

## ***The Effect of Ischemic Duration on Expression of P53 Protein in Rat Brain Post TBCCAO***

### **Pengaruh Durasi Iskemia terhadap Ekspresi Protein P53 Otak Tikus Pasca *Transient Bilateral Common Carotid Artery Occlusion* (TBCCAO)**

**Ety Sari Handayani<sup>a,\*</sup>, Kuswati<sup>a</sup>, Zainuri Sabta Nugaha<sup>a</sup>, Nurul Hidayah<sup>b</sup>, Nesti Herennadia<sup>b</sup>, Gea Sonia Amanda<sup>b</sup>, Salsabila Ajeng<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta

<sup>b</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta

\*Corresponding author: eshyasser@yahoo.co.id

#### **Abstract**

*Tumor suppressor gene p53 is one of the specific parameters of the occurrence of brain neuron death in animal models of brain ischemia. Several studies show that the duration of reperfusion of TBCCAO has an effect on the expression of p53 protein. The duration of ischemia for 5 minutes followed by reperfusion of 1 hour, 4 hours, 8 hours, 24 hours, and 7 days increased the expression of p53 protein. 30-minute ischemia induction followed by 4-hour reperfusion showed increased p53 protein expression in rat serum. It is not yet known how the influence of TBCCAO ischemia duration on p53 expression in rat brain. This study used Wistar, male rats, aged 3-4 months, weighing 175-250 g, and healthy. Group A was a group of TBCCAO rats with a duration of 5 minutes ischemia, 24-hour reperfusion duration (five). Group B was a group of TBCCAO mice with a duration of 10 minutes ischemia, 24-hour reperfusion (five). Group C was a group of TBCCAO mice with a duration of 20 minutes ischemia, 24-hour reperfusion (five). Group D was a group of sham-operated mice (five). The expression of p53 protein is semi quantification of p53 expressed on the pyramidal neuron of the frontal brain (cortex prefrontal, striatum) and CA1 hippocampus, with IHC staining using anti-p53 antibodies. P53 expression will be seen in the cytoplasm of pyramidal neuron CA1 hippocampus. The cytoplasm of neurons will be brownish in color. The semi-quantification method of p53 expression uses the ALLRED score. Data analysis using one way ANOVA test. The analysis found differences in frontal brain p53 expression (cortex prefrontal and striatum) ( $p = 0.00$ ) and there were differences in p53 expression in pyramidal neuron CA1 hippocampal ( $p = 0.013$ ). There was an effect of the duration of TBCCAO on the expression of p53 protein in rat brain after 24-hour reperfusion.*

**Keywords:** TBCCAO's duration, p53, rat's brain

#### **Abstrak**

*Tumor suppressor gene p53 adalah salah satu parameter spesifik kematian neuron otak pada hewan model iskemia otak. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa durasi reperfusi TBCCAO berpengaruh terhadap ekspresi protein p53. Durasi iskemia selama 5 menit yang diikuti dengan reperfusi 1 jam, 4 jam, 8 jam, 24 jam, dan 7 hari meningkatkan ekspresi protein p53. Induksi iskemia durasi 30 menit yang diikuti dengan reperfusi 4 jam menunjukkan peningkatan ekspresi protein p53 serum tikus. Belum diketahui bagaimana pengaruh durasi iskemia TBCCAO terhadap ekspresi p53 otak tikus. Penelitian ini menggunakan tikus Wistar, jantan, berusia 3-4 bulan, berat badan 175-250 g, dan sehat.*

