

Artikel Penelitian

Kadar Neuroglobin dan Sitogloblin dalam Plasma, Cairan Serebro Spinalis, dan Jaringan Otak Pasien Strok Hemoragik

Ninik Mudjihartini^{1*}, Mohamad Saekhu², Sri Widia A. Jusman¹, Mohamad Sadikin¹

¹Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Indonesia

²Departemen Bedah Syaraf FKUI/RSCM, Indonesia

*Corresponding author: ninikbiokim@gmail.com

ABSTRACT

Background: The weight of the brain that does not reach 2% of the total body weight, uses 20% of the total energy produced by the body. Such a large amount of energy can only be met through aerobic oxidation. This means, the brain requires a lot of oxygen in addition to glucose as well. Ischemic hypoxia due to Spontaneous intracerebral hemorrhage (sICH) hemorrhagic stroke can disrupt the supply of oxygen and nutrients to the brain resulting in decreased energy production in the brain. This energy depletion causes brain cell damage and death to occur more rapidly. Neuroglobin (Ngb) and cytoglobin (Cygb) are globin group proteins found in the brain and act as oxygen-binding proteins in mitochondria. **Purposes:** This study aims to obtain an overview/profile of Ngb and Cygb levels, in plasma, cerebrospinal fluid (CSS), and brain tissue of hemorrhagic stroke patients. **Methods:** Current study is a part of a previous study using plasma, CSF, and brain tissue obtained during craniotomy to evacuate hematomas of patients with sICH hemorrhagic stroke at Cipto Mangunkusumo Hospital and other hospitals in Jakarta. Ngb and Cygb protein levels from plasma, CSF, and brain tissue were measured by ELISA method. **Results:** The mean level of brain Ngb is 0.058 ng/mg brain protein, while in plasma and CSS are 0.017 ng/mg brain protein and 0.013 ng/mg brain protein, or 29.31% and 22.41% of average Ngb brain level respectively. The mean brain Cygb level is 4.943 ng/mg brain protein, in CSS it was 1.685 ng/mg brain protein, or 25.26% of average Cygb brain level, whereas in plasma it was barely detectable. **Conclusion:** In hypoxic conditions due to sICH hemorrhagic stroke, Ngb and Cygb proteins can be measured in plasma, CSF, and brain tissue.

Keywords: neuroglobin, cytoglobin, hemorrhagic stroke

ABSTRAK

Latar belakang: Otak memerlukan oksigen yang banyak selain glukosa. Hipoksia iskemik karena strok hemoragik atau *Spontaneous intracerebral hemorrhage* (sICH) dapat mengganggu suplai oksigen dan nutrisi ke otak berakibat produksi energi di otak akan menurun. Deplesi energi ini menyebabkan kerusakan dan kematian sel otak terjadi lebih cepat. Neuroglobin (Ngb) dan sitogloblin (Cygb) merupakan protein golongan globin yang terdapat di otak dan berperan sebagai protein pengikat oksigen di mitokondria. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan mendapatkan gambaran/profil kadar Ngb dan Cygb, di plasma, cairan serebro spinal (CSS), dan jaringan otak pasien strok hemoragik. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan menggunakan sampel plasma, CSS, dan jaringan otak yang diperoleh saat kraniotomi evakuasi hematoma pasien strok hemoragik sICH di rumah sakit Cipto Mangunkusumo dan rumah sakit lainnya di Jakarta. Kadar protein Ngb dan Cygb dari plasma, CSS, dan jaringan

otak diukur dengan metode ELISA. **Hasil:** Rerata kadar Ngb otak adalah 0,058 ng/mg protein otak, sedangkan di plasma dan CSS masing-masing adalah 0,017 ng/mg protein otak dan 0,013 ng/mg protein otak atau 29,31% dan 22,41% dari rerata kadar Ngb otak. Rerata kadar Cygb otak adalah 4,943 ng/mg protein otak, di CSS adalah 1,685 ng/mg protein otak, atau 25,26% dari rerata Cygb otak, sedangkan di dalam plasma hampir tidak terdeteksi. **Simpulan:** Pada keadaan hipoksia oleh karena stroke hemoragik sICH, protein Ngb dan Cygb dapat diukur di plasma, CSS, dan jaringan otaknya.

