



TERAPI NEUROPROTEKTIF ENDOGEN MENGGUNAKAN EBSELEN UNTUK MEMPERKUAT EFEK KONJUGASI SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER (SUMO) PADA STROKE ISKEMIK

ENDOGENOUS NEUROPROTECTIVE THERAPY USING EBSELEN TO STRENGTHEN THE EFFECT OF THE CONJUGATED SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER (SUMO) IN ISCHEMIC STROKE

Ignatius Ivan^{1*}, Maureen Miracle Stella¹, Kevin Tandarto¹, Mariani Santosa²

¹ Faculty of Medicine and Health Sciences, Atma Jaya Catholic University of Indonesia, Jakarta, Indonesia

² Department of Physiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Atma Jaya Catholic University of Indonesia, Jakarta, Indonesia

*Corresponding author: ignatiusivan98@gmail.com

KATA KUNCI KEYWORDS

*Stroke; SUMO; Neuroprotektif Endogen
Stroke; SUMO; Endogenous Neuroprotective*

ABSTRAK

Penyakit serebro-kardiovaskular semakin banyak dialami oleh masyarakat dunia hingga saat ini. Di Indonesia sendiri menurut data Riskesdas tahun 2018, kasus stroke tertinggi yang didiagnosa tenaga kesehatan adalah usia 75 tahun keatas (50,2%) dan terendah pada kelompok usia 15-24 tahun (0,6%). Salah satu jenis stroke yakni stroke iskemik terjadi karena adanya tromboembolisme yang menyumbat arteri di serebrum yang selanjutnya dapat menyebabkan iskemia otak fokal, kematian sel otak, kerusakan saraf sensoris, motoris, dan gangguan kognitif. Akhir-akhir ini ditemukan suatu inovasi terbaru dalam mencegah kematian sel neuron di otak dengan memanfaatkan protein small ubiquitin-like modifier (SUMO) sebagai sumber neuroprotektif endogen ketika terjadi stroke iskemik. Ide ini berasal dari penemuan pada tupai tanah bergaris 13 (*Ictidomys tridecemlineatus*) yang ketika melakukan hibernasi terutama pada fase torpor, walaupun aliran darah ke otaknya berkurang, konsumsi energinya menurun, dan suhu tubuh berada dalam keadaan letal (sekitar 5°C), namun tetap dapat mempertahankan proses homeostasis dalam tubuh serta tanpa adanya kerusakan pada sel otak. SUMO ditemukan pada seluruh mamalia dan oleh karena itu protein ini dapat dijadikan sebagai target terapi untuk penyakit stroke iskemik pada manusia.

ABSTRACT

*Cerebro-cardiovascular disease is increasingly experienced by the world community today. In Indonesia, according to the 2018 Riskesdas data, the highest stroke cases diagnosed by health workers are aged 75 years and above (50,2%) and the lowest in the 15-24 years age group (0.6%). One type of stroke namely ischemic stroke occurs due to thromboembolism which clogs the arteries in the cerebrum which can subsequently cause focal brain ischemia – brain cell death, sensory nerve damage, motor damage, and cognitive impairment. Lately, a recent innovation has been found in preventing neuronal cell death in the brain by utilizing the small ubiquitin-like modifier protein (SUMO) as an endogenous neuroprotective source when an ischemic stroke occurs. This idea originated from the discovery of the 13-striped ground squirrel (*Ictidomys tridecemlineatus*) which when hibernating mainly in the torpor phase, although blood flow to the brain is reduced, energy consumption decreases, and body temperature is in a lethal state (around 5°C), but can still maintain the process of homeostasis in the body and without damage to brain cells. SUMO is found in all mammals and therefore this protein can be used as a therapeutic target for ischemic stroke in humans.*