Kelompok A adalah kelompok tikus TBCCAO dengan durasi iskemia 5 menit, durasi reperfusi 24 jam (lima). Kelompok B adalah kelompok tikus TBCCAO dengan durasi iskemia 10 menit, reperfusi 24 jam (lima). Kelompok C adalah kelompok tikus TBCCAO dengan durasi iskemia 15 menit, reperfusi 24 jam (lima). Kelompok D adalah kelompok tikus *sham operated* (lima). Ekspresi protein p53 adalah semi kuantifikasi p53 yang terekspresikan pada *pyramidal neuron* otak bagian depan (*cortex prefrontalis, striatum*) dan *CA1 hippocampus* dengan pewarnaan IHC menggunakan *antibody* anti p53. Ekspresi p53 akan tampak pada sitoplasma *pyramidal neuron CA1 hippocampus*. Sitoplasma neuron akan berwarna kecoklatan. Metode semi kuantifikasi ekspresi p53 menggunakan skor ALLRED. Analisis data menggunakan uji *one way ANOVA*. Hasil analisis didapatkan perbedaan ekspresi p53 otak bagian depan (*cortex prefrontalis* dan *striatum*) ( $p = 0,00$ ) dan terdapat perbedaan ekspresi p53 *pyramidal neuron CA1 hippocampus* ( $p = 0,013$ ). Terdapat pengaruh durasi TBCCAO terhadap ekspresi protein p53 otak tikus pasca reperfusi 24 jam.

**Kata kunci:** Durasi TBCCAO, p53, otak tikus

## Pendahuluan

Beberapa dekade terakhir model *ischemia/reperfusion injury* (I/R I) pada hewan coba telah banyak digunakan dalam upaya mengkaji penyakit stroke. Cedera iskemia reperfusi (I/R *injury*) adalah cedera otak yang disebabkan oleh mengalirnya kembali darah pada daerah otak yang telah mengalami iskemia. Cedera iskemia reperfusi terdiri dari tiga periode yaitu iskemia, reperfusi dan periode perbaikan (Kalogeris *et al.*, 2014).

Model I/R *injury* yang menginduksi iskemia otak global salah satunya adalah *Bilateral Common Carotid Artery Occlusion* (BCCAO) dengan cara mengikat arteri *carotis communis* kanan dan kiri. Pada teknik ini terdapat dua durasi yaitu durasi iskemia dan durasi reperfusi. Durasi iskemia adalah lamanya oklusi arteri *carotis communis* bilateral dimana bervariasi mulai dari 5 menit sampai dengan 60 menit. Durasi yang kedua adalah durasi reperfusi yaitu waktu sejak dilepaskannya ikatan pada arteri *carotis communis* sampai dilakukan dekapitasi terminasi hewan coba. Variasi durasi reperfusi mulai dari 30 menit sampai dengan 10.080 menit (Handayani *et al.*, 2018; Handayani *et al.*, 2019).

Beberapa penelitian model iskemia otak menunjukkan bahwa durasi reperfusi berpengaruh terhadap ekspresi protein p53.

Normalnya, protein p53 tidak terekspresikan pada *hippocampus* tikus yang berusia 4-6 bulan. Ekspresi protein p53 akan terjadi di CA1 *hippocampus* pada tikus usia tua yaitu usia 15 bulan (Chung *et al.*, 2000). Durasi iskemia selama 5 menit yang diikuti dengan reperfusi 1 jam, 4 jam, 8 jam, 24 jam, dan 7 hari akan meningkatkan ekspresi protein p53 (Endo, Nito, *et al.*, 2006). Induksi iskemia durasi 30 menit yang diikuti dengan reperfusi 4 jam menunjukkan peningkatan ekspresi protein p53 otak (Kizmazoglu *et al.*, 2015). *Tumor suppressor gene* p53 merupakan salah satu parameter spesifik terjadinya kematian neuron otak pada hewan model iskemia otak. Model TBCCAO ini dapat menyebabkan kematian *pyramidal neuron* CA1 *hippocampus*, neuron Purkinje *cerebelum* dan neuron *cortex cerebri* (Endo, Nito, *et al.*, 2006) Kematian neuron CA1 *hippocampus* dalam 1 hari pasca iskemia yang diinduksi dengan teknik BCCAO diduga melibatkan peranan *a pro-apoptotic factor, tumor suppressor gene* p53 (Vaseva & Moll, 2009; Raz *et al.*, 2011). Ekspresi berlebihan protein p53 pada kultur *pyramidal neuron* tikus menyebabkan kematian sel (Jordán *et al.*, 1997). Belum diketahui bagaimana pengaruh durasi iskemia yang diinduksi

oleh TBCCAO terhadap ekspresi p53 otak tikus.

### Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan rancangan *post test only control group design*. Penelitian ini menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar, jantan, berusia 3-4 bulan, berat badan 175-250 g, dan sehat. Subyek terbagi dalam 4 kelompok yaitu Kelompok A adalah kelompok tikus TBCCAO durasi iskemia 5 menit, reperfusi 24 jam. Kelompok B adalah kelompok tikus TBCCAO durasi iskemia 10 menit, reperfusi 24 jam. Kelompok C adalah kelompok tikus TBCCAO durasi iskemia 20 menit, reperfusi 24 jam. Kelompok D adalah kelompok tikus *sham operated*.

Hewan coba adaptasi di kandang IVC berukuran (40x20x20) cm<sup>3</sup>. Satu kandang diisi oleh 2 tikus. Suhu dalam kandang diatur pada suhu kamar. Pencahayaan dalam kandang diatur dengan siklus terang gelap selama 12 jam. Siklus terang dimulai pukul 06.00 WIB dan siklus gelap dimulai pukul 18.00 WIB. Pelet diberikan setiap hari pada pagi hari pukul 06.00 WIB. Air minum diberikan secara *ad libitum* (Handayani *et al.*, 2018).

Prosedur melakukan tindakan TBCCAO berdasarkan prosedur yang telah

dilakukan sebelumnya (Handayani *et al.*, 2018; Handayani *et al.*, 2016). Tikus dianestesi dengan ketamin. Dosis ketamin adalah 80-100 mg/kgBB im. Tikus diletakkan di *platform* steril *Digital Jumbo Hotplate* (LHT-2030D). Suhu rektal tikus dipertahankan pada temperatur  $37 \pm 1$  °C. Desinfeksi bagian leher depan tikus dengan menggunakan larutan betadin. Insisi dilakukan secara vertikal pada bagian medial leher anterior tikus. Arteri *carotis communis* bilateral dieksplorasi dengan teknik diseksi tumpul tanpa memotong glandula *submandibularis* dan *nervus phrenicus*. Jika arteri *carotis communis* telah tampak maka dilakukan ligasi arteri *carotis communis* dengan menggunakan *micro vascular clamp* (*Serrefine Small Curved*. Q1Y:01No) selama 5, 10 dan 20 menit. Jika ligasi telah selesai maka diberikan terapi analgetik yaitu *bupivacain* 0,25% dosis 0,1 mL lokal. Frekuensi pemberian satu kali/hari. Bekas insisi dijahit kembali dengan menggunakan benang *silk*. Daerah disekitar insisi didisinfeksi menggunakan *povidone iodine*.

Eutanasia dilakukan pasca reperfusi 24 jam, dengan teknik perfusi transkardial. Tikus dianestesi menggunakan ketamin dosis 80-100 mg/kgBB im. Insisi linea mediana pada dinding *abdomen* dilakukan setelah tikus

masuk dalam fase anestesi dalam, dilanjutkan insisi sepanjang *linea axilaris* sampai dinding dada terbuka dan jantung terlihat. Ventrikel kiri jantung diinsisi kemudian kanula dimasukkan sampai mencapai *aorta ascenden*. Kanula difiksasi dengan penjepit arteri. Insisi atrium kanan untuk mengeluarkan darah. Cairan perfusi NaCl dialirkan melalui kanula. Agar otak mendapatkan perfusi sepenuhnya maka dilakukan jepitan pada *aorta descendens*. Perfusi dilanjutkan sampai darah yang keluar melalui atrium kanan tampak jernih dan arteri *mamaria interna* di sekitar *sternum* tampak putih karena terisi cairan jernih. Dekapitasi dilakukan setelah perfusi transkardial sempurna, kemudian jaringan otak diambil (Handayani *et al.*, 2018).