Kata kunci: neuroglobin, sitogloblin, stroke hemoragik

PENDAHULUAN

Stroke adalah suatu keadaan darurat medis yang dapat mengakibatkan cacat tubuh dan keadaan fatal (1). Ada dua jenis stroke, yaitu iskemik dan hemoragik. Stroke hemoragik adalah jenis stroke yang terutama disebabkan oleh hipertensi kronis atau *amyloid angiopathy cerebral*, sedangkan penyebab sekunder antara lain malformasi arteriovenosa (AVM), aneurisma intrakranial, *angioma cavernosa*, *angioma venosa*, trombosis vena, neoplasma intrakranial, koagulopati, vaskulitis, dan penyalahgunaan obat (2).

Perdarahan intraserebral spontan non traumatik (*supratentorial Intracerebral Hemorrhage/sICH*) adalah salah satu penyebab stroke hemoragik penyebab morbiditas dan mortalitas yang bermakna di seluruh dunia. Perdarahan sICH menyumbang 15 hingga 20% dari semua stroke di populasi Negara Barat dan 20 sampai 50% di negara berkembang (3-5). Perdarahan sICH adalah stroke hemoragik yang paling mematikan, dengan angka kematian mencapai 40% di antara semua stroke (6). Angka kejadian ICH sekitar 2 juta setiap tahun di seluruh dunia, namun pengobatan yang efektif masih kurang. Pada kasus sICH dengan volume <math><30\text{ cm}^3</math> dalam waktu 30 hari kemungkinan untuk terjadi kematian sebesar 19 % (7).

Tindakan operasi kraniotomi untuk evakuasi bekuan darah yang pecah

meskipun masih menjadi perdebatan, namun masih tetap dilakukan untuk mencegah terjadinya komplikasi yang lebih buruk (8,9). Tindakan bedah pasien sICH dinyatakan masih bermanfaat, khususnya jika dilakukan dengan prosedur invasif yang minimal dan dilakukan segera setelah timbulnya gejala (10).

Penelitian terbaru telah mengungkapkan ekspresi protein globin selain haemoglobin (Hb) dalam eritrosit vertebrata, termasuk mioglobin (Mb), sitogloblin (CYGB), globin E (GbE), globin Y (GBY), dan Ngb (11). Neuroglobin adalah suatu protein golongan globin ke tiga, yang ditemukan oleh Burmester pada tahun 2000 (12). Struktur Ngb mirip dengan mioglobin, yaitu merupakan protein monomer yang terdiri dari 151 asam amino dan mempunyai berat molekul 17 kDa. Protein Ngb terutama diekspresikan dalam neuron sistem saraf pusat dan perifer, ekspresi Ngb dinyatakan tertinggi pada retina, namun ekspresi mRNA dan/atau protein Ngb juga ditemukan di dalam jaringan non-saraf (10). Beberapa peneliti menyatakan bahwa distribusi protein Ngb terutama di sitoplasma sel neuron (13). Hasil penelitian Mitz, dkk. menyatakan bahwa distribusi Ngb pada mamalia darat (tikus) terutama di sel neuron, sedangkan pada mamalia laut (anjing laut) di astrosit (14). Sitogloblin adalah golongan protein globin ke empat yang ditemukan oleh

Kawada pada tahun 2001 (15). Protein ini adalah suatu dimer hemoprotein dengan berat molekul 21 kDa dan tersusun dari 190 asam amino. Cygb diekspresikan pada fibroblast dan *fibroblast like cell* dalam berbagai organ seperti hati, jantung, usus, ginjal, paru-paru, dan pancreas (16). Cygb juga diekspresikan di jaringan otak (17).