PENDAHULUAN

Penyakit serebro-kardiovaskular semakin banyak dialami oleh masyarakat dunia hingga saat ini (Bernstock *et al.*, 2017; Feigin *et al.*, 2013) Kasus ini tidak hanya menyerang para lansia saja, namun juga menyerang orang dewasa berumur 20-64 tahun bahkan anak-anak sekalipun. Pada tahun 2013 secara global ditemukan kasus stroke iskemik sebanyak 7.3 juta sementara untuk jenis stroke hemoragik sebanyak 3.7 juta dan angka ini mengalami peningkatan dari tahun 1990 (Feigin *et al.*, 2017). Tingkat mortalitas dari stroke iskemik di negara berkembang juga mengalami peningkatan dari tahun 1990 (Feigin *et al.*, 2015). Di Indonesia sendiri menurut data Riskesdas tahun 2018, kasus stroke tertinggi yang didiagnosa tenaga kesehatan adalah usia 75 tahun keatas (50,2%) dan terendah pada kelompok usia 15-24 tahun (0,6%) (Kemenkes RI., 2018). Stroke merupakan

penyebab utama disabilitas pada orang tua dan penyebab kedua kematian terbanyak di dunia (Beg *et al.*, 2015).

Salah satu jenis stroke yakni stroke iskemik terjadi karena adanya tromboembolisme yang menyumbat arteri di serebrum yang selanjutnya dapat menyebabkan iskemia otak fokal, kematian sel otak, dan kerusakan saraf sensoris, motoris dan gangguan kognitif (Dirnagl *et al.*, 1999). Terapi stroke iskemik saat ini banyak yang hanya melalui trombolisis dan sayangnya metode ini terbatas oleh waktu aplikasi dan indikasi (Bernstock *et al.*, 2017; Beg *et al.*, 2015). Selain itu, berbagai terapi yang bersifat neuroprotektif untuk mencegah kematian sel neuron telah gagal dalam uji klinis lanjut meskipun menunjukkan keberhasilan selama eksperimen sehingga sampai saat ini belum ada terapi yang benar-benar efektif yang menargetkan keseluruhan proses stroke

yang merusak neuron baik selama maupun setelah terjadinya stroke iskemik (Chamorro *et al.*, 2016; Minnerup *et al.*, 2012).

Akhir-akhir ini ditemukan suatu inovasi terbaru dalam mencegah kematian sel neuron di otak dengan memanfaatkan protein *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) sebagai sumber neuroprotektif endogen ketika terjadi stroke iskemik (Bernstock *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016). Ide ini berasal dari penemuan pada tupai tanah bergaris 13 (*Ictidomys tridecemlineatus*) yang ketika melakukan hibernasi terutama pada fase torpor, walaupun aliran darah ke otaknya berkurang, konsumsi energinya menurun, dan suhu tubuh berada dalam keadaan letal (sekitar 5°C), namun tetap dapat mempertahankan proses homeostasis dalam tubuh serta tanpa adanya kerusakan pada sel otak. (Lee *et al.*, 2011; Bernstock *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016).

SUMO ditemukan pada seluruh mamalia dan oleh karena itu protein ini dapat dijadikan sebagai target terapi untuk penyakit stroke iskemik pada manusia karena berhubungan dengan kurangnya aliran darah ke otak dan konsep ini sama seperti keadaan ketika tupai tanah yang sedang hibernasi (Gareau *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2018).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Bernstock *et al.*, ditemukan satu senyawa yang bernama ebselen yang mampu memperkuat efek SUMO-lasi ini (Bernstock *et al.*, 2017; Datwyler *et al.*, 2011). Melalui esai ini, akan dibahas mengenai potensi ebselen sebagai terapi terbaik yang

mampu mencegah kematian sel otak akibat stroke.

PEMBAHASAN

SUMO adalah kumpulan protein yang terdiri atas sekitar 100 asam amino. Di mamalia, terdapat 4 jenis SUMO yaitu SUMO1, SUMO2, SUMO3 dan SUMO4. SUMO2 dan SUMO3 sangat identik (96% homolog) sehingga sering dinamakan SUMO2/3. SUMO 1 hanya 45% homolog terhadap SUMO2/3 sementara SUMO4, yang baru saja ditemukan, 86% homolog terhadap SUMO2 (Bernstock *et al.*, 2017; Gareau *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2016). Meskipun SUMO2 dan SUMO3 berbeda, adanya delesi pada gen pengatur masing-masing menimbulkan efek fisiologis yang berbeda dimana pada tikus, delesi SUMO2 menyebabkan kematian embrio pada percobaan di tikus sementara delesi SUMO3 tidak menunjukkan kelainan fenotip (Yang *et al.*, 2016).

