

## Induction of *Porphyromonas gingivalis* Increase proportion of Aortic's Endothelin-1 in Atherodiet Mice

### Induksi *Porphyromonas gingivalis* Meningkatkan Proporsi Endotelin-1 pada Aorta Mencit yang Diinduksi Diet Aterogenik

Helmin Elyani\*, Tinny Endang Hernowati\*\*, Sumarno\*\*\*

\*Program Pendidikan Dokter, Universitas Islam Malang

\*\*Laboratorium Patologi Klinik Fakultas, Kedokteran Universitas Brawijaya

\*\*\*Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

#### ABSTRACT

One of the risk factor of atherosclerosis is associated with activation of the inflammatory process in infection, as evidence by systemic elevations of molecules such as MCP-1, PAI-1 and ET-1. Recent evidence suggests that infectious agents, including those that cause periodontal disease, may also important role in atherosclerosis. The aim of this study was to determine if recurrent intravenous injections with *P. gingivalis* for 14 weeks promotes endothelial smooth muscle ET-1 proportion in aortic mice. Twenty four weeks old mice (n=6 per group for each time point) were divided in two groups, there were normal diet and atherogenic diet, each of them were inoculated intravenously with live *P. gingivalis* ( $10^7$  cell/50 $\mu$ l PBS) injections or vehicle (50  $\mu$ l PBS) once per week for 14 weeks. The Immunohistochemistry for aortic ET-1 proportion were performed. The result of RAK with 3 interaction and Tukey test using SPSS 14 for windows showed that at 14 weeks, the ET-1 proportion in aortic endothelial cell was higher than in aortic smooth muscle cell. Recurrent *P. gingivalis* bacteremia in normodiet and atherodiet was proportion of ET-1 in aortic endothelial cell was higher than in aortic smooth muscle cell. In can be concluded that induction of *P. gingivalis* increase proportion of aortic's ET-1 in atherodiet mice.

**Key words:** *P. gingivalis*, ET-1, Atherogenic diet

#### PENDAHULUAN

Salah satu faktor resiko aterosklerosis adalah peradangan oleh karena infeksi (1). Beberapa mikroorganisme yang sering disebut-sebut mempunyai hubungan dengan aterosklerosis diantaranya *Cytomegalovirus*, *Streptococcus mutans*, *Helicobacter pylori*, *Actinomyces actinomycetemcomittans* dan *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) (2). *P. gingivalis* yang terdeteksi pada plak ateroma manusia (3,4) menunjukkan *P. gingivalis* mampu mengaktifasi sel endotel manusia (5).

*Porphyromonas gingivalis* adalah suatu bakteri gram negatif anaerob, berpigmen hitam, dapat menginvasi sel endotel, sel epitel gingiva dan sel otot polos pembuluh darah (6) merupakan salah satu agen etiologi utama yang terlibat pada *periodontitis*, yaitu suatu peradangan pada jaringan penyangga gigi (2). Patogen ini mempunyai faktor virulensi mayor, yaitu *fimbriae* (7,8,9,10), kompleks Lipopolisakarida (LPS) (11) yang terdiri dari , *proteinase LPS* (12,13), *OMP* (14), *hemagglutinin A* dan *hemagglutinin B* (15); *hemoglobin binding domain* (16) dan suatu *protease* (17) berupa *Gingipain* dan *kolagenase* (18,19,20). Masing-masing faktor virulensi tersebut mampu memodulasi respon imun yang berbeda (21) antara lain: mampu menurunkan aktivitas *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ), *Interleukin-12* (IL-12),

*Complement 3* dan *5* (C3 dan C5), makrofag, *Immuoglobuline A* (IgA), *Antigen Presenting Cells* (APC's) ; menstimulasi *Toll Like Receptors* (TLR) yaitu TLR2 dan TLR4, *Cluster Differentiation* (CD) antara lain CD14, CD11a/CD18. Pada tikus dengan delesi gen *Apolipoprotein-E* (Apo-E), paparan *P. gingivalis* menyebabkan terjadinya peningkatan area lesi aterosklerotik (22). Beberapa galur *P. gingivalis* yang telah diuji aktivitasnya pada studi in vitro dan in vivo antara lain ATCC 33277 (*non invasive strain*), W83, FDC 381 dan W50BE (23). Hernowati *et al* pada tahun 2006 berhasil mengisolasi *Outer Membrane Proteine* (OMP) *P. gingivalis* galur ATCC 33277 dengan BM 49,60 dan 72kDa. Diantara ketiganya, OMP 49,00 kDa mempunyai kemampuan hemaglutinasi dan adesi yang paling tinggi pada sel darah tikus (*rattus norvegicus*) dan mampu meningkatkan ekspresi *Monocyte Chemoattractant Proteine -1* (MCP-1), *Plasminogen Activator Inhibitor -1* (PAI-1), *Endothelin -1* (ET-1) pada kultur sel endotel *Human Vein Endothelial Cells* (HUVECs) (24).