Sel-sel otak sangat sensitif terhadap kekurangan oksigen dan dapat mulai terjadi kematian dalam waktu lima menit setelah suplai oksigen terputus (18). Pada kondisi hipoksia jaringan otak mengalami iskemik, yaitu di daerah pusat pendarahan dan dikelilingi oleh penumbra. Pada daerah iskemik ini terjadi kematian sel, sedangkan di dalam penumbra diekspresikan gen secara selektif, termasuk gen Ngb dalam upaya untuk meningkatkan suplai oksigen (19). Ngb dapat terdeteksi pada berbagai regio otak setelah infark serebral, dan ekspresinya secara signifikan meningkat di penumbra iskemik (20).

Kedua protein Ngb dan Cygb anggota famili globin ini dinyatakan terdapat pada sel-sel neuron dan berperan dalam mensuplai oksigen di mitokondria (21,22). Hasil penelitian sebelumnya ditemukan kadar protein Ngb dalam plasma pasien strok hemoragik sICH yang meningkat secara signifikan dibandingkan dengan subjek normal, namun tidak ada perbedaan yang signifikan antara Ngb di plasma dan jaringan otak pasien tersebut (23). Berangkat dari kenyataan ini dilakukan penelitian lanjutan, yaitu mendeteksi dan mengukur Ngb dan Cygb di CSS. Hasilnya diharapkan dapat melengkapi gambaran kadar protein Ngb dan Cygb di plasma, CSS, dan jaringan otak yang diperoleh saat kraniotomi pasien strok hemoragik sICH di R.S. Cipto Mangunkusumo dan rumah sakit lainnya di Jakarta.

METODE

Penelitian ini adalah penelitian analitik observasional menggunakan sampel yang didapatkan secara konsekutif. Subyek penelitian sebanyak 7 orang didapatkan dari R.S. Cipto Mangunkusumo dan rumah sakit lainnya di Jakarta. Penelitian dilakukan di Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

Sampel berupa plasma, CSS, dan jaringan otak yang didapatkan saat kraniotomi evakuasi hematoma dari 7 pasien stroke hemoragik sICH. Jaringan otak dibuat homogenat dengan cara melumatkan jaringan otak, kemudian menambahkan larutan bufer fosfat 0,1 M pH 7,4 dengan ratio pengenceran 1:10. Campuran disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 5000 g pada suhu 4°C, supernatan yang dihasilkan dipisahkan dan ditampung.

Darah EDTA dari vena kubiti disentrifugasi dengan kecepatan 5000 g pada suhu 4°C, plasma yang dihasilkan dipisahkan dari endapannya dan ditampung. Homogenat jaringan otak, CSS, dan plasma disimpan pada suhu -80°C sampai saatnya dilakukan pengukuran biomarker, yaitu: kadar protein Ngb, Cygb, dan kadar protein total dari plasma, CSS, dan jaringan otak.

Konsentrasi protein total plasma, CSS, dan jaringan otak diukur dengan metode Christian Warburg menggunakan teknik spektrofotometri pada panjang gelombang 280 nm. Kurva standar protein dibuat dengan menggunakan albumin serum sapi (24).

Kadar protein Ngb dan Cygb dari plasma, CSS, dan jaringan otak diukur dengan metode ELISA menggunakan kit *human* Ngb dan Cygb (USCN®). Absorbansi hasil ELISA diukur menggunakan Varioscan.