Blok parafin jaringan otak bagian depan dan *hippocampus* disayat setebal 5  $\mu\text{m}$  dengan menggunakan *rotary microtome*. Diambil satu sayatan, kemudian dilakukan pewarnaan IHC (imunohistokimia) dengan *antibody anti-p53* (Catalog No.: FNab06083). Pewarnaan IHC dimulai dengan deparafinisasi menggunakan *xylol* dan alkohol dengan konsentrasi menurun. Jaringan selanjutnya diinkubasi dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% dalam 10% methanol selama 20 menit, kemudian dicuci dengan menggunakan akuades tiga kali dan PBS

tiga kali. Selanjutnya dilakukan *antigen retrieval* dengan *buffer* sitrat pH 6 di dalam *microwave*. Irisan dipanaskan dalam temperatur tinggi ( $100^\circ\text{C}$ ) selama 10 menit kemudian dilanjutkan dengan temperatur sedang-rendah selama 20 menit. Setelah itu irisan didinginkan dan dicuci kembali sebanyak tiga kali menggunakan PBS.

Irisan kemudian diblocking dengan protein *background snipper* dalam waktu 10 menit lalu ditetesi antibodi (Ab) primer dan diinkubasi selama satu malam dengan suhu  $4^\circ\text{C}$  sebelum dicuci kembali sebanyak tiga kali dengan PBS. Setelah itu irisan diinkubasi dengan *Trekki Universal Link* selama 10 menit dan dicuci kembali dengan PBS sebanyak tiga kali. Kemudian dilakukan inkubasi dengan *horseradish peroxidase conjugated Streptavidin* (kompleks SA-HRP) selama 10 menit dan dicuci kembali dalam PBS sebanyak tiga kali.

Pengenalan sel yang terlabel p53 dilakukan dengan 3,3'-*diaminobenzidid* (1:100) selama lima menit. Jaringan selanjutnya dicuci sebanyak lima kali menggunakan akuades dan dilanjutkan *counterstained* dengan *hematoxylin meyers* selama satu menit, kemudian cuci dengan air mengalir selama dua menit. Selanjutnya dilakukan dehidrasi menggunakan etanol bertingkat yaitu 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100% masing-

masing selama satu menit. Kemudian dibersihkan dengan *xylene* dan *dicoverslip* dengan *canada balsam*.

Pengamatan preparat histologis menggunakan perbesaran 400x pada mikroskop cahaya *Olympus CX21* dengan kamera *optilab* yang terhubung pada komputer. Komputer yang terhubung dengan mikroskop memiliki *software optilab viewer* untuk merekam gambar.

Ekspresi protein p53 adalah semi kuantifikasi p53 yang terekspresikan pada *pyramidal neuron cortex prefrontalis* dan *striatum (forebrain)* dan CA1 *hippocampus* dengan pewarnaan IHC menggunakan *antibody* anti p53. Ekspresi p53 akan tampak pada sitoplasma neuron. Sitoplasma neuron akan berwarna kecoklatan. Ekspresi p53 dinilai menggunakan *Allred scoring* yang mempertimbangkan proporsi sel positif dalam skala 0-5 dan intensitas warna dalam skala 0-3. Hasil penilaian dari kedua parameter itu akan dijumlah untuk menginterpretasikan ekspresi p53. Jika didapatkan hasil penjumlahan 0-2 maka ekspresi p53 dianggap negatif, sedangkan hasil penjumlahan 3-8 maka ekspresi p53 dianggap positif.

Uji normalitas data menggunakan uji *shapiro-wilk*. Perbedaan ekspresi p53 antar kelompok diuji dengan uji statistik *Analyze of Varian* atau ANOVA. Jika

hasil analisis data yang didapatkan signifikan ( $p < 0,05$ ) maka dilanjutkan dengan *post-hoc test*.

