

Gambaran Histopatologi Aorta Tikus Putih yang Mengalami Sirosis setelah Perlakuan Endotoksin *Escherichia coli* O₅₅ : B₅

(HISTOPATHOLOGICAL CHANGES OF AORTA IN CIRRHOSIS RAT
FOLLOWING INDUCTION WITH THE ENDOTOXIN OF
ESCHERICHIA COLI O₅₅ : B₅)

Tony Hartono¹, Wiwik Misaco Yuniarti², Bambang Sektiari Lukiswanto³

¹Balai Besar Karantina Hewan, Jl. Kalimas Baru 88D, Tanjung Perak, Surabaya
Telepon: (031) 329536

²Rumah Sakit Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

³Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Unair, Kampus C Unair
Jl. Mulyorejo, Surabaya, 60115
Telepon: (031) 5995246; E-mail: bamsekti@yahoo.com

ABSTRACT

An experimental study to determine histopathological changes of aorta in cirrhosis rats following treatment with the endotoxin of *Escherichia coli* (*E. coli*) O₅₅:B₅ was carried out. A completely randomized design with 5 treatments (each of which replicated 5 times) was used in this study. In control treatment (P0), cirrhosis rats were treated only with 0.9% NaCl solution and the histopathological changes of aorta were observed 6 hours following treatment. In endotoxin treated groups, cirrhosis rats were injected with the endotoxin at the doses of 3 mg/kg body weight and the histological changes of aorta were respectively observed at 6 (P1), 12 (P2), 18 (P3), and 24 (P4) post injection. The parameters observed were the number of endothelial cells per cm aorta, the rate of discontinuity in the internal elastic lamina, and the thickness of the internal elastic lamina. The result showed that the number of endothelial cells were significantly ($P < 0.05$) lower in endotoxin treated rats than in the controls, i.e. P0 (6.6920±0.1205 cells/cm), P1 (6.2640±0.2281 cells/cm), P2 (6.2900±0.4600 cells/cm), P3 (2.980±1.4777 cells/cm), and P4 (1.0020±0.3932 cells/cm). The discontinuity of internal elastic lamina was significantly ($P < 0.05$) higher in endotoxin treated rats than in control groups, i.e. 0,00 in P0, P1, and P2, 0.667±0.147 μ m in P3 and 2.312 ±0.892 μ m in P4. A significant reduction in the thickness of internal elastic lamina was also observed in rats treated with the endotoxin, i.e. P0 (0.381±0.047 μ m), P1 (0.397±0.062 μ m), P2 (0.365±0.048 μ m), P3 (0.174±0.063 μ m), and P4 (0.122±0.029 μ m). It is evident that the endotoxin of *E. coli* O₅₅ : B₅ can cause a significant damage to the aorta of cirrhosis, especially in prolonged exposure of the endotoxin.

Key word: cirrhosis, endotoxin, endothelial cell, discontinuity, thickness, internal elastic lamina.

PENDAHULUAN

Sirosis hati dapat diakibatkan oleh berbagai sebab seperti kebiasaan mengkonsumsi alkohol yang berlebihan, infeksi virus hepatitis, masuknya bahan beracun seperti *carbon tetrachloride* dan infeksi serta obstruksi pada saluran empedu (kolestasis) yang bersifat kronis (Guyton dan Hall, 2000). Endotoksemia merupakan salah satu komplikasi yang sering dialami oleh penderita sirosis hati karena penurunan fungsi *clearance* hati. Beberapa bakteri Gram negatif penyebab endotoksemia yang sering dijumpai pada penderita sirosis hati

adalah *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Proteus spp.* (Taylor *et al.*, 1997).