Endotelin-1 diproduksi terutama oleh sel endotel pembuluh darah. Selain bersifat sebagai vasokonstriktor, ET-1 juga mempengaruhi permeabilitas pembuluh darah dan berperan pada proses peradangan sel endotel pembuluh darah (25). Biosintesa ET-1 akan meningkat sebagai respon terhadap hypoxia, glukosa, defisiensi estrogen, obesitas, merokok, penuaan, *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang teroksidasi dan angiotensin-II. Endotelin-1 juga menstimulasi produksi *Interleukin* dan TNF- $\alpha$  pada monosit, menstimulasi perlekatan leukosit, agregasi platelet serta ekspresi

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXV, No. 2, Agustus 2009  
Korespondensi: Helmin Elyani, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang, Jl. MT Haryono 193 Malang .  
Telepon 0341-578920. Fax 0341-558958

molekul adhesi, yang akhirnya menyebabkan terjadinya disfungsi pada sel endotel pembuluh darah (26).

Sampai saat ini, studi yang menghubungkan antara *P. gingivalis* dengan ET-1 secara in vivo belum dilakukan. Sehubungan dengan uraian diatas, maka peneliti ini ingin mengetahui pengaruh *P. gingivalis* terhadap ET-1 mencit diet aterogenik, yaitu dengan menghitung proporsi ET-1 sel endotel dan sel otot polos jaringan aorta secara Imunohistokimia.

## METODE

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Januari sampai Desember pada tahun 2008, di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Biologi, Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Fisiologi, Universitas Brawijaya, Malang.

Hewan coba, berjumlah 24 mencit. Perlakuan pada subyek penelitian terbagi dalam 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok A (mencit diet normal injeksi PBS sebagai kelompok kontrol), kelompok B (mencit diet normal injeksi *P. gingivalis* 14 minggu), kelompok C (mencit diet tinggi lemak injeksi PBS sebagai kelompok kontrol), kelompok D (mencit diet tinggi lemak injeksi *P. gingivalis* 14 minggu).

Data yang diperoleh dicari rata-rata dan standar deviasinya, uji beda antar kelompok dengan RAK (Rancangan Acak Kelompok) dilanjutkan dengan uji Tukey dengan taraf signifikansi ( $\alpha$ ) = 0,05. Semua data diolah dengan menggunakan SPSS 14.

## Pengukuran Proporsi ET-1 jaringan aorta secara Imunohistokimia

Preparat organ diblocking serum, diinkubasi dengan antibodi primer *Ab poliklonal rabbit anti ET-1* selama 24 jam. Selanjutnya preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder *IgG anti rabbit* selama 1 jam, ditetesi dengan SA-HRP selama 40 menit, lalu ditetesi dengan *Diamine Benzidine* (DAB) sesudah itu, preparat organ ditetesi dengan counterstain dengan *Mayer hematoxilen* selama 10 menit. Preparat organ dicuci dengan air kran kemudian dicuci dengan aquades selama 10 menit. Kemudian preparat organ ditetesi dengan entellan serta *cover glass*. Dilihat perlapangan pandang dengan mikroskop dengan pembesaran 1000X.

## HASIL

Proporsi ET-1 sel endotel terbanyak didapatkan pada kelompok C yaitu pada sel endotel pembuluh darah mencit dengan perlakuan diet aterogenik yang diinjeksi PBS ( $0,812 \pm 0,036$ ). Proporsi ET-1 pada sel otot polos terbanyak didapatkan pada kelompok C yaitu sel otot polos mencit dengan perlakuan diet tinggi lemak yang diinjeksi PBS ( $0,609 \pm 0,048$ ) (Tabel 1). Dari data tersebut ternyata proporsi ET-1 sel endotel lebih tinggi dari pada sel otot polos (Gambar 1).

