mRNA meningkat di hippocampus sejalan dengan L-NAME administrasi, dua kali per hari selama 4 hari berturut-turut (gambar 6). Tidak ada interaksi yang signifikan antara L-NAME dan TMT dalam peningkatan mRNA sitokin, TNF α , Il-1 α atau Il-6, begitu juga dengan G3PDH

6. NOS aktivitas

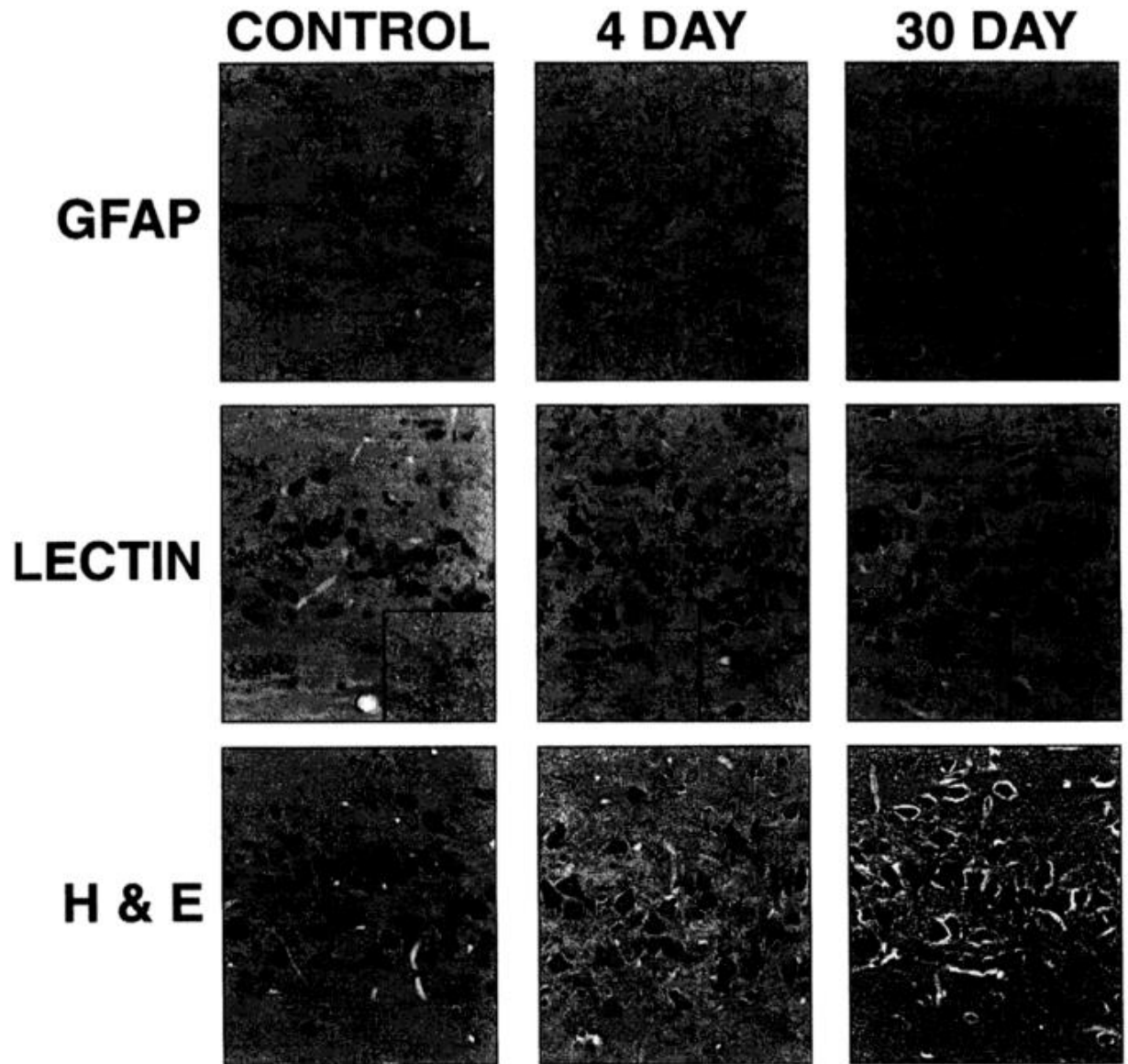
Perbedaan respon neuronal terhadap pemberian L-NAME tergantung pada dosis regimen satu atau dua kali per hari, NOS aktivitas terhambat mendekati 90 % (table 1). Ada perbedaan respon sel glial, disarankan adanya faktor tamahan untuk menghambat NOS aktivitas.