SUMO berperan dalam berbagai proses homeostasis dalam sel meliputi transduksi sinyal, pemodelan ulang kromatin, ekspresi gen, dan kontrol kualitas protein (Bernstock *et al.*, 2017). Selain itu target aktivitasnya meliputi berbagai jalur protein yang berkaitan dengan iskemia dan fungsi neuron contohnya *Hypoxia Inducible Factor-1* (HIF1), *Heat Shock Factor-1* (HSF1), I κ B α , dan protein kanal kalium (Yang *et al.*, 2016). SUMO tidak dapat langsung bekerja karena protein ini disintesis dalam keadaan inaktif sehingga harus dimaturasi oleh aktivitas endopeptidase, *SUMO-specific protease* (SENp) untuk mengekspos motif di-glisin (Gly-Gly) pada terminal karboksilnya. Konjugasi mulai ketika enzim heterodimer E1 (*SUMO-Activating Enzyme* 1/2)

melakukan adenilasi pada SUMO dalam keadaan yang bergantung ATP dan Mg^{2+} sehingga terbentuk ikatan kovalen thioester intermediet E1-SUMO (Bernstock *et al.*, 2017; Gareau *et al.*, 2010). Setelah aktivasi, kompleks ini akan ditransfer ke bagian katalitik Cys pada enzim E2 Konjugase yakni *Ubiquitine-like Conjugating Enzyme 9* (Ubc9). Selanjutnya kompleks ini akan mengkatalis konjugasinya dengan substrat namun dengan bantuan enzim E3 ligase. Pengenalan substrat terjadi dengan adanya konsensus motif (Ψ KXE) yang mengandung aseptor Lys pada substrat tersebut sehingga apabila konjugasi terjadi maka regulasi aktivitas, stabilitas, maupun lokalisasi subselular dapat terjadi (Bernstock *et al.*, 2017; Gareau *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2016).

Tentu dalam menjaga kestabilan suatu jalur biokimia, diperlukan adanya komponen yang memulai maupun yang menghentikannya. Oleh karena itu, aktivitas dari SUMO-lasi ini akan dihentikan melalui dekonjugasi (aktivitas isopeptidase) yang dibantu oleh enzim SENP1-3 dan SENP5-7 pada mamalia. SENP1 dan SENP2 memiliki aktivitas katalitik tertinggi dengan spesifisitas yang luas terhadap seluruh SUMO, walaupun SENP1 dominan bekerja pada SUMO1 dan SENP2 pada SUMO2/3. SENP3 dan SENP5-7 dominan bekerja pada SUMO2/3 (Bernstock *et al.*, 2017; Gareau *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2016).

Berdasarkan mekanisme diatas, para peneliti berusaha untuk memperkuat aktivitas konjugasi antara SUMO dengan substratnya sehingga efek neuroprotektif dapat berlangsung lebih lama. Bahkan sebenarnya, tanpa dilakukan peningkatan

efek konjugasi, mekanisme SUMO-lasi dalam sel - yang telah distimulasi oleh keadaan kekurangan oksigen dan glukosa selama 6 jam sebelum percobaan - sudah dapat mengurangi kematian sel otak sebanyak 30% ketika suhunya $37^{\circ}C$, setelah sel-sel ini dipajankan oleh lingkungan kurang oksigen dan glukosa lebih lama (12 jam) dan semakin baik dalam keadaan hipotermia ($4^{\circ}C$) yakni terjadi penurunan kematian sel otak sebanyak 50%.¹⁹ Oleh karena itu bisa diperkirakan keuntungan yang bisa diperoleh jika efek SUMO-lasi ini berhasil dipertahankan lebih lama dan hal ini bisa dilakukan dengan meningkatkan aktivitas enzim E2 Konjugase (Ubc9) sebagai upaya untuk meningkatkan level konjugasi SUMO atau menghambat aktivitas SENP sehingga dekonjugasi SUMO akan terhambat dan akhirnya jumlah SUMO yang terkonjugasi tetap tinggi (Peters *et al.*, 2017; Gareau *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2007).

