

ARTERIOGENESIS AND ANGIOGENESIS IN HEMORRHAGIC STROKE: TOWARDS REFINING A CONCEPT TO GET THE MOST OF NEOVASCULARIZATION *

ARTERIOGENESIS DAN ANGIOGENESIS PADA STROKE HEMORAGIK: MEMPERTAJAM KONSEP UNTUK MEMPEROLEH MANFAAT TERBAIK NEOVASKULARISASI *

Diana Lyrwati

Laboratorium Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRACT

Arteriogenesis and angiogenesis contribute both to the damage and repair in hemorrhagic stroke. Understanding and unraveling the fundamental and mechanisms of these processes should facilitate the development of treatment strategies to improve outcome after stroke. This article describes briefly the basic principles of arteriogenesis and angiogenesis completed with some key molecular players, followed by a perspective of the author on how to use those neovascularization to benefit repair and recovery processes in post-hemorrhagic stroke.

Key Words : arteriogenesis, angiogenesis, hemorrhagic, stroke

PENDAHULUAN

Stroke adalah salah satu penyebab kematian tertinggi, yang berdasarkan laporan tahunan 2006 di RSSA angka kematian ini berkisar antara 16,31% (462/2832) dan menyebabkan 4,41% (1356/30096) pasien dirawat inap'kan (1). Angka-angka tersebut tidak membedakan antara *stroke* iskemik dan hemoragik. Di negara lain seperti Inggris dan Amerika, sebagian besar *stroke* yang dijumpai pada pasien (88%) adalah jenis iskemik karena penyumbatan pada pembuluh darah, sedangkan sisanya adalah *stroke* hemoragik karena pecahnya pembuluh darah (2,3). Walaupun jumlah kejadian relatif lebih kecil, tapi *stroke* hemoragik lebih sering mengakibatkan mortalitas. Pada hemoragik *stroke* intracerebral (ICH), salah satu subtype *stroke*, kematian dapat mencapai lebih dari 40% dan yang berhasil selamatpun banyak mengalami kecacatan (4,5). Strategi penatalaksanaan *stroke* sampai saat ini masih terbatas (6). Pengetahuan mengenai patofisiologi dan biologi molekuler proses perbaikan akan membuka lebih banyak peluang untuk pengembangan strategi penatalaksanaan *stroke* hemoragik. Dari studi eksperimental pada hewan maupun pengamatan pada pasien, mekanisme bagaimana proses kerusakan berlangsung serta faktor-faktor genetika dan molekul apa saja yang berperan telah banyak diidentifikasi dan dibahas (2,3,7,8,9).

ICH dan *subarachnoid hemorrhage* (SAH) dapat terjadi karena gangguan pada pembuluh darah antara lain arteriosklerosis hipertensif, angiopati

amiloid, malformasi arteriovena, aneurisma, neoplasia, angioma kavernosa atau koagulopati sehingga mengganggu aliran darah (10). Secara alami hal ini dapat diatasi dengan *remodelling* pembuluh darah melalui proses vaskulogenesis, arteriogenesis dan atau angiogenesis. Namun, pada kasus *stroke* hemoragik mekanisme protektif alami tersebut terlalu lambat untuk mengkompensasi lesi vaskuler yang berkembang. Stimulasi dan percepatan mekanisme proteksi alami tersebut merupakan strategi alternatif yang masih diteliti untuk memperbaiki aliran darah ke jaringan yang terlibat (11). Kebanyakan penelitian yang sampai ke tahap uji klinik lebih diarahkan untuk tindakan terapi *pascastroke*. Terapi stimulasi arteriogenesis-angiogenesis untuk usaha pencegahan/prevensi *stroke* hemoragik lebih sulit, karena ada beberapa kendala tambahan yang harus diatasi, selain seperti yang dihadapi pada pengembangan terapi *pascastroke*, antara lain penentuan siapa yang akan mendapat terapi stimulasi tersebut dan bagaimana pemberiannya. Penapisan genetik (*genetic screening*) tidak dapat dilakukan pada semua orang karena alasan efisiensi dan efektivitas, dan saat ini hanya dianjurkan pada individu yang beresiko tinggi yang mempunyai keluarga yang menderita SAH dan ICH pada usia <40 tahun (2). Meskipun demikian, masih juga belum dapat diprediksi di mana lokasi aneurisma/lesi di otak akan terbentuk. Pemberian stimulasi sedapat mungkin pada daerah yang terkena saja, intralesi (*localized dan targeted*), sedangkan teknologi kedokteran (dan keahlian) saat ini belum tentu dapat mencapai lesi. Untuk terapi *pascastroke*, manipulasi arteriogenesis dan angiogenesis dilakukan sesuai dengan kebutuhan, pembuluh darah mana yang terlibat apakah arteri, kapiler atau keduanya dan harus dilakukan dengan terkoordinasi dan hati-hati (*spatio-temporal*) tanpa perlu meningkatkan resiko

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXIV, No.1, April 2008
Korespondensi: Diana Lyrwati Laboratorium Farmasi
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Telp:
(0341) 569117

* Telah disampaikan di Basic Molecular Biology Course Pasca Sarjana FKUB, Malang: 8-9 Februari 2008

aterogenesis atau tumorigenesis (11,12,13,14). Karena sampai saat tulisan ini selesai dibuat belum ada publikasi artikel mengenai arteriogenesis dan angiogenesis pada hemoragik *stroke*, maka untuk memperoleh wawasan mengenai potensi pemanfaatan arteriogenesis dan angiogenesis pada hemoragik *stroke*, terutama ICH, berikut ini dibahas beberapa aspek arteriogenesis dan angiogenesis yang relevan. Berdasarkan berbagai publikasi penelitian eksperimental dan laporan *clinical trial*, bahasan kemudian dilanjutkan dengan perspektif dari pengaruh bagaimana proses neovaskularisasi tersebut dapat memperbaiki prognosis dan meningkatkan *recovery*; serta usulan manipulasinya untuk meminimalkan kerusakan dan menstimulasi perbaikan jaringan pascastroke.

