

Pengaruh Pemberian Topikal Low Molecular Weight Hyaluronate pada Ekspresi VEGF Luka Superfisial yang Dirawat Dengan Membran Amnion Freeze-Dried

Ferdinant Martinus Djawa, Imam Susilo

Departemen/SMF Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga
RSUD. Dr. Soetomo
Surabaya

ABSTRAK

Latar belakang

Tujuan utama dari perawatan luka adalah penyembuhan luka yang cepat dengan fungsi dan estetik yang memuaskan. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) dalam penyembuhan luka superfisial kulit memacu angiogenesis melalui promosi sel endotel. Asam hialuronat adalah salah satu komponen penting dari matriks ekstrasel yang memainkan peran utama dalam morfogenesis jaringan, migrasi sel, diferensiasi dan adhesi. Tujuan penelitian ini untuk mengevaluasi pengaruh hialuronat LMW pada ekspresi VEGF dalam penyembuhan luka yang dirawat dengan amnion freeze-dried.

Metode

32 ekor tikus putih galur Wistar jantan dibagi dalam 2 kelompok kontrol dan perlakuan, kemudian dibuat luka superfisial pada masing-masing punggung tikus. Kelompok kontrol diterapi dengan amnion freeze-dried, sedangkan kelompok perlakuan diberikan hialuronat LMW 1% dan amnion freeze-dried. Setiap kelompok dibagi menjadi 2 sub kelompok, masing-masing terdiri dari 8 ekor tikus, determinasi pada hari ke-3 dan ke-7. Evaluasi histology dilakukan untuk menentukan adanya pembuluh darah baru dan ekspresi VEGF sel endotel pembuluh darah.

Hasil

Terdapat perbedaan jumlah pembuluh darah dan perbedaan ekspresi VEGF sel endotel pembuluh darah di antara kelompok yang diterapi dengan amnion freeze-dried dan kelompok yang diterapi amnion freeze-dried dengan tambahan hialuronat LMW.

Kesimpulan

Penambahan hialuronat LMW memberikan efek yang menguntungkan pada penyembuhan luka superficial tikus putih jantan yang dirawat dengan amnion freeze-dried.

Kata kunci : Amnion freeze-dried, hialuronat LMW, ekspresi VEGF.

ABSTRACT

Background

The main goal of wound care is the rapid wound closure with satisfactory function and esthetics. *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) in wound healing provokes dermal angiogenesis through promotion of endothelial cell. Hyaluronic acid (HA) is one of the essential components of extracellular matrix, which plays a predominant role in tissue morphogenesis, cell migration, differentiation and adhesion. This study was to evaluate the effect of Low Molecular Weight Hyaluronate on expression of VEGF in wound healing was treated by amnion preserved.

Methods

Thirty-two wistar rats were divided into 2 groups and then superficial-thickness excisional wounds were created along their backs. One was treated by freeze-dried amnion and 1% Low Molecular Weight Hyaluronate and the other was treated by freeze dried amnion as control group. Each of the groups was divided into 2 sub groups. Each of the sub groups composed of 8 wistar rats based on the periode of termination: 3rd, 7th day after wounded. Histological evaluation was done to determine the presence of new small blood vessel and expression of VEGF of capillary endothelial cells.

Results

Combination of freeze-dried amnion and low molecular weight hyaluronate on superficial-thickness excisional wounds improved wound healing characterized by neovascularization formed and changed of expression of VEGF within cytoplasm or surface of endothel cells.

Conclusion

LMW Hyaluronate was promote supporting effect in repairment of superficial wound in male Wistar rats which was treated with freeze-dried amnion.

Key words : Amnion freeze dried, hialuronat LMW, VEGF expression.