Terdapat berbagai macam mekanisme terapi yang dapat dikembangkan dari aktivitas SUMO-lasi ini. Namun menghambat aktivitas enzim dengan molekul kecil dipercaya tidak sulit melakukan stimulasi aktivitas enzim. Sehingga cara yang terbaik untuk memperkuat aktivitas SUMO-lasi ini adalah dengan mencari senyawa yang mampu menghambat aktivitas de-SUMO-lasi yakni dengan menghambat aktivitas isopeptidase SENP (Yang *et al.*, 2016). Selanjutnya, dari berbagai jenis SENP yang ada, SENP1 tidak dipilih sebagai target terapi karena aktivitas isopeptidase-nya yang lebih rendah dibandingkan SENP yang lain. Selain itu SENP1 lebih berperan sebagai endopeptidase yang bekerja di awal untuk

maturasi SUMO (Mikolajczyk *et al.*, 2007). Diantara SENP2,-3 dan SENP5-7, yang memiliki spesifisitas yang lebih luas dan aktivitas katalitik yang paling tinggi adalah SENP2 (Bernstock *et al.*, 2017; Mendes *et al.*, 2016; Mikolajczyk *et al.*, 2007). Walaupun berdasarkan penelitian Mikolajczyk *et al.*, SENP3 merupakan target ideal terapi untuk mengurangi dekonjugasi SUMO, namun karena berbagai hambatan teknis seperti sulitnya mendapatkan jumlah domain katalitik yang stabil dan aktif maka SENP 2- lah yang lebih dipilih untuk digunakan (Mikolajczyk *et al.*, 2007). Ditambah lagi dengan adanya penelitian yang dilakukan oleh Kang *et al.*, yang menemukan delesi gen pengatur *SENP2* pada embrio tikus akan meningkatkan aktivitas konjugasi SUMO1 dan SUMO2/3 secara signifikan (Kang *et al.*, 2010). Sehingga dari alasan-alasan diatas, SENP2 dapat dipercaya sebagai target terapi yang paling baik (Bernstock *et al.*, 2017; Mendes *et al.*, 2016; Mikolajczyk *et al.*, 2007).

Penelitian yang membahas mengenai senyawa yang mampu melakukan inhibisi pada SENP2 sebagai upaya untuk memperkuat efek konjugasi SUMO masih sangat minim karena informasi yang membahas mengenai perbandingan efektivitas target terapi masing-masing komponen yang bekerja dalam mekanisme SUMO-lasi masih terbilang sangat baru. Penelitian yang dilakukan oleh Bernstock *et al.* dan baru-baru saja terpublikasi yaitu pada November 2017, berhasil menemukan 1 dari 4096 senyawa yang diperiksa untuk kemungkinan potensinya dalam menghambat SENP2 (Bernstock *et al.*, 2017). Hal ini dilakukan dengan menggunakan *quantitative High-throughput screen* (qHTS)

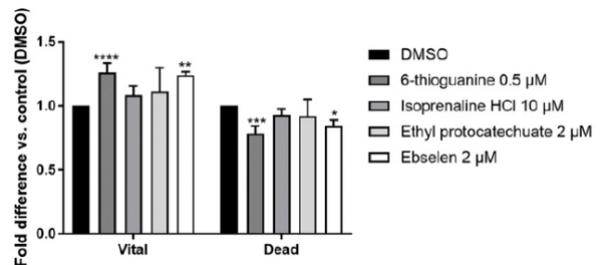
assay yang pada akhirnya mampu mengidentifikasi 71 dari 4096 senyawa yang berpotensi menghambat SENP2. Selanjutnya dari 71 senyawa tersebut dilakukan uji aktivitas dalam melakukan inhibisi pada SENP2 terhadap SUMO2/3 yang dilakukan dalam *orthogonal cell-free assay*. Efektivitas inhibisi ditentukan berdasarkan tidak adanya potongan SUMO pada 18 ~kDa. Hasilnya didapatkan 19 senyawa dan hasil uji toksisitas menyaringnya menjadi 13 senyawa. Kemudian dalam *cellular thermal shift assay* (CETSA), dilakukan uji stabilitas termal selama terjadinya keterikatan antar senyawa dan hasilnya adalah 8 senyawa. Dari 8 senyawa didapatkan 4 senyawa yang paling efektif dalam menstimulasi konjugasi SUMO1 dan SUMO2/3. Pada akhirnya, uji terakhir dilakukan dengan menciptakan keadaan yang minim oksigen maupun glukosa di dalam sel selama 20 jam dan didapatkan 2 senyawa yang paling mampu dalam menginduksi konjugasi SUMO yaitu ebselen dan 6-thioguanine. Sayangnya, 6-thioguanine merupakan obat kemoterapi yang memiliki banyak efek samping sehingga tidak baik untuk terapi stroke. Oleh karena itu, berdasarkan analisis yang dilakukan pada 4096 senyawa maka yang paling baik untuk saat ini adalah ebselen (Bernstock *et al.*, 2017).