TABLE I NOS Activity in Brain Regions following L-NAME

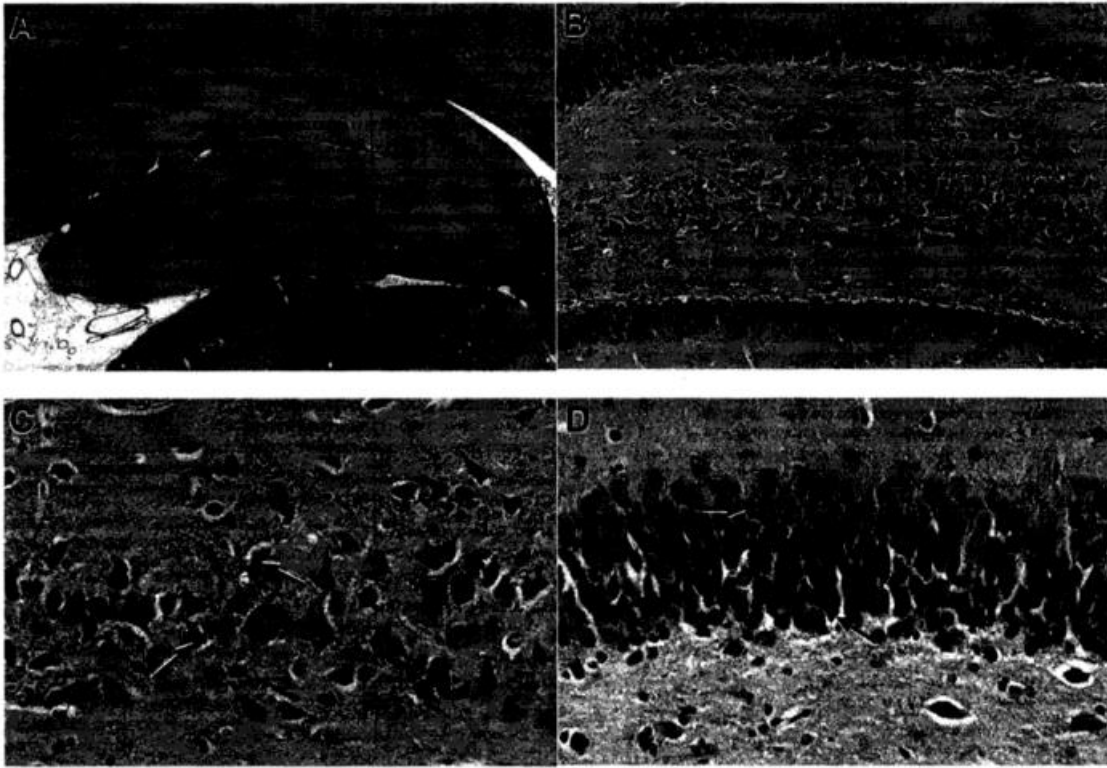
	<i>Cerebellum</i>	<i>Hippocampus</i>	<i>Remaining Brain</i>
Control	71.9 \pm 10.9	16.8 \pm 3.6	15.5 \pm 4.0
L-NAME Once daily	6.43 \pm 3.84 (91%) ^a	1.92 \pm 0.45 (89%)	1.36 \pm 0.44 (91%)
L-NAME Twice daily	3.37 \pm 1.40 (95%)	2.26 \pm 1.20 (87%)	1.49 \pm 0.68 (90%)

NOS Activity = pmol citrulline formed/min/mg protein (\pm SEM).