PENDAHULUAN

Setiap tahun di Amerika Serikat lebih dari 1,25 juta orang mengalami luka bakar, dan 6,5 juta orang menderita luka ulserasi kronik akibat penekanan, stasis vena, atau diabetes mellitus¹. Tujuan utama dari perawatan luka adalah penutupan luka yang cepat dengan fungsi dan estetik yang memuaskan. Luka superfisial yang tidak mencapai seluruh ketebalan epidermis sering dijumpai dalam perawatan kasus bedah, terutama pada luka excoriasi, luka bakar derajat II superfisial dan luka pada donor *Split Thickness Skin Graft*.¹ Amnion yang dipreservasi secara *freeze-dried* memang praktis digunakan, akan tetapi kadar *growth factor* yang ada didalamnya mengalami penurunan yang cukup signifikan.^{2,7} Amnion segar sebagai *biological dressing* mempunyai efek antibakterial, anti nyeri dan mengandung *growth factor* yang memacu penyembuhan luka.^{8,3,4}

Asam hialuronik (hialuronan atau hialuronat) merupakan komponen glikosaminoglikan dalam matriks ekstrasel, dihasilkan oleh sel fibroblast.⁹ Hialuronat terdiri atas dua kelompok yakni *High Molecular Weight Hyaluronate* atau Hialuronat Makromolekul (HAM) dan hasil degradasinya yang berupa *Low Molecular Weight Hyaluronate* (Hialuronat LMW). Pada tipe LMW terbukti berperan memacu angiogenesis, mitosis dan migrasi sel keratinosit, fibroblas dan sel endothel.¹⁰

Vascular endothelial growth factor (VEGF) adalah glikoprotein yang berfungsi meningkatkan proliferasi, migrasi, survival pada sel endothel serta meningkatkan permeabilitas kapiler. VEGF merupakan sinyal kunci yang digunakan oleh sel yang hipoksia untuk memicu pertumbuhan pembuluh darah.¹²

Penggunaan membran amnion *freeze-dried* dan hialuronat LMW diharapkan saling menunjang dalam penyembuhan luka superfisial kulit. Apakah penggunaan membran amnion *freeze-dried* dan hialuronat LMW dapat memicu angiogenesis yang ditandai dengan peningkatan jumlah pembuluh darah dan ekspresi VEGF pada proses penyembuhan luka superfisial kulit?

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium menggunakan *post test only control group design*, di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga pada bulan Januari 2012. Unit eksperimen adalah tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) jantan yang terdapat di unit hewan coba Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang berumur 40-60 hari dengan berat badan 200-300 gram. Rando-misasi secara *simple random* dalam kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, masing-masing 8 ekor tikus untuk 4 kelompok pengamatan pada hari ke-3 dan ke-7.

Luka superfisial pada punggung dibuat dengan cara eksisi tangensial sampai tampak adanya bintik-bintik perdarahan atau lapisan dermis yang mengkilap. Kelompok kontrol luka ditutup dengan amnion *freeze-dried*, sedangkan pada kelompok perlakuan diolesi dengan hialuronat LMW 1% dan ditutup dengan amnion *freeze-dried*.

Parameter yang diamati adalah jumlah pembuluh darah baru dan ekspresi VEGF sel endothel pada area perlukaan. Pemeriksaan jumlah pembuluh darah adalah dengan penghitungan rata-rata jumlah pembuluh darah baru dengan lumen yang mengandung eritrosit secara mikroskopik dengan pembesaran 400x pada 5 lapangan pandang pada sediaan luka superfisial yang diwarnai dengan HE. Ekspresi VEGF endothel adalah dengan menghitung rata-rata jumlah sel endothel pembuluh darah kapiler dengan lumen yang mengandung eritrosit yang mengekspresikan VEGF secara mikroskopis dengan pembesaran 400x pada 3 lapangan pandang secara acak. Pewarnaan VEGF (Boster Biological Tech., LTD® 1:200) dilakukan dengan teknik imunohistokimia pada sediaan blok parafin. Hasil parameter diolah secara statistik dengan uji *Independent t-test*.

HASIL

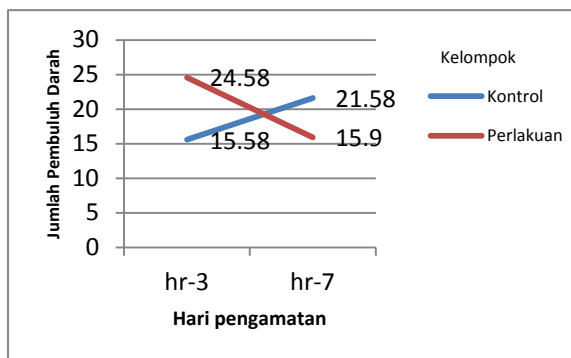
Hasil penghitungan jumlah pembuluh darah terlihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 1. Jumlah pembuluh darah pada hari ke-3 dan hari ke-7 pada luka superfisial kulit tikus kelompok kontrol dan perlakuan.