Angiogenesis

Pembuluh darah pada organisme dewasa, termasuk manusia, dapat terbentuk lewat beberapa mekanisme yaitu vaskulogenesis, angiogenesis dan arteriogenesis. Vaskulogenesis merupakan pembentukan pembuluh darah baru dari progenitor endotel (langsung dari prekursor angioblast); angiogenesis membentuk kapiler melalui proses *intususepsi* atau proses *sprouting* pada kapiler; sedangkan arteriogenesis adalah membentuk jembatan kolateral pada jejaring/*network* arteri-arteriol yang sudah ada (12,15,16,17,18,19).

Angiogenesis melalui proses *sprouting* bersifat invasif sehingga dapat menjembatani *gap* vaskuler (misalnya pada penyembuhan luka) tetapi relatif lambat karena sangat tergantung pada proliferasi sel. Intususepsi, sebaliknya, merupakan proses yang cepat, dalam orde hanya beberapa jam atau menit; tidak tergantung pada proliferasi sel saja; dan dapat terjadi pada semua jaringan kapiler; bisa ditujukan untuk menambah percabangan/kompleksitas *network* vaskuler atau sebaliknya untuk meregresi/*pruning* kapiler (15). Intususepsi baru dikenal sekitar 25 tahun lalu, belum banyak yang diketahui mengenai biologi molekulernya baik pada fisiologis normal maupun pada keadaan patologis. Sebaliknya angiogenesis *sprouting* telah diteliti sejak lebih dari 150 tahun lalu. Bagaimana proses angiogenesis diregulasi secara molekuler dan mekanisme maturasi pembuluh darah mulai banyak diketahui (12,13,16,18), namun pembahasan mendetil mengenai proses tersebut di luar jangkauan tulisan ini.

Secara singkat angiogenesis *sprouting* dapat diterangkan sebagai salah satu cara untuk mengatasi keadaan hipoksia. Pada daerah *sprouting* tidak semua sel endotel merespon dengan cara yang sama. Sel endotel yang akan "memimpin" *sprouting* mengekspresikan Dll4 (protein *delta-like 4*), sedangkan tetangganya akan mengaktifasi *signaling* Notch untuk menekan *sprouting* (16,20). Pada tingkat molekuler, hipoksia direspon faktor transkripsi *hypoxia*

inducible factor 1 (HIF-1) yang terdiri dari subunit HIF-1 β yang diekspresikan secara konstitutif dan sub unit HIF-1 α yang diregulasi-oksigen (21). Pada sel dengan oksigen yang cukup HIF-1 α disintesis dan didegradasi terus menerus, tetapi pada hipoksia degradasinya dihambat sehingga HIF-1 α terakumulasi dan berdimerisasi dengan HIF-1 β , kemudian mengikat DNA dan merekrut *co-activator*, sehingga dapat mengaktifasi transkripsi gen target. Dengan demikian HIF-1 ini yang meregulasi berbagai gen yang secara terkoordinasi bekerja pada angiogenesis (22). *Upregulation* misalnya terjadi pada gen yang menyandi NOS, VEGF, Ang-2, MMP-2, -3, -9 dan TIMP2 (13). NOS berperan dalam produksi NO yang akan mendilatasi pembuluh darah, meningkatkan aliran darah, berkontribusi pada peningkatan permeabilitas pembuluh darah dan penyediaan faktor angiogenesis. Peningkatan permeabilitas pembuluh darah dipengaruhi juga oleh VEGF dan Ang-2 yang memungkinkan molekul protein plasma keluar dari pembuluh darah antara lain untuk membentuk matriks penyangga. Perubahan pada matriks ekstraseluler dilakukan juga oleh molekul proteinase yang termasuk dalam keluarga *matriks metalloproteinase* (MMP). Lisis protein spesifik oleh MMP diperlukan antara lain untuk melepas atau mengaktifasi faktor angiogenik yang terikat pada sel-sel matriks, membuka jalan untuk sel endotel dan mural agar dapat bermigrasi ke daerah yang memerlukan neovaskularisasi (13).

Pembuluh darah baru yang terbentuk melalui angiogenesis bersifat *immature*. Ada dua kemungkinan rangkaian proses lanjutan yang akan dilalui pembuluh darah *immature* ini, yaitu proses regresi/*pruning* karena tidak semua pembuluh darah terus diperlukan; atau proses maturasi yang memerlukan rekrutmen sel mural dan pembentukan matriks ekstraseluler untuk *support* struktural serta spesialisasi dinding pembuluh darah sehingga dapat berfungsi sesuai konteks *microenvironment*-nya. Banyak langkah diperlukan untuk mengubah dari sel endotel yang mengalami *sprouting* menjadi pembuluh darah fungsional yang mengalirkan darah. Sel endotel harus membentuk lumen vaskuler dengan cara fusi vakuola-vakuola. Fusi antarvakuola dapat secara intraseluler dan interseluler. Fusi vakuola intraseluler terjadi ketika beberapa vakuola di dalam satu sel endotel *sprout* yang sedang tumbuh itu saling berfusi; sedangkan fusi interseluler adalah bergabungnya vakuola-vakuola dari beberapa sel pembuluh darah (23). Sel endotel pada pembuluh darah juga mengalami spesialisasi sesuai 'lingkung-kerjanya' (16). Spesialisasi ini antara lain diperantarai oleh regulator angiogenik yang spesifik jaringan, pada vaskuler otak oleh TGF β dan Angiopoietin-1 (24). TGF β dan Angiopoietin-1 berperan pada tingginya ekspresi transporter-transporter spesifik misalnya GLUT-1 dan LAT-1 yang mengontrol ketat transport

transendotelial yang akhirnya berkontribusi pada terbentuknya sawar darah-otak.