At 4 days post-dosing, inhibition of NOS activity was approximately 80% for both dose groups.



Gambar 1 : Sediaan hippocampal dengan pewarnaan GFAP, lectin atau HE pada perlakuan L-NAME 4 dan 50 hari.

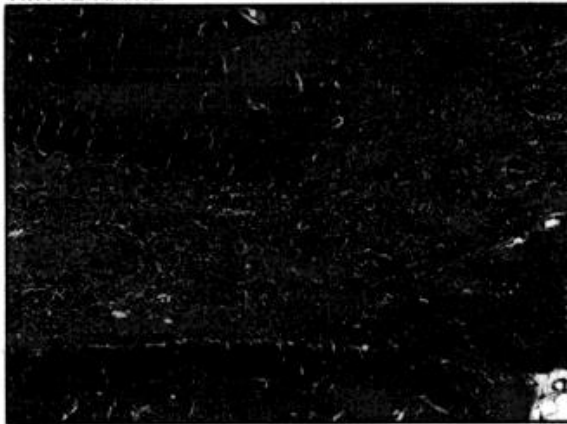


Gambar 2. Sediaan sayatan hippocampus tikus dengan perlakuan selama 30 hari (G.2A), G.2B. lapisan dentate dan sel pyramidal, G.2C. CA 3-4 sel pyramidal dan G2D. Detante granular cells.