Penelitian ini telah mendapatkan Surat Keterangan Lolos Kaji Etik dengan Nomor: 493/PT02/FK/ETIK/2012 dari komisi etik Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

HASIL

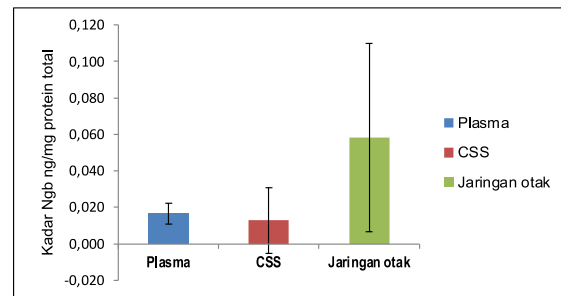
1. Kadar Ngb plasma, CSS, dan jaringan otak

Hasil pengukuran ELISA kadar Ngb plasma, CSS, dan jaringan otak dari tujuh sampel ditampilkan pada Tabel 1, sedangkan perbandingan kadar Ngb dan Cygb antara plasma, CSS, dan jaringan otak diperlihatkan pada Gambar 1. Penelitian ini mendapatkan rerata kadar Ngb otak adalah 0,058 ng/mg protein otak, sedangkan kadar Ngb plasma dan CSS masing-masing adalah 0,017 ng/mg protein otak dan 0,013 ng/mg protein otak (Tabel 1.). Jika dibandingkan dengan rerata kadar Ngb di otak, didapatkan rerata kadar Ngb di plasma dan CSS masing-masing adalah 29,31% dan 22,41%.

Tabel 1. Kadar Ngb di plasma, CSS, dan jaringan otak

No.	Ngb ng/mg protein		
	Plasma	CSS	Jaringan otak
1	0.018	-	0.005
2	0.016	0.039	0.121
3	0.016	-	0.078
4	0.005	0.009	-
5	0.023	-	0.029
6	0.020	0.002	-
7	0.019	0.001	-
Rerata	0,017	0,013	0,058

Catatan: (-) sampel tidak ada



Gambar 1. Gambaran rerata kadar Ngb antara plasma CSS, dan jaringan otak. Kadar Ngb jaringan otak 0,058 ng/mg protein otak, Ngb plasma dan CSS masing-masing adalah 29,31% dan 22,41% dari kadar rerata Ngb otak

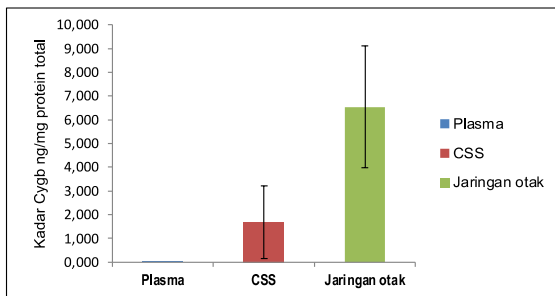
2. Kadar Cygb plasma, CSS, dan jaringan otak

Hasil pengukuran ELISA kadar Cygb plasma, CSS, dan jaringan otak dari tujuh sampel ditampilkan pada Tabel 2, sedangkan perbandingan kadar Ngb dan Cygb antara plasma, CSS, dan jaringan otak diperlihatkan pada Gambar 2. Rerata kadar Cygb otak adalah 4,943 ng/mg protein otak, dan kadar Cygb CSS adalah 1,685 ng/mg protein otak, sedangkan rerata kadar Cygb di dalam plasma mendapatkan hasil yang sangat rendah hampir tidak terdeteksi. Jika dibandingkan dengan rerata kadar Cygb di dalam otak, rerata kadar Cygb di CSS adalah 25,26%.

Tabel 2. Kadar Cygb di plasma, CSS, dan jaringan otak

No.	Cygb ng/mg protein		
	Plasma	CSS	Jaringan otak
1	0.003	-	9.557
2	0.003	2.262	0.599
3	0.014	-	5.940
4	0.003	3.618	-
5	0.002	2.320	3.111
6	0.003	0.170	5.509
7	0.005	0.056	-
Rerata	0,005	1,685	4,943