Pertumbuhan kolateral/arteriogenesis

Berbeda dengan angiogenesis yang aktivasinya distimulasi oleh keadaan kimiawi (hipoksia), arteriogenesis dipicu oleh kekuatan fisik berupa *fluid shear stress* yang disebabkan oleh adanya gradien tekanan cairan antara daerah yang diperfusi, biasanya antara ujung proksimal dan distal pada arteriol yang terkoneksi (17). *Fluid shear stress*, diinduksi oleh kecepatan aliran darah, akan direspon oleh reseptor permukaan pada sel endotel. Mengawali kaskade sinyal intrasel, sel endotel mengalami aktivasi, melepaskan sitokin dan mengekspresikan molekul adesi. *E-selectin* yang diekspresikan akan membentuk ikatan *reversible* yang memperlambat gerakan sel monosit pada aliran darah, selanjutnya ikatan yang lebih kuat antara sel endotel dan monosit dimediasi oleh integrin pada permukaan monosit dengan reseptornya serta ICAM-1 dan -2 (17). Beberapa faktor seperti *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), VEGF dan PIGF akan meningkatkan ekspresi integrin sehingga perlekatan menjadi lebih kuat. Sitokin yang menarik monosit antara lain PIGF dan MCP-1; atau yang memperpanjang *life-time* monosit misalnya *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), TGF β 1 dan TNF- α akan meningkatkan *collateral growth*, sebaliknya sitokin antiinflamasi bersifat menghambat (12). Peningkatan *collateral growth* oleh PIGF terjadi karena kerjanya yang selain pada rekrutmen monosit juga menstimulasi pertumbuhan sel endotel dan otot polos. *Acidic* FGF, FGF-4, atau bFGF (bersama dengan PDGF-BB) bekerja meningkatkan ekspresi PDGFR. VEGF sendiri, sebagai agen tunggal, lebih efisien untuk angiogenesis daripada arteriogenesis (12).

Setelah rekrutmen, monosit menginvasi dinding kolateral. Karena monosit memproduksi faktor pertumbuhan dan proteinase termasuk MMP yang memungkinkan sel otot polos bermigrasi dan membelah, maka berikutnya terjadi proliferasi sel endotel dan sel otot polos serta rekrutmennya sehingga menghasilkan pembesaran *tunica media* (18,19). *Remodeling* ini biasanya dapat meningkatkan diameter pembuluh darah menjadi 2-3 kali lipat (17).

Arteriogenesis dibantu juga oleh sel-sel turunan sumsum tulang (*bone-marrow derived cells*, misalnya sel *mast*; sel progenitor endotel). Sel-sel tersebut berfungsi sebagai parakrin dan berkontribusi membentuk lapisan yang menyelimuti bagian luar pembuluh darah, tetapi tidak menjadi pembuluh darah (17,25).

ARTERIOGENESIS, ANGIOGENESIS DAN STROKE HEMORAGIK

Pada ICH tingginya frekuensi kematian atau perburukan neurologis antara lain dapat dijelaskan

melalui proses kerusakan pada otak yang bersifat bifasik. Pertama, fase akut, meliputi terjadinya jejas pada otak yang awalnya disebabkan oleh *sheer forces* dan efek massa dari hematoma yang timbul akibat pecahnya pembuluh darah dan disusul dengan pembentukan klot/bekuan darah, inflamasi dan edema (3). Fase berikutnya adalah fase lanjut yang ditandai dengan terjadinya perbaikan dan penyembuhan jaringan yang mengalami kerusakan (*repair and healing*). Pada kedua fase tersebut, terdapat faktor-faktor pembentukan pembuluh darah (vaskulogenesis, arteriogenesis dan angiogenesis) yang berperan pleiotropik, berkontribusi pada kerusakan dan perbaikan pada ICH. Untuk pemanfaatan dalam terapi pascastroke maka perlu diketahui lebih detail kapan dan bagaimana molekul-molekul tersebut berperan pada kejadian ICH.

Dalam kaitannya dengan prognosis ICH, faktor utama yang menentukan *outcome* ICH adalah volume perdarahan (3). Polimerisasi fibrin menjadi bentukan sferoid konsentrik dalam hematoma merupakan usaha alami menghentikan perdarahan. Pemberian *recombinant factor VIIa* eksogen sebagai terapi ditujukan untuk meningkatkan polimerisasi fibrin tersebut (10). Berhasil tidaknya menghentikan perdarahan/hemoragi menentukan *outcome* klinis, apakah menjadi asimtomatis atau fatal. Hasil pencitraan menunjukkan bahwa ICH dapat meluas setelah iktus awal, yang diikuti juga dengan kaskade koagulasi yang melibatkan thrombin, hasil/produk pemecahan oleh hemoglobin dan inflamasi sehingga menginduksi jejas lebih lanjut (3,5,26).