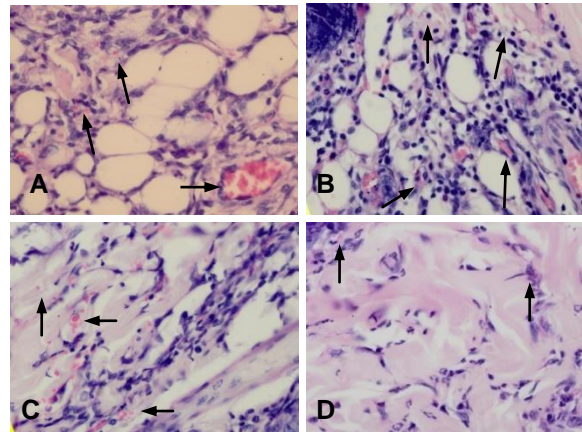
Kelompok	n	Hari ke-3		Hari ke-7		Independent t-test
		$\bar{x} \pm SD$	Min-Maks	$\bar{x} \pm SD$	Min-Maks	
Kontrol	8	15,58 ± 1,98	13,2-18,4	21,58 ± 4,83	16,0-30,4	t=-3,253 p=0,006*
Perlakuan	8	24,58 ± 4,82	18,6-31,6	15,90 ± 3,21	11,4-20,4	t=4,239 p=0,001*
Independent t-test		t=-4,887 p=0,000*		t=2,770 p=0,015*		

Keterangan : * signifikan pada $\alpha=0,05$

Pada Tabel 1, menunjukkan data mempunyai distribusi normal pada kedua kelompok pengamatan dengan uji Kolmogorov-Smirnov. Terlihat bahwa rata-rata jumlah pembuluh darah pada hari ke-3 untuk kelompok perlakuan lebih banyak dari pada kelompok kontrol. Jumlah pembuluh darah antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada hari ke-3 dilakukan uji *independent sample t-test* variansi homogen, nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) menunjukkan perbedaan yang bermakna. Sedangkan jumlah pembuluh darah pada hari ke-7, terlihat bahwa rata-rata jumlah pembuluh darah kelompok perlakuan lebih sedikit dari pada kelompok kontrol. Dengan uji *independent sample t-test* variansi homogen, nilai $p=0,015$ ($p<0,05$) menunjukkan perbedaan yang bermakna. Jumlah pembuluh darah antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan hari ke-3 dan ke-7, dengan uji *independent t-test* pada kelompok kontrol nilai $p=0,006$ ($p<0,05$) dan pada kelompok perlakuan nilai $p= 0,001$ ($p<0,05$) menunjukkan perubahan yang bermakna.



Gambar 1. Jumlah pembuluh darah pada hari ke-3 dan hari ke-7 pada luka superfisial kulit tikus kelompok kontrol dan perlakuan.



Gambar 2. Pembuluh darah (tanda panah) pada hari ke-7. (A,C) Kelompok kontrol (B,D) Kelompok perlakuan (X40)

Dari diagram dan gambar di atas, tampak jumlah pembuluh darah pada kelompok kontrol meningkat dari hari ke-3 (Gbr. A) dibandingkan pada hari ke-7 (Gbr. C), sedangkan pada kelompok perlakuan terlihat penurunan jumlah pembuluh darah pada hari ke-3 (Gbr. B) dibandingkan pada hari ke-7 (Gbr. D).

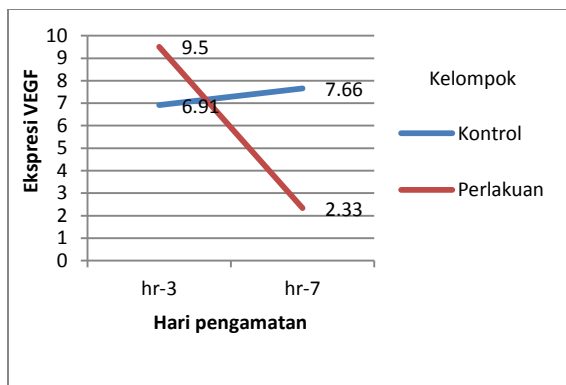
Ekspresi VEGF Sel Endotel

Hasil penghitungan jumlah pembuluh darah terlihat pada tabel di bawah ini :