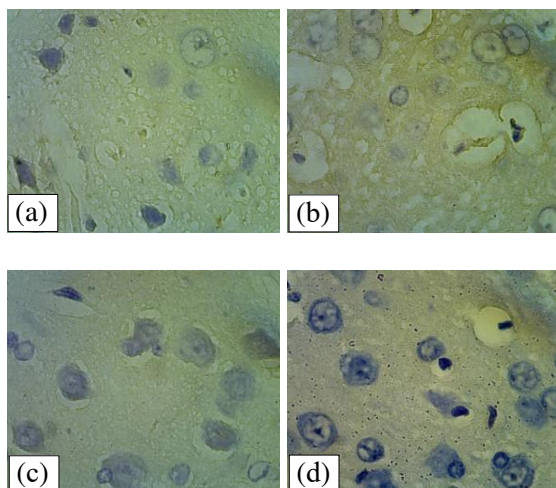
## Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini telah mendapatkan kelayakan etik dengan nomor 20/Ka.Kom.Et/70/KE/VIII/2017. Ekspresi p53 dalam neuron tampak berwarna kecoklatan. Ekspresi protein p53 di kelompok kontrol lebih rendah dibandingkan kelompok perlakuan TBCCAO (Gambar 1 dan 2). Analisis statistik membuktikan bahwa peningkatan durasi iskemia 5 dan 20 menit dapat meningkatkan ekspresi p53 otak bagian depan (*cortex prefrontalis* dan *striatum*) tikus (Tabel 1). Terdapat perbedaan ekspresi protein p53 *hippocampus* antar kelompok penelitian (Tabel 2).

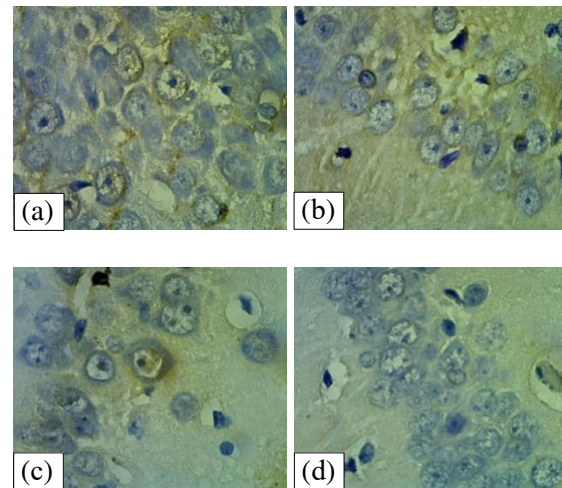
Ekspresi p53 dinyatakan dalam skor *allred*. Nilai 0-2 menunjukkan bahwa ekspresi p53 negatif, sedangkan nilai 2-8 menunjukkan ekspresi p53 positif. Ligase arteri *carotis communis* bilateral selama 5 dan 20 meningkatkan ekspresi p53 di bagian otak depan yaitu *cortex prefrontalis* dan *striatum*. Terdapat perbedaan ekspresi protein p53 CA1 *Hippocampus* otak tikus antar kelompok penelitian.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kerusakan otak tikus dengan model TBCCAO melibatkan protein p53. Hasil

penelitian ini sesuai dengan penelitian lainnya yaitu terdapat peningkatan kadar p53 serum tikus pasca induksi iskemia 5 menit dengan reperfusi 1, 4, 8, 24 dan 72 jam (Endo, Nito, *et al.*, 2006). Saat otak mengalami iskemik maka akan terjadi peningkatan faktor transkripsi p53 yang dapat menginduksi apoptosis. Filichia *et al.* (2016) menyebutkan bahwa penghambatan aktivitas p53 neuron otak bagian depan dapat mempertahankan jumlah neuron pasca induksi iskemia (Filichia *et al.*, 2016).