Pada *stroke*, pembentukan klot yang kaya akan fibrin dan agregasi platelet mendahului proses infiltrasi sel darah ke jaringan luka. Setelah mengalami aktivasi, platelet melepaskan simpanan faktor-faktor angiogeniknya VEGF, PDGF, TGF β (12). Studi eksperimental menunjukkan bahwa pada daerah hematoma, VEGF sebagai salah satu pemain utama dalam stimulasi *sprouting* kapiler, meningkat jumlahnya secara bertahap sejak 24 jam pertama sampai sebulan pascastroke, kemudian konsentrasi akan menurun terus sampai pengamatan hari ke 165 (8,27,28). Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, peningkatan VEGF berkorelasi dengan peningkatan reseptor VEGF; pembentukan *leaky microvessel* dan jumlah makrofag yang berinfiltrasi dan memfagosit sel-sel nekrosis (27,29). *Leaky microvessel* adalah pembuluh darah mikro dengan permeabilitas yang relatif tinggi sehingga memungkinkan molekul dan sel, termasuk makrofag, keluar dari sel pembuluh darah. Pembuluh darah mikro yang baru ini mulanya teramati hanya pada daerah perihematoma kemudian menyebar masuk ke daerah infark. Peningkatan densitas pembuluh darah mikro baru dengan permeabilitas tinggi pada daerah lesi ini memfasilitasi makrofag sehingga dapat melakukan infiltrasi dan membersihkan jaringan nekrosis.

Selain efek yang menguntungkan tersebut, jumlah VEGF yang tinggi ini berkorelasi juga dengan terjadinya edema. Efek *leaky* ini memang merupakan salah satu ciri khas pembuluh darah baru *immature* hasil angiogenesis yang distimulasi oleh VEGF saja atau bersama-sama dengan Ang-2 (12). Jika tidak terkoordinasi dengan baik, jumlah VEGF terlalu banyak atau VEGF diekspresikan terus menerus, maka akan dapat memperburuk prognosis *stroke* (30). Pada manusia kebanyakan edema berkembang 3 jam setelah awitan/*onset* gejala dan memuncak pada 10-20 hari setelah kejadian/iktus sedangkan studi eksperimental pada hewan edema maksimum pada sekitar hari ke 3-4 (3). Derajat edema sekitar hematoma berasosiasi dengan *outcome* yang buruk pada pasien (5).

Untuk mengatasi *leakiness* pembuluh darah baru, platelet juga membawa faktor angiogenik lain yaitu *sphingosine-1-phosphate* yang menstimulasi pertumbuhan dan stabilisasi pembuluh darah baru dengan cara merapatkan pertautan (*junction*) dan merekrut sel mural. Selain itu juga dapat dilakukan dengan pemberian Ang-1 eksogen, atau secara alami dihasilkan oleh sel *pericytes*, yang akan mematurasi pembuluh darah, memacu perlekatan sel endotel dengan sel matriks sekelilingnya (12,30).

Faktor lain yang berkaitan dengan angiogenesis dan berperan pada pembentukan edema adalah matriks metalloproteinase dan inhibitornya, antara lain MMP-2; MMP-3; MMP-9; TIMP-s (31). MMP-9 adalah salah satu yang paling banyak dikarakterisasi dalam ICH (31,32,33,34). MMP-9 meningkat aktivitasnya di mana pada tahap akut ini MMP-9 mendegradasi matriks neurovaskular sehingga memediasi kebocoran sawar darah-otak, edema dan hemoragi (35,36,37,38,39). Peningkatan aktivitas MMP-9 tidak selalu paralel dengan peningkatan ekspresi *de novo* (pembentukan mRNA atau protein MMP-9 baru), karena peningkatan aktivitas MMP-9 juga dapat terjadi melalui rekrutmen netrofil yang telah mengekspresikan MMP-9 (*performed*) ke tempat lesi (40,41).

Ekspresi MMP dalam fase akut pada sistem saraf dipengaruhi oleh IL-1(41). Pada 24 jam *pascastroke* ekspresi IL-1 dan reseptornya meningkat, sebaliknya antagonis reseptor IL-1 menurun (8). Pada sebagian besar MMP, bagian *promoter* mengandung elemen pengikat untuk faktor transkripsi IL-1. Ikatan IL-1 pada bagian *promoter* MMP ini dianggap yang mendasari peran IL-1 sebagai induser kuat yang meningkatkan ekspresi MMP. Pemberian antagonis reseptor IL-1 eksogen menurunkan ekspresi MMP (8).

Selain efeknya pada angiogenesis, pada tahap akut MMP-9 juga berkontribusi pada kerusakan jaringan saraf (42,43). MMP-9 yang mulanya berbentuk sebagai pro-MMP-9 mengalami nitrosilasi menjadi bentuk aktif dan pada tahap ini bersifat

neurotoksik mendegradasi laminin yang mengikat neuron pada matriks ekstraseluler (32). Dengan merusak homeostasis matriks sel, MMP memacu kematian sel neuron yang tidak terikat pada matriks (anoikis) melalui jalur apoptosis caspase 8 dan caspase-3 (39).

Kebalikan dari kerjanya yang bersifat memperburuk *outcome stroke* sehubungan dengan edema dan kerusakan sel, MMP membantu perbaikan/*repair* dan penyembuhan/*healing* *pascastroke* baik pada sistem pembuluh darah maupun saraf. *Remodelling* ECM pada angiogenesis *sprouting* memerlukan kerja proteinase termasuk MMP. Bersama-sama dengan proteinase lainnya seperti *plasminogen activator* (uPA dan inhibitornya PAI1) MMP-s dan inhibitornya TIMPs heparinase, *chymase*, dan *cathepsin* memfasilitasi sel endotel melakukan *sprouting* dengan cara membebaskan aktivator angiogenik (bFGF), VEGF dan TGF β dari ikatannya pada matriks. Proteolisis ini harus dalam keadaan seimbang sehingga memungkinkan sel endotel bermigrasi ke tempat yang sesuai. Jika proteolisis kurang maka sel endotel tidak dapat pergi dari posisi awalnya tetapi jika berlebihan akan mengakibatkan sel endotel kehilangan *support* dan petunjuk arah sehingga menghambat angiogenesis (12).