Ebselen merupakan senyawa sintetik organo-selenium yang pada awalnya diketahui dapat mengurangi hidrogen peroksida karena aktivitasnya mirip seperti glutathion peroksidase. Sehingga, ebselen memang memiliki efek antioksidan yang neuroprotektif. Senyawa ini telah dipakai untuk mengurangi stress oksidatif yang ditimbulkan peroksidasi fosfolipid pada

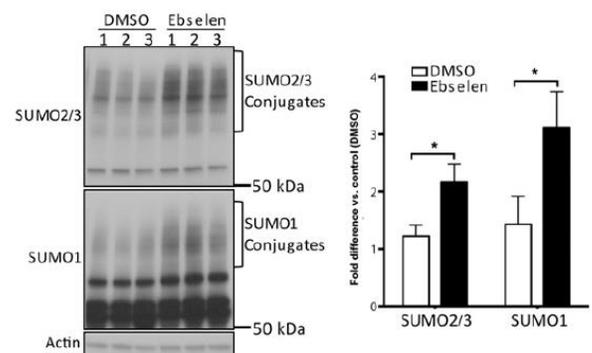
membran sel dan rusaknya sistem antioksidan intraselular selama terjadinya iskemia pada jaringan otak (Yamaguchi *et al.*, 1998; Noguchi *et al.*, 2016). Ebselen diberikan secara oral karena tidak larut air namun mudah diserap pencernaan dan konsentrasinya dapat stabil dalam plasma darah serta dosis obat ini yang paling efektif adalah 300 mg/hari (Yamaguchi *et al.*, 1998; Labiche *et al.*, 2004). Dahulu ebselen ini hanya dipandang memiliki efek antioksidan dan belum diketahui bahwa ternyata memiliki keterkaitan juga dengan jalur SUMO-lasi yang berperan penting dalam mencegah kematian sel otak akibat stroke iskemik (Bernstock *et al.*, 2017; Yamaguchi *et al.*, 1998). Namun, masih ada kekhawatiran terhadap potensi toksisitas selenium (Noguchi *et al.*, 2016; Parnham *et al.*, 2013).

Walaupun demikian, ternyata uji klinis membuktikan bahwa jika ebselen digunakan <24 jam semenjak onset terjadinya stroke iskemik, maka akan terbukti dapat memberikan efek profilaksis dari berbagai gangguan serebro-kardiovaskular dan contoh lainnya seperti pada potensi gangguan yang timbul saat dilakukannya endarterektomi karotis, atau mendapatkan diagnosis penyakit Binswanger (Yamgauchi *et al.*, 1998; Tymianski *et al.*, 2017). Selain itu, efektivitas dalam menjaga sel-sel otak yang bisa diselamatkan setelah terjadi stroke yang diketahui melalui pencitraan otak dibuktikan oleh penggunaan ebselen. Hasil penelitian pada kelompok orang berusia rata-rata 65 tahun juga didapatkan efek pemulihan 10% lebih baik jika diterapi oleh ebselen 300 mg/hari dibandingkan kelompok yang hanya diberikan plasebo. Lebih lanjut,

penelitian *in vitro* pada sel neuroblastoma B35 di tikus yang dilakukan oleh Bernstock *et al.*, penggunaan ebselen 2 μ M saat lingkungan dalam keadaan kekurangan oksigen-glukosa (20 jam) akan menurunkan kematian sel otak sekitar 25% lebih rendah dibandingkan kontrol (Dimetil Sulfoksida/DMSO) (Gambar 1). Selain itu, ketika diuji *in vivo* pada tikus dengan injeksi intraperitoneal (12 mg/kg), didapatkan aktivitas SUMO1 dan SUMO2/3 lebih baik 2 kali lipat dari kontrol (Gambar 2) (Bernstock *et al.*, 2017).