Pada hasil pemeriksaan Imunohistokimia ET-1 pada jaringan aorta mencit pada minggu ke-14, didapatkan perbedaan intensitas warna DAB

**Tabel 1. Rata-rata dan SD Proporsi ET-1 dalam Jaringan Aorta Mencit Minggu ke-14**

ET-1	Kelompok A	Kelompok B	Kelompok C	Kelompok D
SEL ENDOTEL	0,678 $\pm$ $\pm 0,036$	0,711 $\pm$ $0,026$	0,812 $\pm$ $\pm 0,036$	0,618 $\pm$ $0,026$
SEL OTOT POLOS	0,569 $\pm$	0,528 $\pm$	0,609 $\pm$	0,482 $\pm$

### Keterangan :

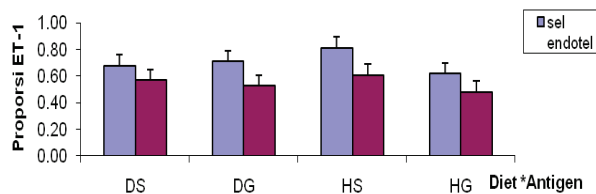
Kelompok A = Diet Normal Injeksi PBS ;

Kelompok B = Diet Normal Injeksi *P. gingivalis* .

Kelompok C = HFD(High Fat Diet)/diet aterogenik injeksi PBS.

Kelompok D= HFD/(High Fat Diet) /diet aterogenik injeksi *P. gingivalis*.

(*Diamine Benzidine*). Intensitas warna DAB menunjukkan adanya ikatan antara antibodi anti ET-1 dan protein ET-1. Pada mencit dengan perlakuan kontrol negatif didapatkan intensitas warna DAB yang paling rendah ( atau ikatan antara antibodi anti ET-1 dan protein ET-1 lebih sedikit ) dibanding dengan kelompok mencit yang lain. Ikatan antara antibodi anti ET-1 dan protein ET-1 pada sel endotel dan pada sel otot polos lebih banyak ditemui pada mencit dengan perlakuan diet aterogenik yang diinjeksi PBS (Gambar 2).



**Gambar 1. Grafik Proporsi ET-1 pada Sel Endotel dan Sel Otot Polos Aorta Minggu ke-14.**

### Keterangan :

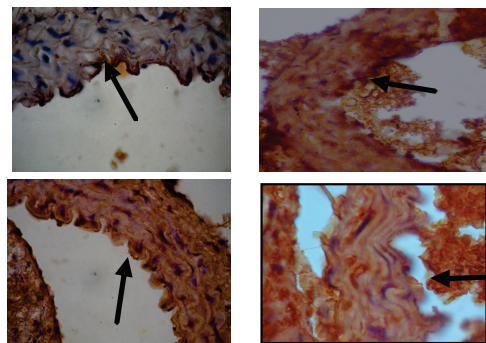
Kelompok A (DS) = Diet Normal Injeksi PBS ;

Kelompok B (DG) = Diet Normal Injeksi *P. gingivalis* .

Kelompok C (HS) = HFD(High Fat Diet)/diet aterogenik injeksi PBS .

Kelompok D (HG) = HFD/(High Fat Diet) /diet aterogenik injeksi *P. gingivalis*.

 = sel otot polos  = sel endotel



**Gambar 2. Hasil Pemeriksaan ET-1 Secara IHC pada Minggu ke-14, Adanya ET-1 pada Sel Endotel Aorta Ditunjukkan dengan Tanda Panah (Mikroskop Cahaya Perbesaran 1000x).**

Selanjutnya dilakukan pengujian terhadap 2 faktor mana yang paling berpengaruh, antara jenis diet dan jenis injeksi serta interaksi diantara keduanya terhadap proporsi ET-1 dengan menggunakan RAK (Rancangan Acak Kelompok) 2 faktor dengan interaksi, didapatkan hasil bahwa proporsi ET-1 pada sel endotel aorta mencit diet aterogenik mengalami peningkatan yang signifikan ( $\text{sig}=0.001$ ) tetapi peningkatan proporsi ET-1 pada sel otot polos tidak signifikan ( $\text{sig}=0.308$ ).

## DISKUSI

Pengukuran proporsi ET-1 diambil dari data imunohistokimia pada minggu ke-14, karena pada pemeriksaan pendahuluan terhadap kadar ET-1 serum didapatkan adanya peningkatan proporsi ET-1 secara bermakna pada minggu ke-14. Proporsi ET-1 sel endotel meningkat secara signifikan tetapi peningkatan proporsi ET-1 otot polos yang tidak signifikan. Kemungkinan penyebabnya adalah perubahan fungsi reseptor ETA maupun ETB pada sel endotel maupun sel otot polos dan adanya perbedaan efek ET-1 pada sel endotel dan pada sel otot polos.