Endotoksemia yang biasanya bersamaan dengan infeksi bakteri Gram negatif dan bakteriemia pada satu individu dapat menimbulkan efek patologi. Respons individu terhadap aktivitas endotoksin sangat bervariasi tergantung pada spesies, dosis, bagian tubuh yang terpapar, rute, dan kecepatan pelepasan endotoksin ke dalam sistem sirkulasi. Endotoksin yang berada dalam sistem sirkulasi beberapa jenis hewan coba dapat menyebabkan jejas pada endotel. Jejas yang terjadi sangat

bervariasi tergantung pada jenis, dosis, dan cara pemberian endotoksin serta waktu pengamatan (Reidy *et al.*, 1983; Barton *et al.*, 2000).

Pada individu yang tidak mengalami sirosis, endotoksin dapat menyebabkan inflamasi vaskuler. Perubahan histopatologi pada sel endotel yang mengalami inflamasi adalah adanya infiltrasi sel-sel radang dan pembentukan fibrinogen oleh sel-sel endotel. Hal ini dapat menstimulasi sel miointima untuk membantu proses proliferasi matriks sehingga terjadi hiperplasia tunika intima. Matriks tersebut terdiri atas IL-1 α , platelet, dan makrofag, sehingga lumen pembuluh darah tampak lebih sempit dan seringkali disertai dengan denudasi endotel (Maria, 2003). Selama proses inflamasi, endotel pembuluh darah menjadi lebih permeabel tidak hanya terhadap protein plasma, tetapi juga terhadap molekul adhesi sebagai awal proses migrasi lokal leukosit. Infiltrasi leukosit dalam pembuluh darah membutuhkan interaksi antara leukosit, sel endotel, dan molekul adhesi. Pada keadaan normal, hanya sedikit leukosit yang melekat pada sel endotel. Selama proses inflamasi terjadi peningkatan derajat adhesi antara leukosit dan sel endotel yang prosesnya diatur oleh molekul adhesi dan reseptor-reseptornya, termasuk *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1). VCAM-1 adalah molekul adhesi yang berfungsi sebagai reseptor yang mendukung melekatnya leukosit pada endotel sebagai lapisan paling dalam dari tunika intima (Abbas *et al.*, 2000). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perubahan histopatologi yang terjadi pada aorta tikus putih jantan sirosis setelah diinduksi dengan endotoksin *E. coli* O₅₅ : B₅ pada tikus yang mengalami sirosis hati.

METODE PENELITIAN

Hewan Coba

Pada penelitian ini digunakan 25 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar umur 3 bulan dengan berat badan 250-350 g. Semua tikus putih disiapkan sebagai hewan model sirosis hati dengan teknik ligasi saluran empedu (*Bile Duct Ligation* = BDL) (Blann *et al.*, 1992). Hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yang terdiri atas satu kelompok kontrol dan empat kelompok perlakuan endotoksin. Setiap perlakuan terdiri atas lima ekor tikus. Semua tikus putih mendapatkan perlakuan berupa induksi endotoksin O₅₅ : B₅ secara intra vena sebanyak 3 mg/kg bb yang dilarutkan dengan 1 ml saline steril, kecuali lima ekor tikus putih yang menjadi kelompok

kontrol. Kelompok kontrol diinduksi saline steril secara intravena dengan volume yang sama sebagai kontrol negatif. Lima perlakuan tersebut adalah P0: BDL + saline dan aorta dieksisi 6 jam setelah induksi saline, P1: BDL + endotoksin dan aorta dieksisi 6 jam setelah perlakuan endotoksin, P2: BDL + endotoksin dan aorta dieksisi 12 jam setelah perlakuan endotoksin, P3: BDL + endotoksin dan aorta dieksisi 18 jam setelah perlakuan endotoksin, P4: BDL + endotoksin dan aorta dieksisi 24 jam setelah perlakuan endotoksin.