Pada sistem saraf, berlainan dengan sifatnya yang neurotoksik pada fase akut, pada fase lanjut MMP-9 "membukakan jalan" memfasilitasi migrasi neuroblast dalam proses *neurorepair* *pascastroke* (36). Inhibisi kerja MMP-9 pada tahap ini akan memperburuk pemulihan/*recovery* fungsi neurologis (34).

Perbedaan kerja dan fungsi MMP ini berkorelasi dengan jumlah dan aktivitas MMP *pascastroke*. Studi eksperimental pada tikus hemoragik menunjukkan bahwa jumlah MMP meningkat terus sejak 24 jam pertama sampai 72 jam, kemudian menurun drastis (tapi masih tetap di atas normal). Peningkatan berikutnya terlihat seminggu setelah *stroke* sampai minggu ke-3 pengamatan (31,34).

Regresi dan maturasi pembuluh darah

Pada *stroke* hemoragik, pembuluh darah yang baru bersifat *immature*. Pembuluh darah baru ini, yang tadinya diperlukan untuk mengantarkan sel (makrofag untuk membersihkan sel mati) dan faktor-faktor angiogenik dan neurogenik, harus diregresi atau dimaturasi. Regresi diperlukan untuk menghilangkan kelebihan pembuluh darah *immature*. Jika pembuluh darah *immature* yang *leaky* ini tidak diregresi dapat mengakibatkan perdarahan kembali (*rebleeding*). Jumlah pembuluh darah *immature* yang terlalu banyak malah dapat mengakibatkan hipoksia bahkan meningkatkan resiko tumorigenesis (16,18).

Regresi pembuluh darah terjadi pada keadaan di mana tidak ada aliran darah, stimulus

angiogenik dihilangkan, atau ada inhibitor angiogenesis (12). Telah dikemukakan sebelumnya, peningkatan VEGF hanya berlangsung sebulan pertama, kemudian menurun terus sampai pengamatan bulan ke 6 bulan pascastroke. Penurunan jumlah VEGF pada daerah hematoma ini berkorelasi dengan makrofag fagositik dan regresi mikrovessel yang terbatas di daerah lesi saja (28). Hal ini terjadi mungkin karena memang mikrovessel tersebut tidak lagi diperlukan. Peristiwa regresi vaskuler ini juga bisa terjadi karena berhentinya aliran darah karena angiogenesis (intususepsi) atau dengan bantuan molekul dan sel lain yang terbawa aliran darah atau diproduksi sel sekitarnya (17). Platelet berperan pada penghentian angiogenesis karena membawa faktor antiangiogenik (antara lain TSP-1 dan PF-4) yang berperan dalam menghentikan proses angiogenesis saat luka telah sembuh. TSP-1 menghambat angiogenesis dengan menghambat proliferasi, migrasi dan organisasi morfogenik sel endotel menjadi tabung kapiler dan secara tidak langsung pada mobilisasi atau aktivasi *growth factors* (44). *Upregulation* inhibitor angiogenesis TSP-1 dan TSP-2 menghentikan angiogenesis (44). Inhibitor lain misalnya Ang-2 tanpa atau dengan VEGF konsentrasi rendah akan meregresi pembuluh darah; sedangkan interferon bersifat angiostatik karena menurunkan ekspresi bFGF dan VEGF. Masih banyak inhibitor lain yang bekerja dengan mekanisme berbeda-beda meregresi pembuluh darah, tetapi tidak dibahas pada tulisan ini (12).

Regresi tidak terjadi jika pembuluh darah baru diperlukan, dan terjadi proses maturasi. Aliran darah mempengaruhi sejumlah faktor (MMP, PDGF, bFGF, integrin, NO), menstimulasi hiperplasia sel endotel dan sel otot polos dan menginduksi reorganisasi pertautan endotelial dan deposisi matriks ekstraseluler sehingga terjadi maturasi pembuluh darah. Keberadaan stimulus angiogenik dalam waktu yang cukup akan memberi kesempatan maturasi pembuluh darah baru sehingga pembuluh darah ini akhirnya dapat bertahan sampai beberapa bulan, bahkan setelah stimulus angiogenik tidak ada lagi (45,46).

Perspektif Penerapan Klinik Untuk Terapi

Dari paparan di atas, maka strategi pertama untuk terapi pascastroke dengan memanfaatkan arterio-angiogenesis, nampaknya adalah dengan sedapat mungkin meminimalkan hemoragi, edema dan kematian sel. Pembatasan kerja MMP, misalnya dengan pemberian inhibitor MMP, akan sangat membantu. Strategi kedua adalah dengan memacu *recovery*. *Recovery* dapat dipacu dengan pemberian VEGF dikombinasi dengan Ang-1 untuk mempercepat kapilerisasi dan *cleaning-up* daerah lesi, kemudian segera disusul dengan Ang-2 untuk stabilisasi vaskuler untuk mencegah *rebleeding*; serta meningkatkan aktivitas MMP dalam angio-

neurogenesis. Pemberian faktor regulator angiogenesis HIF-1 bisa juga dilakukan untuk menstimulasi angiogenesis secara lebih terkoordinasi. Masih banyak lagi pendekatan lain yang dapat diajukan, namun harus diingat bahwa sebagian informasi saat ini (termasuk yang tidak dipaparkan di sini) disarikan dari studi *in vitro* dan *in vivo* hewan model *ischemic* atau pengamatan pada organ lain non-otak. Hal ini perlu menjadi pertimbangan terutama untuk pengembangan terapan klinisnya, mungkin terdapat persamaan dan perbedaan pada faktor-faktor dan proses yang berlangsung karena adanya jaringan otak dan sawar darah-otak yang terlibat dalam *stroke* hemoragik (17,18,19).