**Gambar 1.** Ekspresi p53 neuron *forebrain*: (a) Kelompok TBCCAO durasi iskemia 5 menit, (b) Kelompok TBCCAO durasi iskemia 10, (c) Kelompok TBCCAO durasi iskemia 20 menit, (d) Kelompok *sham operated*



**Gambar 2.** Ekspresi p53 neuron CA1 Hippocampus: (a) Kelompok BCCAO durasi iskemia 5 menit, (b) Kelompok BCCAO durasi iskemia 10, (c) Kelompok BCCAO durasi iskemia 20 menit, (d) Kelompok *sham operated*

Berdasarkan area otak yang mengalami perubahan maka hasil penelitian ini mendukung berbagai hasil penelitian sebelumnya dimana dijumpai iskemia dan perubahan seluler otak bagian depan pasca TBCCAO. Terdapat gliosis, infiltrasi limfosit, edema otak pada bagian otak depan pasca BCCAO 30 menit dengan reperfusi 45 menit (Singh *et al.*, 2007). Nandagopal *et al.* (2010) menjumpai adanya kerusakan pada otak bagian depan dan CA1 hippocampus pasca ligasi selama 10-15 menit (Nandagopal *et al.*, 2010). Handayani *et al.* (2018) menunjukkan bahwa iskemia terjadi di *cortex prefrontalis* dan *striatum* pasca ligasi 5 menit yang diikuti dengan reperfusi 24 jam (Handayani *et al.*, 2018).

**Tabel 1.** Uji statistika ekspresi p53 *forebrain* berdasarkan durasi iskemia TBCCAO

	Rerat a Skor Allred	SD	P valu e	Post hoc			
				A	B	C	D
A	4,15	0,67			0,11	0,02*	0,00*
B	5,22	0,16		0,11		0,34	0,00*
C	6,06	0,87		0,02*	0,348		0,00*
D	0,43	0,65	0,00*	0,00*	0,00*	0,00*	

**Tabel 2.** Uji statistik ekspresi p53 *pyramidal neuron CA1 hippocampus* berdasarkan durasi iskemia TBCCAO

Kelompok	Rerata Skor Allred	SD	Uji Normalitas	Kruskal Walis
A	5,099	0,664	1,000	0,011*
B	5,416	0,451	0,042	
C	5,800	0,836	0,314	
D	3,594	1,384	0,038	

Kondisi iskemia reperfusi akan menghambat enzim Kompleks I dan Kompleks IV mitokondria sehingga menyebabkan peningkatan kadar ion kalsium intraseluler dan peningkatan produksi *reactive oxygen spesicies* (ROS) mitokondria (Lehotský *et al.*, 2009). Induksi TBCCAO selama 15 menit dengan reperfusi 24 jam dapat meningkatkan kadar ROS (Lin *et al.*, 2016; Endo, Nito, *et al.*, 2006). Kadar ROS yang tinggi menyebabkan rusaknya DNA inti sel sehingga ekspresi p53 dalam inti sel akan meningkat (Niizuma *et al.*, 2008). Peningkatan p53 inti akan diikuti dengan peningkatan p53 sitoplasma dan tranlokasi

p53 sitoplasma ke mitokondria. p53 akan menginduksi protein pro-apoptotic seperti *Bax*, *Noxa*, *p53AIP1*, PUMA, dan *Bid*. Berbagai senyawa tersebut akan beraksi dalam mitokondria. Translokasi p53 ke dalam membran mitokondria akan mengaktifasi *mitochondria-dependent apoptotic pathway*. Kompleks inhibitor p53- anti-*apoptotic* Bcl-XL and Bcl-2 proteins, menyebabkan pelepasan *cytochrome c release* dan aktivasi *caspase* (Endo, Kamada, *et al.*, 2006). Durasi iskemia 5 menit dengan reperfusi 1, 4, 8, 24, dan 72 jam menyebabkan translokasi p53 ke mitokondria dan terbentuknya ikatan Bcl-XL. Ikatan ini akan menginduksi pelepasan *cytochrome c* dari mitokondria ke sitoplasma dan menyebabkan kematian *pyramidal neuron CA1 hippocampus* (Endo, Nito, *et al.*, 2006). Translokasi p53 terjadi di mitokondria *hippocampus* tetapi tidak terjadi mitokondria *cortex* (Lehotský *et al.*, 2009).