Penyiapan Tikus Sirosis

Tikus sirosis disiapkan dengan cara berikut. Pertama, tikus dianestesi dengan kombinasi ketamine HCl dan xylazine (100 mg : 50 mg), dengan dosis 0,6 ml/kg bb secara intramuskuler). Insisi dilakukan pada *midline* abdomen sepanjang kurang lebih setengah dari jarak antara bagian abdomen posterior dengan *cartilago xyphoideus*. Pada saluran empedu yang terletak 0,5-1 cm dari dinding duodenum, dibuat 2 ligasi dengan jarak kurang lebih 0,3 cm menggunakan *prolene 5/0*. Bagian yang terletak di antara dua ligasi dipotong untuk mendapatkan kondisi obstruksi total pada saluran empedu. Selanjutnya saluran empedu yang telah terikat dan terpotong dikembalikan ke dalam rongga abdomen. Muskulus dan kulit abdomen yang telah diinsisi ditutup kembali dengan jahitan terputus menggunakan *catgut 3/0* dan *silk 4/0* (Waynforth *et al.*, 1992).

Perlakuan Endotoksin

Induksi endotoksin diberikan satu kali pada minggu ketiga setelah pelaksanaan BDL dengan dosis 3 mg/kg bb dalam 1 ml saline steril secara intravena. Untuk menghindari perubahan tekanan darah selama perlakuan, pemberian saline steril maupun endotoksin dilakukan dalam waktu lima menit.

Pengambilan Sampel

Setelah perlakuan diberikan dan sesuai dengan waktu pengamatan, tikus putih dianestesi dengan cara memasukkannya ke dalam toples yang berisi kapas yang sebelumnya telah dibasahi dengan ether. Melalui *thoracotomy*, aorta hewan model sepanjang 1 cm dieksisi kurang lebih 0,5 cm dari kaudal *arcus aorticus*. Selanjutnya aorta diproses untuk pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan hematoxylin-eosin (HE) untuk mengamati perubahan histopatologi yang terjadi. Selain itu, juga dilakukan pembuatan preparat dengan metode imunohistokimia *indirect* menggunakan

antibodi primer anti VCAM-1, antibodi sekunder *goat anti-rat IgG-Biotin, streptavidin-horseradish peroxidase*, dan diaminobenzidine (DAB) untuk mengamati ekspresi VCAM-1 pada sel endotel aorta.

Pengamatan dan Analisis Data

Pengamatan preparat histologi untuk mengetahui perubahan histopatologi yang terjadi. Perubahan yang diamati meliputi jumlah sel endotel, diskontinuitas, dan tebal lamina elastika interna serta ekspresi VCAM-1 pada permukaan sel endotel pada setiap perlakuan. Penghitungan sel endotel dilakukan dengan cara mengamati preparat histopatologi dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x, kemudian dilakukan penghitungan sel endotel setiap 1 cm pada sepuluh lapangan pandang yang berbeda, kemudian hasil yang diperoleh dirata-rata. Pengukuran panjang diskontinuitas dan ketebalan lamina elastika interna dilakukan dengan menggunakan mikrometer retikularis dengan mengamati preparat histologi di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x. Ekspresi VCAM-1 diukur dengan memberikan skor berdasarkan intensitas warna yang tereksresi pada permukaan sel endotel. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan uji Kruskal-Wallis (Steel dan Torrie, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Model Tikus Sirosis

Berdasarkan penelitian pendahuluan yang dilakukan, hewan model sirosis dapat diperoleh 3 minggu setelah pelaksanaan BDL. Pengamatan pada preparat histologi hati menunjukkan adanya perubahan pada parenkim hati. Parenkim hati yang tersusun oleh hepatosit telah digantikan oleh jaringan fibrosis (Yuniarti, 2005).

Jumlah Sel Endotel

Jumlah sel endotel pada perlakuan P0, P1, dan P2 nyata ($P < 0,05$) lebih kecil daripada pada perlakuan P3 dan P4. Jumlah sel endotel tertinggi terlihat pada kelompok kontrol, yaitu $6,6920 \pm 0,1205/cm$ (Tabel 1; Gambar 1 dan 2). Hal ini disebabkan karena makin lama waktu paparan endotoksin pada sel endotel, makin parah kerusakan sel yang terjadi. Kerusakan sel ditandai dengan adanya perubahan morfofungsi sel endotel yang makin parah (Gambar 3 dan 4). Seiring dengan lamanya waktu paparan terhadap endotoksin, sel endotel mengalami kematian dan pada akhirnya akan terjadi denudasi (Simoncini, 2003).