Peningkatan ET-1 yang bersumber dari sel endotel salah satunya berasal dari LDL teroksidasi akibat adanya diet tinggi lemak (26,27). Pada penelitian ini pemberian diet aterogenik / diet tinggi lemak, memungkinkan terjadinya peningkatan metabolisme lemak. Salah satu transporter lemak dalam darah adalah LDL, suatu lipoprotein berdensitas rendah, yang sangat mudah teroksidasi (28). LDL yang teroksidasi akan berperan sebagai suatu autoantigen yang pada proses aterosklerosis akan membentuk kompleks imun antara *oxLDL* dengan anti-*oxLDL* yang akan 'dimakan' oleh makrofag jaringan, membentuk sel busa, mengaktifasi sitokin pro inflamasi dan ROS, sehingga meningkatkan ET-1. Adanya *oxLDL* yang berikatan dengan reseptor ETA akan menginduksi peningkatan ekspresi gen ET-1 pada sel endotel dan sel otot polos pembuluh darah (29).

*The net effect* dari ET-1 bergantung pada lokasi reseptor dan keseimbangan antara reseptor ET-1 yaitu, ETA dan ET-B. Pada keadaan normal, dinding pembuluh darah memproduksi sedikit ET-1 dan produksi NO meningkat, artinya keseimbangan efek vasorelaksasi melalui peningkatan sinyal cGMP (*cyclic Guanine Monophosphat*). Pada kondisi patologis, respon reseptor bisa berlawanan. Pada keadaan disfungsi endotel, terjadi peningkatan ET-1 pada sel otot polos dan makrofag melalui peningkatan reseptor ET-B pada sel otot polos (yang menyebabkan vasokonstriksi dan *under expression* dari reseptor ET-B sel endotel) memperantarai terbentuknya *superoxide* pada disfungsi endotel. *Superoxide* inilah yang akan menurunkan aktivitas biologi NO melalui pembentukan *peroksinitrat* sehingga menurunkan ekspresi eNOS (*endothelial NO synthase*), menurunkan produksi NO (*Nitrit Oxide*). Menghasilkan efek kolektif yaitu vasokonstriksi, inflamasi dan disfungsi endotel.

Peningkatan jumlah reseptor ET-B ini dapat ditemui

pada aterosklerosis manusia. Reseptor tersebut ditemukan pada sel-sel radang (makrofag, limfosit T) dan sel otot polos. Sel otot polos intimal, yang berdekatan dengan *foam cell* menunjukkan adanya peningkatan ekspresi ET-1 dan reseptor ET-B, hal ini diduga, akibat adanya *switching* dari reseptor ET-A ke ET-B pada sel otot polos yang akhirnya memperparah aterosklerosis. Berdasarkan teori adanya *switching*, maka kemungkinan peningkatan jumlah ET-1 sel endotel pada hasil penelitian ini, adalah peningkatan jumlah reseptor ETB di sel endotel, yang efeknya mengalami *switching*, yaitu terjadi perubahan dari efek vasorelaksasi menjadi efek vasokonstriksi.

## KESIMPULAN

Paparan *P. gingivalis* mampu meningkatkan proporsi ET-1 pada sel endotel aorta mencit diet aterogenik.

Diperlukan penelitian lanjutan tentang hubungan antara keberadaan *P. gingivalis* dengan mengukur jumlah reseptor *P. gingivalis* (TLR2/4), diet aterogenik (dengan mengukur jumlah *LDL ox*, *foam cell*) dan ET-1 (jumlah *big* ET-1 dan jumlah reseptor ET-A dan ET-B).

## DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Rich S, McLaughlin VV. *Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease*. Circulation. 2003;108:2184-2190.
2. Gonzales D, Tzianabos AO, Genco CA, Gibson FC. *Immunization with porphyromonas gingivalis capsular polysaccharide prevents Porphyromonas gingivalis elicited oral bone loss In murine model*. Infect Immun. 2003;71.
3. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. *Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques*. J.Periodontal. 2000; 71: 1554 -1560.
4. Kozarov E, Miyashita N, Burk J, Cervený K, Brown TA, McArthur WP. *Expression and immunogenicity of hemagglutinin A from P gingivalis in an avirulent Salmonella enterica serovivar vaccine strain*. Infect Immun. 2000; 68.
5. Clemens WJ, Zahlten B, Schmeck C, et al. *Porphyromonas gingivalis strain-dependent activation of human endothelial cells*. American Society for Microbiology. 2004; 84(7): 584-595.
6. Brodala N, Merricks EP, Bellinger DA, et al. *P.gingivalis bacteriemia induces coronary and aortic atherosclerosis in normocholesterolemic And hypercholesterolemic pigs*. Arteriosclerosis Thromb Vascular Disease. 2005; 25: 1.
7. Amano A, Nakagawa ON, Hamada N. *Variations of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis*. J.Periodontal Research. 2004; 39.
8. Hajishengalis G, Sojar H, Genco RJ, DeNardin E. *Intracellular signaling and cytokine induction upon interaction of Porphyromonas gingivalis fimbriae with pattern-recognition receptor*. Immunol Invest. 2004; 33.