Pemberian *pifithrin-alpha* (PFT $\alpha$ ), suatu inhibitor p53 memperlemah transport p53 *nuclear* dan DNA *binding*, terbukti memperkuat neuron dan meningkatkan kesembuhan pasca stroke. Interaksi protein *kinase 1* (DAPK1) - p53 merupakan titik penting untuk menentukan apakah sel akan mengalami nekrosis atau apoptosis pada kejadian stroke iskemik.



DAPK1 berikatan dengan p53DM dan mengkatalisis pS23, dimana akan masuk ke dalam inti dan mengaktifkan ekspresi gen pro apoptosis. Sebaliknya, jika pS23 masuk ke mitokondrial dan berinteraksi dengan *cyclophilin D* maka sel akan menjadi nekrosis (Pei *et al.*, 2014). Mekanisme stroke lainnya dapat melalui jalur GAPDH-p53. Translokasi GAPDH ke dalam inti sel menyebabkan pembentukan ikatan GAPDH-p53. Ikatan ini menyebabkan aktivasi *p53-dependent cell death pathway*. p53 mengatur ekspresi GAPDH (Zhai *et al.*, 2014). Protein p53 dapat menginduksi apoptosis pasca iskemia otak melalui mekanisme penghambatan mikro RNA miR-29b (Cao *et al.*, 2018). miR-30a, miR 125b dan miR 155 dapat menghambat jalur apoptosis mitokondrial sehingga aktivitas p53 menurun (Khoshnam *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2015).

### Kesimpulan

Kesimpulan penelitian ini adalah durasi iskemia TBCCAO mempengaruhi ekspresi protein p53 otak tikus.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Unit Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (UPPM) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

### Daftar Pustaka

- Cao, L., Zhang, Y., Zhang, S., Jiang, T. P., Chen, L., Liu, J., & Zhou, S. (2018). MicroRNA-29b alleviates oxygen and glucose deprivation/reperfusion-induced injury via inhibition of the p53-dependent apoptosis pathway in N2a neuroblastoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(1), 67–74. <http://doi.org/10.3892/etm.2017.5410>
- Chung, Y. H., Shin, C. M., Kim, M. J., Lee, B. K., Park, K. H., & Cha, C. I. (2000). Immunocytochemical study on the distribution of p53 in the hippocampus and cerebellum of the aged rat. *Brain Research*, 885(1), 137–141. [http://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02979-6](http://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02979-6)
- Endo, H., Kamada, H., Nito, C., Nishi, T., & Chan, P. H. (2006). Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *The Journal of Neuroscience*, 26(30), 7974–7983. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0897-06.2006>
- Endo, H., Nito, C., Kamada, H., Nishi, T., & Chan, P. H. (2006). Activation of the Akt / GSK3 b signaling pathway mediates survival of vulnerable hippocampal neurons after transient global cerebral ischemia in rats. *294002*, 1479–1489. <http://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600303>
- Filichia, E., Shen, H., Zhou, X., Qi, X., Jin, K., Hoffer, B., & Luo, Y. (2016). Forebrain neuronal specific ablation of p53 gene provide protection in a cortical ischemic stroke model. *Neuroscience*, 295, 1–