Secara umum endotoksin dapat mempengaruhi struktur, metabolisme, dan fisiologi sel monolayer endotel. Perubahan-perubahan yang dapat diamati adalah peningkatan permeabilitas membran sel endotel, dilatasi lapisan intima pada *intracellular junctions*, piknotis inti sel, dan penonjolan sitoplasma. Sel endotel mulai mengalami kematian dua jam setelah terpapar endotoksin (Meyric, 1986).

Diskontinuitas dan Ketebalan Lamina Elastika Interna

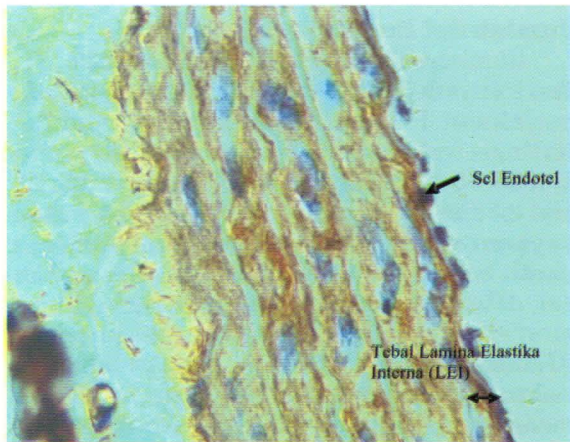
Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada perlakuan P3 dan P4 lebih banyak mengalami diskontinuitas lamina elastika interna jika dibandingkan pada perlakuan P0, P1, dan P2. Sementara itu, antara P0, P1, dan P2 tidak terdapat perbedaan yang nyata. Hasil pemeriksaan diskontinuitas lamina elastika interna pada masing-masing perlakuan terlihat pada Tabel 2 dan Gambar 6.

Pada perlakuan P3 dan P4 yang diamati pada 18 dan 24 jam setelah induksi endotoksin terjadi penipisan lamina elastika interna dan secara statistik berbeda nyata dengan P0, P1, dan P2 ($P < 0,05$). Hasil pemeriksaan ketebalan lamina

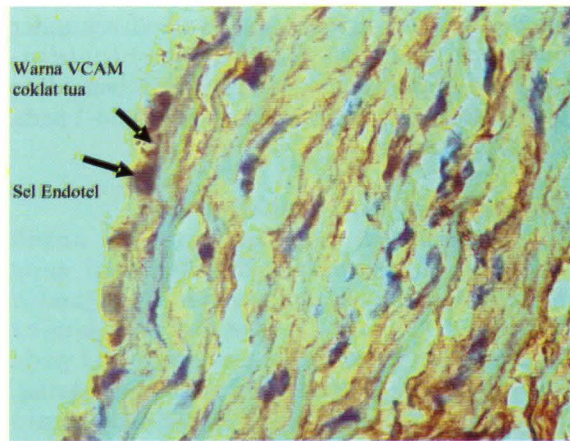
Tabel 1. Hasil rata-rata jumlah sel endotel pada aorta tikus putih jantan sirosis yang diinduksi dengan endotoksin *E. coli* O₅₅:B₅

Eksisi aorta pada jam ke (Perlakuan)	Jumlah sel endotel / cm \pm SD
6 (P0)	6,6920 ^a \pm 0,1205
6 (P1)	6,2640 ^a \pm 0,2281
12 (P2)	6,2900 ^a \pm 0,4600
18 (P3)	2,5980 ^b \pm 1,4777
24 (P4)	1,0020 ^c \pm 0,3932