Catatan: (-) sampel tidak ada



Gambar 2. Gambaran rerata kadar Cygb antara plasma CSS, dan jaringan otak. Rerata kadar Cygb otak adalah 4,943 ng/mg protein otak, dan kadar Cygb CSS adalah 25,26% dari rerata Cygb otak, sedangkan Cygb di dalam plasma tidak terdeteksi.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pada pasien stroke hemoragik sICH, protein Ngb terdeteksi dan terukur baik di dalam plasma, CSS dan jaringan otaknya. Gambaran rerata kadar Ngb tertinggi didapatkan pada jaringan otak, kemudian di CSS dan terendah di plasma. Ekspresi Ngb meskipun di plasma terendah, namun relatif konsisten jika dibandingkan dengan kadar di CSS dan jaringan otak (Tabel 1). Kraniotomi untuk mengevakuasi hematoma pada pasien stroke hemoragik pada penelitian ini dilakukan dalam waktu yang bervariasi namun tidak lebih dari 72 jam. Hasil pengukuran kadar Ngb jaringan otak yang bervariasi dari kadar yang terendah dan tertinggi pada penelitian ini dimungkinkan berkaitan dengan waktu kapan dilakukannya kraniotomi. Pecahnya pembuluh darah pada stroke hemoragik sICH menyebabkan terbentuknya hematoma, sehingga terjadi hipoksia pada lokasi hematoma dan sel otak sekitarnya yang mengalami desakan. Ekspresi Ngb di penumbra, diinduksi oleh hipoksia yang terjadi pada daerah iskemik (20). Peningkatan ekspresi Ngb baik di tingkat mRNA maupun proteinnya sudah dibuktikan pada penelitian sebelumnya (23). Hipoksia menginduksi ekspresi Ngb

dapat dijelaskan oleh karena Ngb sebagai anggota protein globin mempunyai beberapa fungsi, yaitu detoksifikasi oksigen reaktif (ROS) dan spesies nitrogen (RNS); deoksigenasi nitrogen monoksida (NO) menjadi nitrat (NO₃), dan memasok oksigen ke neuron serta melindungi neuron dari kerusakan melalui beberapa jalur persinyalan (21,22). Pada hipoksia sistemik oleh karena sICH ini tidak hanya menginduksi ekspresi Ngb di jaringan otak saja, namun juga di plasma dan di CSS. Hal ini mungkin merupakan suatu mekanisme untuk memenuhi kebutuhan oksigen di plasma dan CSS (25).

Ngb terdeteksi pada plasma pada penelitian ini sejalan dengan penelitian lain oleh Cai dkk yang dapat mengukur kadar Ngb serum pada hari kedua setelah perdarahan subarachnoid dan terkait erat dengan prognosis yang buruk. Berdasarkan temuan tersebut dinyatakan bahwa Ngb mungkin menjadi target biologis yang potensial untuk memprediksi prognosis perdarahan subarachnoid (26). Penelitian lain oleh Gao Y, yang melakukan pengukuran Ngb pada serum pasien *post stroke*. Hasil penelitiannya menyimpulkan bahwa Ngb serum dapat berfungsi sebagai biomarker yang potensial untuk memprediksi penurunan kognitif setelah ICH (27). Penelitian ini juga dapat mendeteksi dan mengukur Ngb di CSS, studi lain yang juga telah mendeteksi dan mengukur protein Ngb di dalam CSS adalah penelitian Casado B dkk., namun bukan pada pasien stroke hemoragik melainkan pada subyek yang mengalami nyeri (28).

Selain Ngb penelitian ini juga dapat mendeteksi dan mengukur kadar Cygb di jaringan otak dan CSS, namun di plasma kadarnya sangat rendah jika dibandingkan dengan kadar Cygb di jaringan otak.