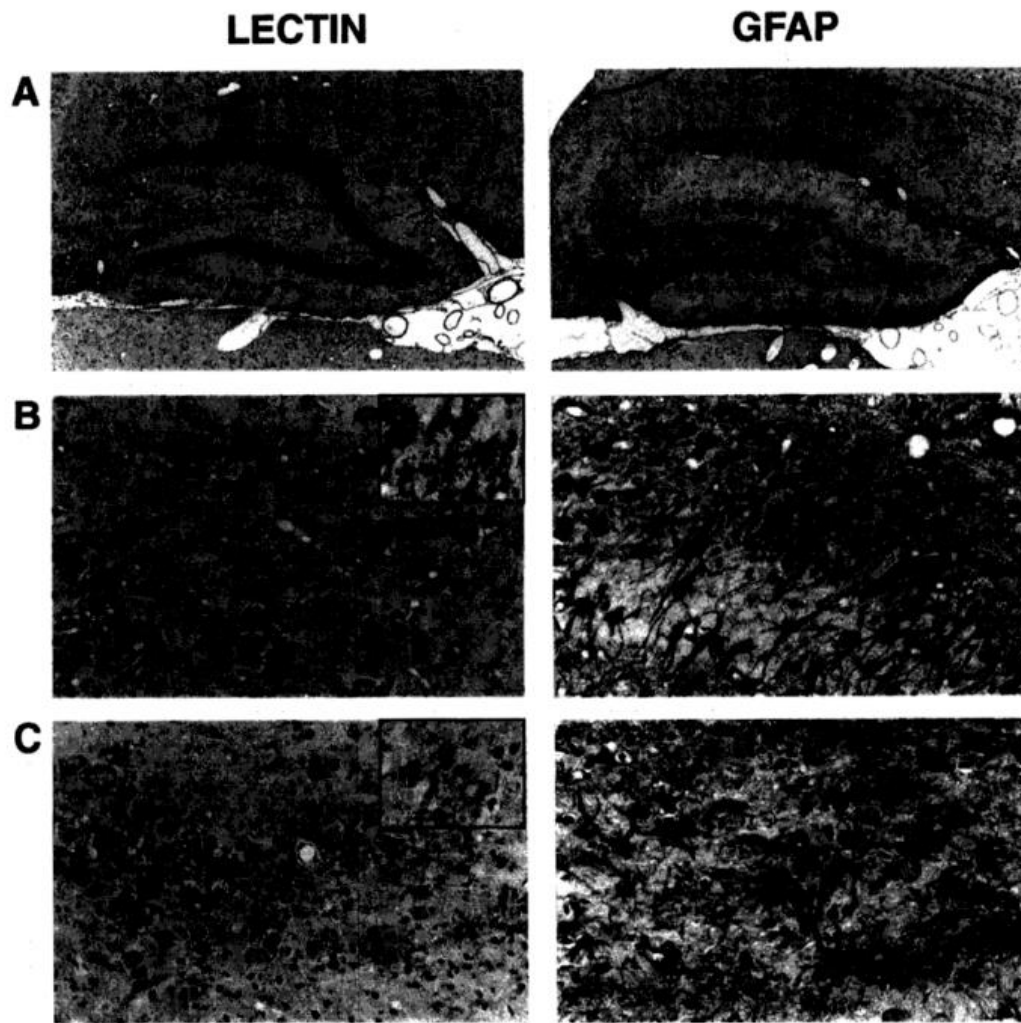
TMT



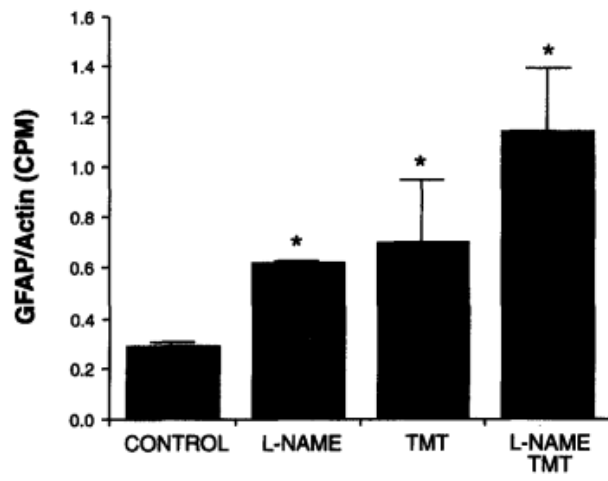
TMT+L-NAME



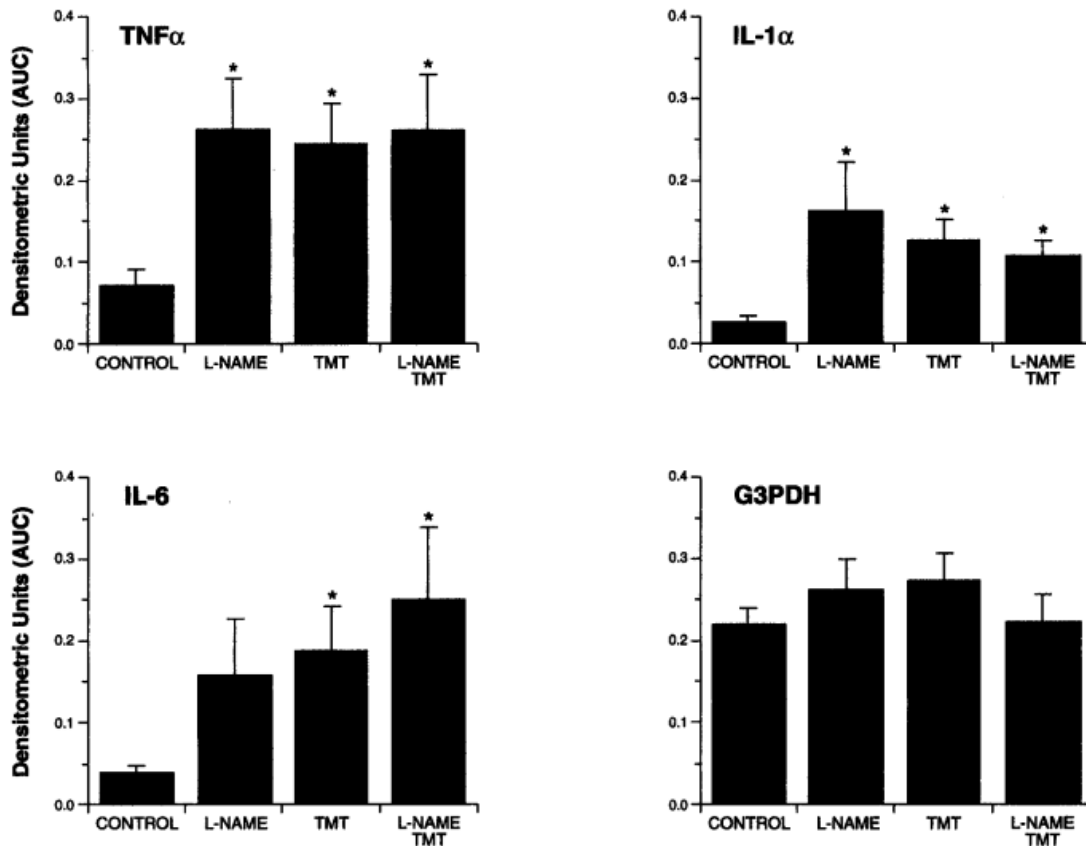
Gambar 3 . Sayatan sediaan hippocampus dengan pewarnaan HE pada perlakuan 30 hari.



Gambar 4. Sediaan sayatan hippocampus, untuk pewarnaan astrocyte dan Microglia dengan perlakuan 30 hari dan penambahan TMT



Gambar 5. Northern hybridization mRNA GFAP.



Gambar 6. RT-PCR level mRNA dari TNF α , Il-1 α ,Il-6 dan G3PDH

7. Penutup.

Pemberian L-NAME satu atau dua kali per hari selama 4 hari berturut-turut menunjukkan adanya penekanan aktivitas cNOS. Tetapi bila pemberian L-NAME dua kali sehari, terjadi neurodegenerasi pada hippocampus, neuronal degenerasi terjadi pada sel pyramidal CA1-2, astrogliosis dan reaktif microglia, dan diikuti dengan meningkatnya mRNA GFAP dan pro-inflamsi sitokin, yang member gambaran terjadi kerusakan pada sistem saraf.

Dengan pemberian L-NAME, terjadi disregulasi NOS, dapat terjadi secara langsung dengan enzim inhibisi atau NOS level berada pada kondisi basal sebagai hasil pelepasan NO pada lingkungan selular.NO bereaksi dengan anion super oksida dan membentuk

peroxynitrous (N2O3). NO juga berfungsi dalam modulator negative feedback dalam sintesa cNOS.

Pengaturan NOS aktivitas memberikan respon pada astrocyte dan microglia. iNOS menginduksi sekresi sitokin, seperti TNF α oleh makrophag atau microglia, yang akan mengakumulasi kerusakan bagian otak. TNF α meningkatkan NOS aktivitas di indetelial sel, signifikan dengan penurunan halflife NOS yang menyebabkan interaksi antara host-respons injuri.

8. Daftar Pustaka

1. Harry, G.J; Sills, R; Schlosser, M.J; Maier, W.E, (2001) Neurodegeration and Glia Response in Rat Hippocampus Following Nitro-LArginine Methyl Ester (L-NAME). Neurotoxicity, vol 3, pp, 307-319.
2. Junqueira, L.C; Carneiro, J, (2005) Basic Histology, Text &Atlas, New York : McGraw-Hill.
3. Liu, B; Hong, J,S. (2003) Role of Microglia in Inflammation- Mediated Neurodegenerative Diseases : Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. JPET 304 : 1-7.