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

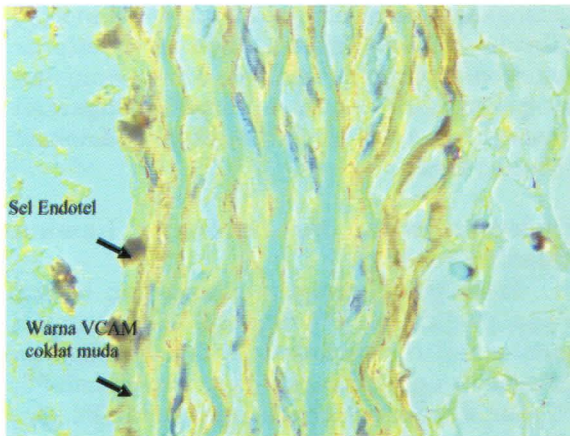


Gambar 1

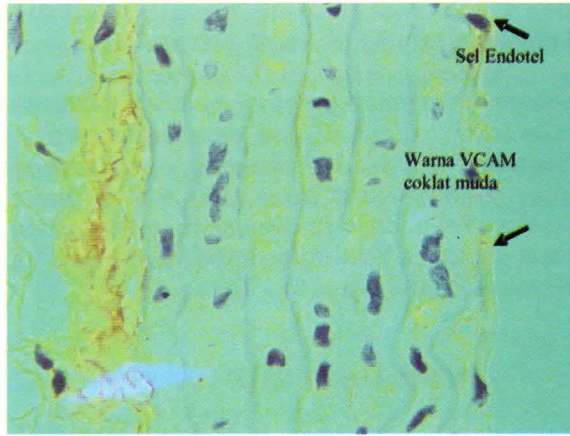


Gambar 2

Gambar 1 dan 2. Pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi anti VCAM menunjukkan bahwa sel endotel pada P0 dan P1 terlihat masih intak dan menunjukkan ekspresi VCAM yang masih kuat (1000 X)

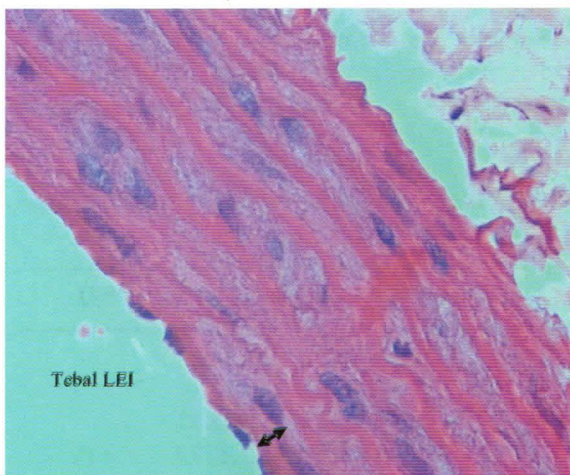


Gambar 3

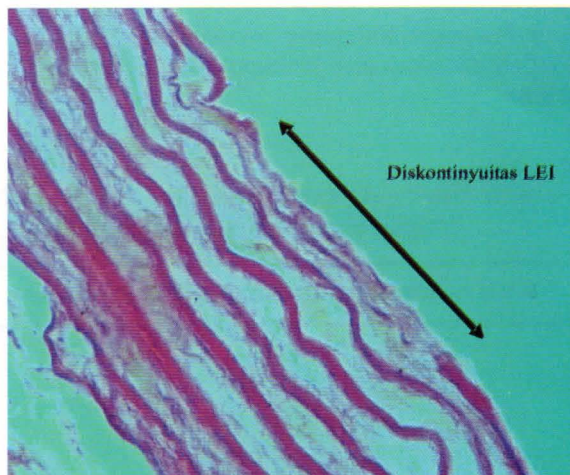


Gambar 4

Gambar 3 dan 4. Dengan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi anti VCAM, terlihat bahwa jumlah sel endotel pada kelompok perlakuan mengalami penurunan dan ekspresi VCAM tampak melemah (1000X).