Hipoksia pada strok hemoragik sICH ini menginduksi ekspresi Cygb pada CSS dan jaringan otak. Hasil ini sejalan dengan penelitian terdahulu oleh Fordel dkk. yang menyatakan terjadi peningkatan protein Cygb yang berbeda pada berbagai organ, yaitu otak, otot, hati, dan jantung tikus yang mengalami hipoksia (29). Demikian juga hasil penelitian Lie dkk. terjadi peningkatan ekspresi protein Cygb baik pada hipoksia intermiten maupun hipoksia berkelanjutan 1, 3, 7, dan 14 hari, meskipun secara statistik tidak signifikan (30). Ekspresi protein Cygb di plasma yang kadarnya sangat rendah dibanding dengan kadar di jaringan otak pada pasien ini belum dapat dijelaskan.

Keterbatasan pada penelitian ini adalah tidak didapatkan sampel yang lengkap pada ketujuh subjek, sehingga tidak dapat diperbandingkan kadar protein Ngb dan Cygb di plasma, CSS, dan jaringan otak per subjek. Selain itu pada penelitian ini tidak diukur mRNA Ngb dan Cygb pada plasma, CSS, maupun di jaringan otak sehingga tidak dapat membandingkan ekspresi di tingkat mRNA dengan proteinnya. Namun meskipun demikian hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada keadaan hipoksia oleh karena strok hemoragik sICH ini protein Ngb dan Cygb dapat diukur di plasma, CSS, dan jaringan otaknya.

SIMPULAN

Pada keadaan hipoksia oleh karena strok hemoragik sICH ini protein Ngb dan Cygb dapat diukur di plasma, CSS, dan jaringan otaknya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kepada Departemen Bedah Syaraf FKUI RSCM yang telah

membantu mendapatkan sampel dari subjek penelitian.

KONFLIK KEPENTINGAN

Saya menyatakan tidak memiliki konflik kepentingan, dan tidak ada afiliasi atau koneksi atau entitas dengan organisasi apa pun, yang dapat menimbulkan pertanyaan bias dalam diskusi dan kesimpulan naskah.

REFERENSI

1. Patil M, Patel S. Pharmacogenomic analysis of single-nucleotide polymorphisms of angiotensin-I converting enzyme gene in stroke. *Asian J Pharm Res.* 2015 Jan 1;8:308–10.
2. Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med.* 2001 May;344(19):1450–60.
3. Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol.* 2009 Apr;8(4):355–69.
4. Feigin VL, Krishnamurthi R V., Parmar P, Norrving B, Mensah GA, Bennett DA, et al. Update on the global burden of ischemic and hemorrhagic stroke in 1990-2013: The GBD 2013 study. *Neuroepidemiology.* 2015;45(3):161–76.
5. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet (London, England)* [Internet]. 2014 Jan 18;383(9913):245–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24449944>
6. van Asch CJ, Luitse MJ, Rinkel GJ,