Dari segi pembuatan model eksperimental pun belum ada yang dapat meniru keadaan *stroke* hemoragik. Model yang banyak dipakai adalah pemberian darah saja ke otak (berarti tidak ada pembuluh darah pecah), atau collagenase (yang menghancurkan tidak saja pembuluh darah tetapi sel-sel lain juga karena kerja proteolisisnya) (47). Menerjemahkan hasil dari hewan model ke klinik juga tidak bisa langsung. Hewan model/coba yang digunakan pada studi eksperimental kebanyakan termasuk muda dan sehat sedangkan kenyataannya di klinik mayoritas pasien termasuk usia lanjut disertai berbagai *co-morbid* yang tentu berbeda fisiologis *repair-nya* (47).

Terapi klinik selalu harus memperhitungkan faktor keamanan (efek samping). Faktor arteriogenik tidak secara langsung menstimulasi angiogenesis, tetapi banyak juga faktor arteriogenik yang dapat meningkatkan angiogenesis, dan sebaliknya. Baik arteriogenesis maupun angiogenesis beresiko meningkatkan aterosclerosis yang merupakan salah satu penyebab *stroke*. *Pathway* arteriogenesis sangat mirip dengan aterosclerosis (11,17). Ekspresi molekul adesi sel endotel, aktivasi sel, sitokin dan migrasi leukosit berperan baik pada arteriogenesis maupun aterosclerosis. Faktor yang memacu angiogenesis, proses intrinsik pada aterosclerosis, biasanya juga meningkatkan pembentukan plak aterosklerotik. Angiogenesis yang terjadi dalam plak mengakibatkan destabilisasi plak (48). Angiogenesis juga berperan dalam induksi tumorigenesis. Oleh karena itu untuk terapan praktis klinisnya, diusahakan apapun molekul yang diberikan sedapat mungkin arteriogenik atau angiogenik tetapi tidak aterosklerotik dan tumorigenik.

Baik untuk arteriogenesis maupun angiogenesis, pemberian molekul tunggal atau kombinasi tidak selalu memberikan hasil yang memuaskan. Pemberian VEGF saja akan menginduksi hipervaskularisasi dan hiperpermeabilitas; tetapi pemberian tunggal regulator angiogenik HIF-1 menghasilkan hipervaskularisasi tanpa hiperpermeabilitas (11,21,49). Kombinasi VEGF-Ang-2 akan menyebabkan vaskularisasi tapi *immature* sehingga berkontribusi pada *bleeding* atau

edema; sedangkan VEGF-Ang1 memberikan hasil pembuluh darah dengan diameter yang tidak teratur atau perfusi tidak sempurna (13,18). Hal ini menunjukkan bahwa baik untuk pemberian tunggal maupun kombinasi, molekul harus dipilih sedemikian rupa sesuai dengan fase *recovery* pascastroke, apakah diperlukan pembuluh darah *immature* yang hiperpermeabel untuk menyalurkan molekul dan sel untuk *cleaning-up* atau pembuluh darah yang stabil dan fungsional mengalirkan darah tanpa mengakibatkan edema atau *rebleeding*. Pemberian molekul juga sedapat mungkin "in-context". Karena angiogenesis berkaitan dengan tumorigenesis, pemberian molekul angiogenik dengan dosis yang terlalu tinggi; terlalu lama atau di luar daerah yang memerlukan dapat meningkatkan resiko kanker.

Selain molekul/faktor arteriogenik/angiogenik dan inhibitorynya, strategi lain yang terutama dikembangkan untuk stimulasi arteriogenesis adalah pemberian molekul yang meningkatkan rekrutmen atau memperpanjang *life-span* sel penghasil faktor arteriogenik (misalnya monosit). MCP-1 dan GM-CSF merupakan kandidat yang dicoba, sayangnya sampai saat ini uji klinik masih belum memuaskan karena rasio manfaat:resiko (*benefit/risk*) yang masih belum sesuai standar (11,14).

Pemberian faktor arteriogenik dan angiogenik yang terkoordinasi hati-hati, dosis yang tepat dan pemberian lokal dengan injeksi atau *stent/matrix-link* akan lebih menjamin pencapaian tujuan terapi dan meningkatkan keamanan (menurunkan resiko efek samping).

Waktu pemberian juga mempengaruhi hasil terapi. Studi eksperimental dan uji klinik menunjukkan bahwa inhibisi MMP menggunakan inhibitor spesifik atau non-spesifik pada *stroke* hemoragik pada saat dan durasi yang berbeda, fase akut atau pada fase *repair*, memberikan hasil yang berbeda pula (31,32,34,35,50,51). Pemberian inhibitor MMP-9 pada fase akut akan memperbaiki prognosis karena dapat meminimalkan edema dan kematian sel termasuk neuron; tetapi pemberian yang terlalu lama hingga fase lanjut akan memperburuk penyembuhan karena mengganggu angiogenesis dan/atau neurogenesis (*coupled* *angio-neurogenesis*) (38,52,53,54). Pemilihan *window therapy* ini masih menjadi kendala, karena kebanyakan eksperimen dilakukan pada organism yang lebih 'kecil' dari manusia, di mana waktu *recovery* kelihatannya berbanding terbalik dengan ukuran tubuh organisme. Seperti contoh yang telah dikemukakan pada proses pembentukan edema, terdapat perbedaan *window* yang cukup besar antara manusia dan hewan. Bahkan antar

binatang model, Balb/C dan C57BL/6, juga terdapat perbedaan yang signifikan pada proses dan kecepatan arteriogenesis dan *recovery*, 3 minggu vs 3 hari (17). Strategi lain yang akhir-akhir ini

dikembangkan adalah *gene-therapy* untuk menghasilkan protein arteriogenik/angiogenik dan *cell-based therapy*, memanfaatkan sel *precursor* dan *progenitor* termasuk stem cell. Gen dapat dimasukkan langsung ke pasien atau ke dalam sel yang dikultur di luar kemudian dikembalikan ke tubuh (*ex vivo*). Terapi sel terutama didasarkan bahwa sel merupakan 'pabrik' yang menghasilkan faktor arteriogenik atau angiogenik, termasuk MMP, VEGF, dan lain-lain yang akan menstimulasi dan mengamplifikasi proses restorasi yang sudah ada pada otak (55). Untuk berbagai strategi tersebut, sebagian *clinical trial* menunjukkan hasil positif, namun sejauh ini belum dicoba pada keadaan *stroke* hemoragik (11).