Gambar 5. Pada P0 terlihat LEI yang relatif tebal dan terlihat kontinyu (HE, 1000X).



Gambar 6. Pada P4 tampak LEI yang menipis dan terlihat diskontinyu (HE, 1000X).

Tabel 2. Hasil rata-rata panjang diskontinuitas lamina elastika interna pada aorta tikus putih jantan sirosis yang diinduksi dengan endotoksin *E. coli* O₅₅ : B₅

Eksisi aorta pada jam ke- (Perlakuan)	Panjang diskontinuitas (mm) ± SD
6 (P0)	0,000 ^b ± 0,000
6 (P1)	0,000 ^b ± 0,000
12 (P2)	0,000 ^b ± 0,000
18 (P3)	0,667 ^b ± 0,147
24 (P4)	2,312 ^a ± 0,892

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Tabel 3. Hasil rata-rata ketebalan lamina elastika interna pada aorta tikus putih jantan sirosis yang diinduksi dengan endotoksin *E. coli* O₅₅ : B₅

Eksisi aorta pada jam ke- (Perlakuan)	Panjang diskontinuitas (mm) ± SD
6 (P0)	0,381 ^b ± 0,047
6 (P1)	0,397 ^b ± 0,062
12 (P2)	0,365 ^b ± 0,048
18 (P3)	0,174 ^a ± 0,063
24 (P4)	0,122 ^a ± 0,029

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

elastika interna pada masing-masing perlakuan terlihat pada Tabel 3, Gambar 1 dan 5.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa terjadi penipisan lamina elastika interna disertai dengan derajat diskontinuitas yang makin parah. Hal ini disebabkan karena makin lama waktu kontak antara sel endotel dengan endotoksin, makin berat derajat jejas yang terjadi pada sel endotel. Induksi endotoksin ke dalam pembuluh darah normal dalam waktu satu menit dapat menyebabkan pelebaran ruang subendotel dan meningkatkan derajat lekukan pada lamina elastika interna (Stefanec, 2000). Endotoksin menyebabkan terjadinya aktivasi sel endotel dalam meregulasi molekul adhesi dan meningkatkan pelepasan sitokin seperti *tumor necrosis factor-α* (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) dan interferon-α (IFN-α). Endotoksin secara langsung atau melalui perantara sitokin, mengaktifasi gen transkripsi proinflamasi seperti *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Aktivasi sel endotel setelah induksi endotoksin dapat terjadi karena pengaruh langsung endotoksin atau secara tidak langsung melalui proses yang diperantarai oleh aktivitas netrofil, sel mononuklear, atau oleh berbagai produk yang dihasilkan oleh sel-sel tersebut (Cines *et al.*, 1998).

Dalam konteks formasi neointima, lamina

elastika interna berperan sebagai *barrier* terhadap migrasi sel otot polos yang akan mengalami transformasi. Jejas atau tekanan yang berlangsung terus menerus terhadap dinding pembuluh darah akan menyebabkan fenestrasi pada lamina elastika interna dan pada akhirnya akan menyebabkan *severe occlusive morphological lesion* (Bauer, 2002).

Nitric oxide (NO) dihasilkan dalam sel endotel dari asam amino L-arginin oleh NOS. Produksi NO akan mengalami penurunan apabila sel endotel mengalami jejas dan mengalami gangguan morfofungsinya. Penurunan NO akan menyebabkan aktivasi faktor transkripsi seperti NF-κB, yang kemudian akan bergerak menuju nukleus untuk meningkatkan gen transkripsi yang menghasilkan sitokin dan molekul adhesi seluler. Molekul adhesi seluler tersebut adalah *selectin*, *intercellular adhesion molecule* (ICAM), dan *vascular cell adhesion molecule* (VCAM) yang akan terekspresikan pada permukaan luminal sel endotel (Kolodgie *et al.*, 2003).