Gambar 1. Hasil terapi awal dalam lingkungan kekurangan oksigen-glukosa (KOG) secara *in vitro* dalam sel neuroblastoma B35 tikus¹



Gambar 2. Hasil terapi awal dalam lingkungan kekurangan oksigen-

glukosa (KOG) secara *in vivo* melalui injeksi intraperitoneal ebselen pada tikus¹

Selain yang telah disebutkan diatas, alternatif lainnya dapat dilakukan melalui target terapi terhadap *micro*-RNA-182 dan *micro*-RNA-183. Penelitian yang dilakukan oleh Bernstock et al, menemukan bahwa ketika kadar famili miRNA-200 dan miRNA-182 menurun dalam otak tupai tanah ketika hibernasi pada fase torpor, ditemukan adanya aktivitas SUMO-lasi global yang meningkat dan dengan menghambat miRNA ini maka akan terjadi peningkatan efek konjugasi dari SUMO dalam kultur sel (Bernstock *et al.*, 2017; Bernstock *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016). Penelitian lain yang dilakukan oleh Cuomo et al, menemukan adanya target terapi yang berbeda yakni pada antiporter Na⁺/Ca²⁺ (NCX3) di membran plasma sel otak yang tentu saja dengan adanya konjugasi dari SUMO1 hasilnya terbukti mampu memberikan efek neuroprotektif. Keadaan ini terinduksi ketika adanya kondisi seperti hipoksia dan pada akhirnya konjugasi SUMO1 pada NCX3 mampu menjaga stabilitas dan aktivitas serta mempertahankan antiporter ini agar tidak terdegradasi (Cuomo et al., 2016).

Meskipun berdasarkan hasil analisis 4096 senyawa didapatkan ebselen sebagai pilihan yang terbaik, perlu diingat bahwa berdasarkan penelitian Yamaguchi et al, efektivitas penggunaan ebselen yang dahulu dikenal sebagai antioksidan paling efektif sebelum 24 jam semenjak onset stroke iskemik (Yamaguchi *et al.*, 1998). Sehingga masih terdapat batasan waktu

penggunaan dan oleh karena itu, perlu diadakan penelitian lebih lanjut untuk mencari senyawa lain yang lebih baik dan mampu bekerja pada SENP2 sehingga hasil terapi yang didapatkan lebih efektif.

KESIMPULAN

Terapi untuk mencegah efek yang lebih mematikan akibat stroke sangat menarik untuk diteliti mengingat penyakit ini menjadi penyebab utama disabilitas pada orangtua dan penyebab kematian kedua terbanyak di dunia. Baru-baru ini ditemukan bahwa jalur SUMO-lasi ternyata berpotensi menjadi target terapi untuk mencegah kematian sel otak yaitu dengan cara memperkuat efek konjugasi SUMO yang bisa dilakukan melalui inhibisi pada protein yang melakukan dekonjugasi pada SUMO, yaitu SENP2. Setelah dilakukan analisis terhadap 4096 senyawa, didapatkan ebselen sebagai obat yang mampu bekerja pada SENP2 dan memiliki potensi terbaik karena secara *in vitro* berhasil menurunkan kematian sel otak sekitar 25% dan secara *in vivo*, didapatkan aktivitas SUMO1 dan SUMO2/3 lebih baik 2 kali lipat daripada kontrol. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mencari senyawa lain yang memiliki efektivitas lebih tinggi dengan batas waktu aplikasi yang lebih lama.

DAFTAR PUSTAKA

- Beg M *et al.* 2015. Epidemiological study of incidence and risk factors of Ischemic stroke subtypes according to Trial of ORG 10172 in acute stroke treatment criteria: A 3 years, hospital-based study. *Int J Med Public Health.* 5(1): 50.