Untuk terapi *stroke* hemoragik, walaupun ada faktor dan mekanisme yang *overlap* pada arteriogenesis dan angiogenesis, keduanya tidak dapat saling menggantikan. Angiogenesis diperlukan untuk distribusi darah pada mikrosirkulasi, oleh karenanya akan sesuai jika *stroke* hemoragik melibatkan pembuluh darah kapiler. Jika yang terganggu adalah pembuluh darah yang besar seperti arteri, maka angiogenesis tidak dapat mengkompensasi fungsi arteri. Sebagai gambaran, seperti yang dikemukakan Hofer dkk jumlah kapiler untuk menggantikan aorta (dengan diameter 30 mm) kira-kira 2×10^{14} dan memerlukan ruang $\sim 10.000 \text{ m}^2$ (49). Baik arteriogenesis dan angiogenesis dapat berjalan bersama-sama, jika diperlukan.

KESIMPULAN

Mempelajari kaitan antara *stroke* hemoragik dengan arteriogenesis dan angiogenesis membuka cakrawala pengembangan penatalaksanaan *stroke* hemoragik, baik pada fase akut untuk meminimalkan kerusakan maupun pada fase lanjut untuk memperbaiki kerusakan jaringan. Terapi stimulasi neovaskularisasi tidak hanya untuk memperbaiki distribusi darah pada jaringan *stroke* hemoragik, tetapi juga secara timbalbalik berperan pada neurogenesis untuk *repair* dan *recovery* pascastroke. Untuk aplikasi klinis, nampaknya masih diperlukan kerja keras untuk mencari kondisi yang tepat, kondisi yang bersifat *spatio-temporal* dan *in context* agar terapi dapat optimum pada penerapannya dalam praktek klinis.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. RSSA. *Laporan Tahunan RS dr. Saiful Anwar Malang*. 2006
2. Gijn, J.v., Kerr, R.S. & Rinkel, G.J.E. *Subarachnoid haemorrhage*. *Lancet*, 2007; 369: 306-318.

3. Xi, G., Keep, R.F. & Hoff, J.T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurol* 5;2006; 53-63.
4. Mendelow, A.D. et al. *Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial intracerebral haematomas in the International Surgical Trial in Intracerebral Haemorrhage (STICH): a randomised trial*. *The Lancet*, 2005; 365:387-397.
5. Dennis, M.S. *Outcome after brain hemorrhage*. *Cerebrovascular Disease* 2003;16(1): 9-13.
6. Somes, J. & Bergman, D.L. *ABCDs of Acute Stroke Intervention*. *J Emerg Nurs* 2007; 33: 228-34.
7. Yamada, Y. et al. *Genetic Risk for Ischemic and Hemorrhagic Stroke*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006; 26:1920-1925.
8. Lu, A. et al. *Brain genomics of intracerebral hemorrhage*. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*; 2006; 26:230-252.
9. Liu, X.S. et al. *Stroke induces gene profile changes associated with neurogenesis and angiogenesis in adult subventricular zone progenitor cells*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006; 27: 564-574.
10. Sutherland, G.R. & Auer, R.N. *Primary intracerebral hemorrhage*. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2006;13: 511-517.
11. Grundmann, S., Piek, J.J., Pasterkamp, G. & Hoefer, I.E. *Arteriogenesis: basic mechanisms and therapeutic stimulation*. *European Journal of Clinical Investigation*, 2007; 37: 755-766.
12. Carmeliet, P. *Angiogenesis in health and disease*. *Nature Medicine*, 2003; 9: 653-66.
13. Jain, R.K. *Molecular regulation of vessel maturation*. *Nature medicine*, 2003; 9, 685-693.
14. Royen, N.v. et al. *START Trial A Pilot Study on STimulation of ARTeriogenesis Using Subcutaneous Application of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor as a New Treatment for Peripheral Vascular Disease*. *Circulation* , 2005; 112: 1040-1046.
15. Burri, P.H., Hlushchuk, R. & Djonov, V. *Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance*. *Developmental Dynamics*, 2004; 231:474-488.
16. Adams, R.H. & Alitalo, K. *Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007; 8: 464-478.
17. Heil, M., Wagner, S. & Schaper, W. *Arterial regeneration by collateral artery growth (arteriogenesis)*. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2004; 1: 265-271.
18. Carmeliet, P. *Angiogenesis in life, disease and medicine*. *Nature*, 2005; 438: 932-936.
19. Carmeliet, P. *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. *Nature Medicine*, 2000; 6:389-395.
20. Hellstrom, M. et al. *Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis*. *Nature*, 2007; 445: 776-780.
21. Semenza, G.L. *Vasculogenesis, Angiogenesis, and Arteriogenesis: Mechanisms of Blood Vessel Formation and Remodeling*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007; 102: 840-847.
22. Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C. & Pouyssegur, J. *Protein kinases and the hypoxia-inducible factor-1, two switches in angiogenesis*. *Current Pharmaceutical Design*, 2003; 9: 531-541.
23. Kamei, M. et al. *Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo*. *Nature*, 2006; 442:453-456 (2006).
24. Red-Horse, K., Crawford, Y., Shojaei, F. & Ferrara, N. *Endothelium-Microenvironment Interactions in the Developing Embryo and in the Adult*. *Developmental Cell*, 2007;12:181-194.
25. Taguchi, A. et al. *Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004; 114: 330-338.
26. Pendlebury, S.T. & Rothwell, P.M. *Management of stroke*. *The Foundation Years*, 2006; 2:199-206.
27. Tang, T. et al. *Cerebral angiogenesis after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats*. *Brain Research*, 2007; 1175: 134-142.
28. Yu, S.W., Friedman, B., Cheng, Q. & Lyden, P.D. *Stroke-evoked angiogenesis results in a transient population of microvessels*. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2007; 27: 755-763.
29. Manoonkitiwongsa, P.S., Jackson-Friedman, C., McMillan, P.J., Schultz, R.L. & Lyden, P.D. *Angiogenesis After Stroke Is Correlated With Increased Numbers of Macrophages: The Clean-up Hypothesis*. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2001: 21:1223-1231.
30. Thurston, G. et al. *Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage*. *Nature Medicine*, 2000; 6:460-463.
31. Grossetete, M. & Rosenberg, G.A. *Matrix metalloproteinase inhibition facilitates cell death in intracerebral hemorrhage in mouse*. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2007:1-12.
32. Gu, Z. et al. *A Highly Specific Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-9 Rescues Laminin from Proteolysis and Neurons from Apoptosis in Transient Focal Cerebral Ischemia*. *The Journal of Neuroscience*, 2005; 25: 6401- 6408.