9. Jian A, Batista EL, Serhan C, Stahl GL, Van Dyke TE. *The role for periodontitis in the progression of lipid deposition in animal model.* Infection and Immunity. 2003; 54:329-341,1997.
10. Ogawa T, Asai Y, Hashimoto M, Uchida H. *Bacterial fimbriae activate human peripheral blood monocytes utilizing TLR2, CD14 and CD11a/CD 18 As cellular receptor.* European J Immunol. 2001; 32.
11. Demmer RT, Desvarieux M. *Periodontal infection and cardiovascular disease the heart of matter.* Journal of American Dental Association. 2006; 37: 17S.
12. Cohen N, Moriset J, Emilie D. *Induction of tolerance by Porphyromonas gingivalis on APCs : a mechanism implicated in periodontal infection.* J Dental Res. 2004; 83.
13. Zhou Q, Desta T, Fenton M, Graves DT, Amar S. *Cytokine profiling of macrophage exposed to Porphyromonas gingivalis its, LPS or its FimA protein.* Infect Immun. 2005; 73.
14. Oda T, Yoshie H, Yamazaki K. *Porphyromonas gingivalis antigen preferentially stimulates T Cell to Express IL17 but not receptor activator of NFkB ligand in vitro.* Oral Microbiol Immunol. 2003; 18.
15. Kollenbrader PE, London J. *Adhere today, here, tomorrow: oral bacterial adherence.* J. Bacteriol. 1993; 175.
16. DeCarlo AA, Huang Y, Collier CA, Langley DB, Karz J. *Feasibility of an HA2 domain based periodontitis vaccine.* Infection Immun. 2003; 71.
17. Okahashi N, Inaba H, Nakagawa I, Yamamura T, Kuboniwa M, Nakayama K. *Porphyromonas gingivalis induces receptor activator of NFkB ligand in expression in osteoblast through the activator of protein 1 pathway.* Infect Immun. 2004; 72.
18. Nakagawa T, Saito A, Hosaka Y, Ishikara K. *Gingipains as candidate antigens for P. gingivalis vaccine.* Keio J Med. 2003; 52.
19. Nakayama K. *Molecular genetics of Porphyromonas gingivalis gingipains and other virulence factors.* Current Protein Pept Sci. 2003; 4.
20. Yilmaz O, Young PA, Lamont RJ, Kenny GE. *Gingival epithelial cell signaling and cytoskeletal responses to Porphyromonas gingivalis invasion.* Microbiology. 2003; (149): 2417.
21. Thelade E, Hill MJ, Marsh PD. *Factors controlling the microflora of healthy mouth.* Human Microbial Ecology. CRC Press Inc Boca Raton Fla; 1990.
22. Lepine G, Ellen RP, Progulske-Fox A. *Construction and preliminary characterisation of three hemagglutinin mutants of P gingivalis.* Oral Microbiol Immunol. 1996; 11.
23. Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D. *Loss of LPS receptor CD14 from surface of human macrophage-like cells mediated by Porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles.* Microbiol. Pathog. 2004; 36.
24. Hernowati. *Pengaruh OMP P. gingivalis terhadap PAI-1, MCP-1 dan ET-1 pada kultur HUVEC'S.* 2006.
25. Rozenweig A. *Circulating endothelial progenitor cell as biomarkers.* New England Journal. 2005; 353(10): 1055-1057.
26. Ludewig IB, Krebs P, Scandella E. *Immunopathogenesis of atherosclerosis.* Journal of Leukocyte Biology. 2002; 76: 300-306.
27. Dhaun N, Goddard J, Webb DJ. *The Endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease.* J Am Soc Nephrol. 2006; 17: 943-955.
28. Luscher TF, Barton M. *Endothelins and endothelin receptor antagonists : therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs.* Circulation. 2000; 102; 2434-2440.
29. Li L, Messas E, Batista Jr EL, Levine RA, Amar S. *Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E deficient murine model.* Circulation. 2002; 105: 861-867.