- Bernstock JD *et al.* 2016. A novel quantitative high-throughput screen identifies drugs that both activate SUMO conjugation via the inhibition of microRNAs 182 and 183 and facilitate neuroprotection in a model of oxygen and glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 36(2): 426-41.
- Bernstock JD *et al.* 2017. Quantitative high-throughput screening identifies cytoprotective molecules that enhance SUMO conjugation *via* the inhibition of SUMO-specific protease (SEN)2. *FASEB J.* 16: fj.201700711R.
- Chamorro Á, Dirnagl U *et al.* 2016. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol.* 15(8): 869-81.
- Cuomo O *et al.* 2016. Sumoylation of LYS590 of NCX3 f-Loop by SUMO1 participates in brain neuroprotection induced by ischemic preconditioning. *Stroke.* 47(4): 1085-1093.
- Datwyler AL *et al.* 2011. SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab.* 31(11): 2152-9.
- Dirnagl U *et al.* 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22(9) : 391-397.
- Feigin VL *et al.* 2013. Global burden of stroke and risk factors in 188 countries, during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Neurol.* 15(9) : 913-924.
- Feigin VL *et al.* 2017. Global Burden of Stroke. *Circ Res.* 120(3) : 439-48.
- Feigin VL *et al.* 2015. Update on the Global Burden of Ischemic and Hemorrhagic Stroke in 1990-2013: The GBD 2013 Study. *Neuroepidemiology.* 45(3): 161-76.
- Gareau JR and Lima CD 2010. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(12): 861-71.
- Kang X *et al.* 2010. SUMO-Specific Protease 2 Is Essential for Suppression of Polycomb Group Protein-Mediated Gene Silencing during Embryonic Development. *Mol Cell.* 238(2): 191-201.
- Kemenkes RI. *Riset Kesehatan Dasar* 2018. Kementrian Kesehatan
- Labiche LA and Grotta JC 2004. Clinical trials for cytoprotection in stroke. *NeuroRx.* 1(1): 46-70.
- Lee Y *et al.* 2011. Elevated Global SUMOylation in Ubc9 Transgenic Mice Protects Their Brains against Focal Cerebral Ischemic Damage. *PLoS ONE.* 6(10): e25852.

- Lee Yet *et al.*, 2007. Protein SUMOylation is massively increased in hibernation torpor and is critical for the cytoprotection provided by ischemic preconditioning and hypothermia in SHSY5Y cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27(5): 950–62.
- Lee Y and Hallenbeck JM 2013. SUMO and Ischemic Tolerance. *NeuroMolecular Med.* 4: 771–81.
- Mendes AV *et al.*, 2016. Evaluation of the activity and substrate specificity of the human SENP family of SUMO proteases. *Biochim Biophys Acta BBA. Mol Cell Res.* 1863(1): 139–47.
- Mikolajczyk J *et al.*, 2007. Small Ubiquitin-related Modifier (SUMO)-specific Proteases: Profiling the Specificities and Activities of Human SENPs. *J Biol Chem* 282(36): 26217–24.
- Minnerup J *et al.* 2012. Neuroprotection for Stroke: Current Status and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 13(12): 11753–72.
- Noguchi N 2016. Ebselen, a useful tool for understanding cellular redox biology and a promising drug candidate for use in human diseases. *Arch Biochem Biophys.* 595: 109–12.
- Parnham MJ and Sies H 2013. The early research and development of ebselen. *Biochem Pharmacol.* 86(9): 1248–53.
- Peters M *et al.*, 2017. The role of SUMOylation in cerebral hypoxia and ischemia. *Neurochem Int.* 107: 66–77.
- Truelsen T *et al.* 2006. *Global burden of cerebrovascular disease in the year 2000.*In: GBD 2000 Working Paper. Geneva, Switzerland: WHO
- Tymianski M 2017. Combining Neuroprotection With Endovascular Treatment of Acute Stroke. *Stroke.* 48(6): 1700–1705.
- Yamaguchi T *et al.* 1998. Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Ebselen Study Group Stroke.* 29(1): 12–7
- Yang W *et al.* 2016. Targeting the SUMO pathway for neuroprotection in brain ischaemia. *Stroke Vasc Neurol.* 1(3): 101–107.
- Zhang L *et al.*, 2017. Neuron-specific SUMO knockdown suppresses global gene expression response and worsens functional outcome after transient forebrain ischemia in mice. *Neuroscience.* 343: 190–212.