10.  
<http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.018>.Forebrain
- Handayani, E. S., Nugraha, Z. S., Nurmasitoh, T., Ahsani, D. N., & Nanda, A. G. (2016). Black sugarcane decoction reduces rat brain ischemia. *Universa Medicina*, 35(1), 40–45.
- Handayani, E. S., Nurmasitoh, T., Akhmad, A. S., Fauziah, A. N., Rizani, R., Rahmawaty, Y. R., & Afriandi, A. (2018). Effect of BCCAO Duration and Animal Models Sex on Brain Ischemic Volume After 24 Hours Reperfusion. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 17(01), 129–137.
- Handayani, E. S., Susilowati, R., Setyopranoto, I., & Partadiredja, G. (2019). Transient Bilateral Common Carotid Artery Occlusion (tBCCAO) of Rats as a Model of Global Cerebral Ischemia. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 18(03), 491–500.
- Hu, Y., Deng, H., Xu, S., & Zhang, J. (2015). MicroRNAs Regulate Mitochondrial Function in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury, 24895–24917. <http://doi.org/10.3390/ijms161024895>
- Jordán, J., Galindo, M. F., Prehn, J. H., Weichselbaum, R. R., Beckett, M., Ghadge, G. D., Miller, R. J. (1997). P53 Expression Induces Apoptosis in Hippocampal Pyramidal Neuron Cultures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(4), 1397–405. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9006981>
- Kalogeris, T., Bao, Y., & Korthuis, R. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia / reperfusion vs preconditioning. *Redox Biology*, 2, 702–714.<http://doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.006>
- Khoshnam, S. E., Winlow, W., Farbood, Y., Moghaddam, H. F., & Farzaneh, M. (2017). Emerging Roles of microRNAs in Ischemic Stroke: As Possible Therapeutic Agents. *Journal of Stroke*, 19(2), 166–187. <http://doi.org/10.5853/jos.2016.01368>
- Kizmazoglu, C., Aydin, H. E., Ph, D., Sevin, I. E., & Kalemci, O. (2015). Neuroprotective Effect of Resveratrol on Acute Brain Ischemia Reperfusion Injury by Measuring Annexin V , p53 , Bcl-2 Levels in Rats, 58(6), 508–512.
- Lehotský, J., Račay, P., Pavlíková, M., Tatarková, Z., Urban, P., Chomová, M., ... Kaplán, P. (2009). Cross-talk of intracellular calcium stores in the response to neuronal ischemia and ischemic tolerance. *General Physiology and Biophysics*, 28, 104–114.
- Lin, C., Wang, C., Hsu, S., Liao, L., & Lin, T. (2016). Molecular Mechanisms Responsible for Neuron-Derived Conditioned Medium ( NCM ) - Mediated Protection of Ischemic Brain. *PLoS One*, 11(1), 1–26. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0146692>
- Nandagopal, M., Muralidharan, P., Thirumurugan, G., & Nagar, C. (2010). Behavioral assessment studies in Cerebral ischemia induced by Bilateral carotid artery occlusion in Rats. *Annals of Biological*

*Research*, 1(1), 208–223.

Niizuma, K., Endo, H., Nito, C., Myer, D. J., Kim, G. S., & Chan, P. H. (2008). The PIDDosome mediates delayed death of hippocampal CA1 neurons after transient global cerebral ischemia in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(42), 16368–73. <http://doi.org/10.1073/pnas.0806222105>

Pei, L., Shang, Y., Jin, H., Wang, S., Wei, N., Yan, H., Lu, Y. (2014). DAPK1-p53 Interaction Converges Necrotic and Apoptotic Pathways of Ischemic Neuronal Death. *Journal of Neuroscience*, 34(19), 6546–6556. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5119-13.2014>

Raz, L., Zhang, Q. G., Han, D., Dong, Y., de Sevilla, L., & Brann, D. W. (2011). Acetylation of the proapoptotic factor, p53 in the hippocampus following cerebral ischemia and modulation by estrogen. *PLoS ONE*, 6(10). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0027039>

Singh, R. K., Mitra, S., Goel, R. K., & Acharya, S. B. (2007). Effect of ethanolic extract of root of *Pongamia pinnata* ( L ) pierre on oxidative stress , behavioral and histopathological alterations induced by cerebral ischemia – reperfusion and long-term hypoperfusion in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(October), 868–876.

Vaseva, A. V., & Moll, U. M. (2009). The mitochondrial p53 pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1787(5), 414–420. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.10.005>

Zhai, D., Chin, K., Wang, M., & Liu, F. (2014). Disruption of the nuclear p53-GAPDH complex protects against ischemia-induced neuronal damage. *Molecular Brain*, 7(20), 1–12.