- van der Tweel I, Algra A, Klijn CJ. Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2010 Feb;9(2):167–76.
7. Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Huster G. Volume of intracerebral hemorrhage. A powerful and easy-to-use predictor of 30-day mortality. *Stroke*. 1993 Jul;24(7):987–93.
 8. Hemphill JC, Greenberg SM, Anderson CS, Becker K, Bendok BR, Cushman M, et al. Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage: A Guideline for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2015;46(7):2032–60.
 9. Steiner T, Al-Shahi Salman R, Beer R, Christensen H, Cordonnier C, Csiba L, et al. European Stroke Organisation (ESO) guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage. *Int J stroke Off J Int Stroke Soc*. 2014 Oct;9(7):840–55.
 10. De Marinis E, Fiocchetti M, Acconcia F, Ascenzi P, Marino M. Neuroglobin upregulation induced by 17 β -estradiol sequesters cytochrome c in the mitochondria preventing H₂O₂-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Cell Death Dis*. 2013 Feb;4(2):e508.
 11. Götting M, Nikinmaa M. More than hemoglobin - the unexpected diversity of globins in vertebrate red blood cells. *Physiol Rep* [Internet]. 2015 Feb 3;3(2):e12284. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25649247>
 12. Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* [Internet]. 2000;407(6803):520–3. Available from: <https://doi.org/10.1038/35035093>
 13. Ascenzi P, Bocedi A, de Sanctis D, Pesce A, Bolognesi M, Marden MC, et al. Neuroglobin and cytoglobin: Two new entries in the hemoglobin superfamily*. *Biochem Mol Biol Educ a Bimon Publ Int Union Biochem Mol Biol*. 2004 Sep;32(5):305–13.
 14. Mitz SA, Reuss S, Folkow LP, Blix AS, Ramirez J-M, Hankeln T, et al. When the brain goes diving: glial oxidative metabolism may confer hypoxia tolerance to the seal brain. *Neuroscience*. 2009 Oct;163(2):552–60.
 15. Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, et al. Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem*. 2001 Jul;276(27):25318–23.
 16. Kawada N. Cytoglobin as a Marker of Hepatic Stellate Cell-derived Myofibroblasts. *Front Physiol*. 2015;6:329.
 17. Hundahl CA, Allen GC, Hannibal J, Kjaer K, Rehfeld JF, Dewilde S, et al. Anatomical characterization of cytoglobin and neuroglobin mRNA and protein expression in the mouse brain. *Brain Res*. 2010 May;1331:58–73.
 18. Paulbabu K, Deepak Singh K, Prashanti P, Padmaja M. Neuroprotective potential and efficacy of neurodegenerative disorders of fruit extract of *Aegle marmelos*. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2015;7(1):155–9.
 19. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999 Sep;22(9):391–7.
 20. Yu Z, Liu N, Liu J, Yang K, Wang

- X. Neuroglobin, a novel target for endogenous neuroprotection against stroke and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012/06/07. 2012;13(6):6995–7014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22837676>
21. Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs TL, et al. Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J Inorg Biochem*. 2005 Jan;99(1):110–9.
 22. Xie LK, Yang SH. Brain globins in physiology and pathology. *Med Gas Res*. 2016;6(3):154–63.
 23. Mudjihartini N, Lasma Nurhayati, Saekhu M, Sri Widia A Jusman, Jan Purba, Mohamad Sadikin. Responses of brain tissues against hypoxic condition in hemorrhagic stroke patients: Neuroglobin expression in brain tissue and plasma. *Asian J Pharm Clin Res* [Internet]. 2017 Feb 1;10(2 SE-Original Article(s)):407–9. Available from: <https://www.innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/15971>
 24. Warburg O, Christian W. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Naturwissenschaften* [Internet]. 1941;29(39):589–90. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF01482279>
 25. Baez E, Echeverria V, Cabezas R, Ávila-Rodríguez M, Garcia-Segura LM, Barreto GE. Protection by Neuroglobin Expression in Brain Pathologies [Internet]. Vol. 7, *Frontiers in Neurology*. 2016. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2016.00146>
 26. Cai H, Zheng S, Cai B, Yao P, Ding C, Chen F, et al. Neuroglobin as a Novel Biomarker for Predicting Poor Outcomes in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg*. 2018 Aug;116:e258–65.
 27. Gao Y, Wang B, Miao Y, Han Y. Serum Neuroglobin as a Potential Prognostic Biomarker for Cognitive Impairment After Intracerebral Hemorrhage [Internet]. Vol. 13, *Frontiers in Neurology*. 2022. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2022.885323>
 28. Casado B, Pannell LK, Whalen G, Clauw DJ, Baraniuk JN. Human neuroglobin protein in cerebrospinal fluid. *Proteome Sci* [Internet]. 2005;3(1):2. Available from: <https://doi.org/10.1186/1477-5956-3-2>
 29. Fordel E, Geuens E, Dewilde S, Rottiers P, Carmeliet P, Grooten J, et al. Cytoglobin expression is upregulated in all tissues upon hypoxia: an in vitro and in vivo study by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jun;319(2):342–8.
 30. Li RC, Lee SK, Pouranfar F, Brittan KR, Clair HB, Row BW, et al. Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain. *Brain Res*. 2006 Jun;1096(1):173–9.