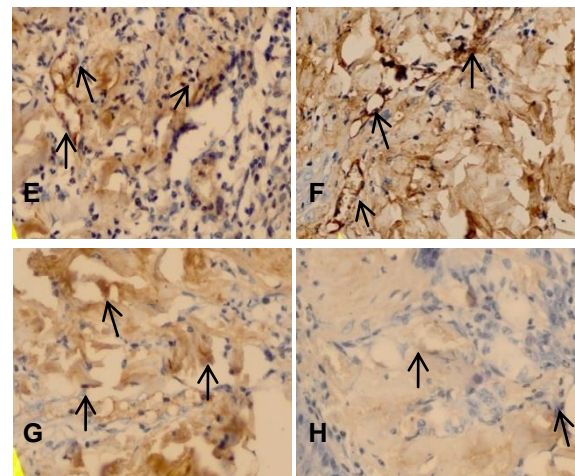
Tabel 2. Ekspresi VEGF sel endotel hari ke-3 dan hari ke-7 pada luka superfisial kulit tikus kelompok kontrol dan perlakuan

Kelompok	N	Hari ke-3		Hari ke-7		Independent t-test
		$\bar{x} \pm SD$	Min-Maks	$\bar{x} \pm SD$	Min-Maks	
Kontrol	8	6,91 ± 1,12	5,33-8,33	7,66 ± 0,80	6,66-8,66	t=-1,538 p=0,146
Perlakuan	8	9,50 ± 1,61	8,00-13,33	2,33 ± 0,50	1,66-3,33	t=11,997 p=0,000*
Independent t-test			t=-3,718 p=0,002*		t=16,020 p=0,000*	

Pada tabel 2, menunjukkan data mempunyai distribusi normal pada kedua kelompok pengamatan dengan uji Kolmogorov-Smirnov. Terlihat bahwa rata-rata jumlah ekspresi VEGF endotel pada hari ke-3 untuk kelompok perlakuan lebih banyak dari pada kelompok kontrol, dengan uji *independent sample t-test* variansi homogen, nilai $p=0,002$ ($p<0,05$) menunjukkan perbedaan yang bermakna. Sedangkan jumlah ekspresi VEGF endotel pada hari ke-7, terlihat bahwa rata-rata jumlah ekspresi VEGF endotel kelompok kontrol lebih banyak dari pada kelompok perlakuan. Dengan uji *independent sample t-test* variansi homogen, nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna. Perubahan jumlah ekspresi VEGF sel endotel antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan hari ke-3 dan hari ke-7, dengan uji *independent t-test* pada kelompok kontrol nilai $p=0,146$ ($p>0,05$) menunjukkan perubahan yang tidak bermakna, sedangkan pada kelompok perlakuan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) menunjukkan perubahan yang bermakna.



Gambar 3. Jumlah Ekspresi VEGF dalam hari ke-3 dan hari ke-7 pada luka superfisial kulit tikus kelompok kontrol dan perlakuan.



Gambar 4. Ekspresi VEGF sel endotel (tanda panah) hari ke-3 dan ke-7. (E,G) Kelompok kontrol. (F,H) Kelompok perlakuan (X40)

Dari diagram di atas, tampak ekspresi VEGF sel endotel pada kelompok kontrol sedikit meningkat dari hari ke-3 (Gbr. E) dibanding pada hari ke-7 (Gbr. G), sedangkan pada kelompok perlakuan terlihat penurunan ekspresi VEGF sel endotel pada hari ke-3 (Gbr. F) dibanding pada hari ke-7 (Gbr. H).