33. Rosell, A. et al. *Increased Brain Expression of Matrix Metalloproteinase-9 After Ischemic and Hemorrhagic Human Stroke*. Stroke, 2006; 37:1399-1406.
34. Zhao, B.-Q. et al. *Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke*. Nat Med, 2006;12: 441-445.
35. Lee, C.Z., Xue, Z., Zhu, Y., Yang, G.-Y. & Young, W.L. *Matrix Metalloproteinase-9 Inhibition Attenuates Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Intracerebral Hemorrhage*. Stroke, 2007; 38: 2563-2568.
36. Lee, S.-R., Tsuji, K., Lee, S.-R. & Lo, E.H. *Role of Matrix Metalloproteinases in Delayed Neuronal Damage after Transient Global Cerebral Ischemia*. J. Neurosci, 2004; 24: 671-678.
37. Lee, S.-T. et al. *Memantine reduces hematoma expansion in experimental intracerebral hemorrhage, resulting in functional improvement*. J Cereb Blood Flow Metab, 2006: 26:536-544.
38. Zhao, B.-Q., Tejima, E. & Lo, E.H. *Neurovascular Proteases in Brain Injury, Hemorrhage and Remodeling After Stroke*. Stroke, 2007; 38: 748-752.
39. Wang, J. & Tsirka, S.E. *Neuroprotection by inhibition of matrix metalloproteinases in a mouse model of intracerebral haemorrhage*. Brain, 2005;128:1622-1633 (2005).
40. Yong, V.W., Power, C., Forsyth, P. & Edwards, D.R. *Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2001; 2: 502-511.
41. Yong, V.W. *Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS*. Nat Rev Neurosci, 2005; 6: 931-944.
42. Calabrese, V. et al. *Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity*. Nat Rev Neurosci, 2007; 8: 766-775 (2007).
43. Xue, M., Hollenberg, M.D. & Wee Yong, V. *Combination of Thrombin and Matrix Metalloproteinase-9 Exacerbates Neurotoxicity in Cell Culture and Intracerebral Hemorrhage in Mice*. J. Neurosci, 2006; 26: 10281-10291.
44. Vaill e, B. & Feige, J.-J. *Thrombospondins as Anti-Angiogenic Therapeutic Agents*. Current Pharmaceutical Design, 2003; 9: 583-588.
45. Dor, Y. et al. *Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy*. The EMBO Journal, 2002; 21:1939-1947.
46. Dor, Y., Djonov, V. & Keshet, E.L.I. *Induction of Vascular Networks in Adult Organs: Implications to Proangiogenic Therapy*. Ann NY Acad Sci, 2003; 995: 208-216 (2003).
47. Dirnagl, U. *Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research*. J Cereb Blood Flow Metab, 2006; 26: 1465-1478.
48. Jain, R.K., Finn, A.V., Kolodgie, F.D., Gold, H.K. & Virmani, R. *Antiangiogenic therapy for normalization of atherosclerotic plaque vasculature: a potential strategy for plaque stabilization*. Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine, 2007; 4: 491-502.
49. Hofer, I.E., Piek, J.J. & Pasterkamp, G. *Pharmaceutical interventions to influence arteriogenesis: new concepts to treat ischemic heart disease*. Current Medicinal Chemistry, 2006;13: 979-987.
50. Tejima, E. et al. *Astrocytic induction of matrix metalloproteinase-9 and edema in brain hemorrhage*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2007; 27: 460-468.
51. Yong, V., Agrawal, S. & Stirling, D. *Targeting MMPs in Acute and Chronic Neurological Conditions*. Neurotherapeutics, 2007; 4: 580-589.
52. Carmeliet, P. *Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases*. Nature Reviews Genetics, 2003; 4: 710-720.
53. Chopp, M., Zhang, Z.G. & Jiang, Q. *Neurogenesis, Angiogenesis, and MRI Indices of Functional Recovery From Stroke*. Stroke, 2007; 38: 827-831.
54. Teng, H. et al. *Coupling of angiogenesis and neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007.
55. Chopp, M., Li, Y. & Zhang, J. *Plasticity and remodeling of brain*. Journal of the Neurological Sciences, 2008; 265: 97-101.