Pada kondisi inflamasi sistemik seperti sepsis dan reaksi lokal yang disebabkan karena denudasi, endotel menghasilkan pelepasan sejumlah besar NO. Produksi NO yang berlebihan dalam darah dapat menyebabkan gangguan sirkulasi dan bersifat sitotoksik

terhadap jaringan sekitar endotel, termasuk lamina elastika interna (Stoclet *et al.*, 1997). Pada konsentrasi rendah, NO dapat merangsang proliferasi *vascular smooth muscle cells* (VSMCs). Sekresi NO yang berlebihan dapat menghambat pembentukan lapisan neointima karena pada konsentrasi tinggi efek antiproliferasi dari NO akan muncul, sehingga daerah subendotel yang terjejas lebih sulit untuk mengalami sikatrisasi (Kuang *et al.*, 1999).

SIMPULAN

Makin lama waktu paparan sel endotel dengan endotoksin membuat proses denudasi endotel makin parah, sehingga jumlah sel endotel pada permukaan aorta makin berkurang. Denudasi endotel yang terjadi juga ditandai dengan makin panjangnya bagian lamina elastika interna yang mengalami diskontinuitas yang disertai dengan penipisan pada lapisan tersebut. Selain itu juga ditandai dengan semakin rendahnya VCAM-1 yang terekspresi pada permukaan lapisan endotel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Dr. Eddy Bagus Wasito Sp.MK., dr., dan Bapak Heri atas saran dan bantuan teknis yang telah diberikan sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas PL, *et al.* 2000. *Cellular and molecular immunology*. 4th ed. California: WB Saunders Co.
- Bauer PR. 2002. Microvascular responses to sepsis: clinical significance. *Pathophysiology* 8: 141-148
- Barton CC, Hill DA, Yee SB. 2000. Bacterial lipopolysaccharide exposure augment aflatoxin B₁-induced liver injury. *Toxicol Sci* 55: 444-452
- Blann AD, Babbs C, Neuberger JM. 1992. Endothelial cell damage in primary biliary cirrhosis: influence of cholestasis and immunological mechanisms. *Clin Exp Immunol* 90: 88-92
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-3561
- Daniel W. 1989. *Statistik non parametrik terapan*. Terjemahan oleh Alex Tri Kantjono W. Jakarta: Penerbit PT Gramedia, Hal. 258-264; 272-276
- Guyton AC, Hall JE. 2000. *Textbook of Medical Physiology*. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. Pp 883-886
- Kuang YC, Paul D, Jenny Z. 1999. Decreased neointimal thickening after arterial wall injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Circ Research* 85: 1192
- Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP. 2003. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 349: 2316-25
- Maria A. 2003. Endothelial cell biology, perivascular inflammation and vasculitis. *Cleveland Clin J Med* 69
- Meyric D. 1986. Direct effect of E. coli endotoxin on structure and permeability of pulmonary endothelial monolayers and the endothelial layer of intimal explants. *American Clin J Pathol* 122: 140-151
- Reidy MA, Schwartz SM. 1983. Endothelial injury and regeneration. IV. Endotoxin: a non denuding injury to aortic endothelium. *Lab Invest* 48: 25-33
- Stefanec T. 2000. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease. *Chest* 117: 841-854
- Simoncini SK. 2003. Effect of sex steroid hormone on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene expression in activated endothelial cell. University of Pisa, Italy.
- Steel RGD, Torrie JH. 1995. Prinsip dan prosedur statistika: suatu pendekatan biometrik, Edisi kedua. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Stoclet JC, Muller B. 1997. Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessel. Laboratoire de pharmacologie et physiopathologie cellulaires, URA CNRS 600, Universite Louise Pasteur de Strasbourg 74, Route de Rhin BP 24, 67401 ILLKIRCH, France.
- Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. 1997. Inducible nitric oxide synthetase in the liver: Regulation and function. Departement of Surgery, University of Pittsburgh, USA
- Waynforth HB, Flecknell PA. 1992. *Experimental and surgical technique in the rat*. 2nd ed. London: Academic Press. Pp. 206-209