DISKUSI

Penyembuhan luka merupakan proses interaktif dinamis yang melibatkan sel-sel radang, matriks ekstrasel, serta sel parenkim, berupa reaksi inflamasi, proliferasi dan *remodeling*. Formasi jaringan granulasi mulai terbentuk dalam 3-5 hari setelah terjadi luka.¹³

Angiogenesis pada penyembuhan luka dapat terjadi melalui migrasi, proliferasi dan maturisasi dari sel endotel pembuluh darah yang sudah ada, ataupun rekrutmen *Endothelial Progenitor Cells* dari sumsum tulang ke jaringan. Peristiwa awal dalam proses angiogenesis adalah migrasi yang terarah dari sel endotel, yang mula-mula diinduksi oleh FGF1 (*acidic*

FGF) atau FGF2 (*basic FGF*), kemudian beberapa molekul lainnya seperti VEGF, TGF- β , *angiogenin*, *angiotropin*, *angiopoetin-1*, dan *thrombospondin*. Tekanan O₂ yang rendah dan peningkatan kadar asam laktat juga memacu angiogenesis.¹³ Setelah luka diisi dengan jaringan granulasi yang baru, angiogenesis akan berhenti dan banyak akan dihancurkan akibat apoptosis yang mungkin diatur oleh berbagai molekul matriks, seperti *thrombospondin-1* dan 2, dan faktor angiogenesis, seperti *angiostatin*, *endostatin*, dan *angiopoetin-2*.¹ West DC, Fan TPD, 2001, mengatakan pemberian Hialuronat LMW eksogen akan menyebabkan terjadinya degradasi hialuronat makromolekul sebanding dengan kenaikan kadar hialuronidase sehingga onset angiogenesis lebih cepat pada terapi dengan Hialuronat LMW.

Wolbank dkk, melakukan penelitian untuk mengetahui faktor yang berperan dalam angiogenesis pada membran amnion, menemukan 14 faktor angiogenesis terdapat dalam amnion yakni yang ditemukan dengan kadar tinggi: *Angiogenin*, GRO, IL-6/8, TIMP 1,2, MCP1, dan yang ditemukan dengan kadar rendah: EGF, IFN γ , IGF-1, *leptin*, RANTES, TGF β 1 dan *thrombopoetin*. Molekul asam hialuronat banyak terikat pada reseptor permukaan sel seperti CD44 dan RHAMM (*receptor of HA-mediated motility*) yang memungkinkan asam hialuronat menginisiasi transmisi sinyal mendukung proliferasi dan migrasi dari berbagai tipe sel.^{15,16} Pemberian hialuronat LMW terbukti mempercepat onset dan laju degradasi HAM yang paralel dengan terjadinya angiogenesis. Degradasi HAM harus terjadi mendahului proses vaskularisasi.¹⁷ Hialuronat Makromolekul (HAM) menghambat proliferasi dan migrasi endothel dan dikatakan malah menyebabkan disrupsi lapisan *monolayer endothel* yang baru terbentuk pada konsentrasi yang fisiologis (> 100 μ gr/ml). Efek inhibisi tersebut menurun pada penurunan ukuran berat molekul hialuronat.¹⁸

Pengamatan dilakukan pada hari ke-3 karena efek angiogenesis dan proliferasi sel keratinosit dari hialuronat LMW mulai prominen setelah hari ke-2 dan ke-4 sedangkan hari ke-7 untuk melihat peristiwa angiogenesis setelah terbentuk jaringan granulasi yang umumnya terjadi pada hari ke-3 sampai hari ke-5. Pada penelitian ini pengamatan neovaskularisasi dengan melihat jumlah pembuluh darah yang mengandung eritrosit, dan ekspresi VEGF pada

sel endotelnya dimana akan terlihat warna coklat tua pada sitoplasma ataupun pada permukaan sel.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) adalah glikoprotein yang berfungsi meningkatkan proliferasi, migrasi, survival pada sel endotel serta meningkatkan permeabilitas kapiler, dimana akan mengikat 3 reseptor transmembran tirosin kinase yang berbeda. VEGFR-1 (Flt-1) dan VEGFR-2 (KDR) berlokasi pada permukaan endotel pembuluh darah. KDR adalah mediator penting untuk kemotaksis dan proliferasi sel endotel in vitro dan juga induksi diferensiasi endotel. Sedangkan Flt-1 dibutuhkan dalam organisasi dan mungkin juga dalam mediasi permeabilitas pembuluh darah, ekspresi MMP dalam sel-sel otot polos vaskuler, juga menginduksi protein anti-apoptosis. Dalam penyembuhan luka, VEGF-A mempromosikan peristiwa awal dalam angiogenesis, terutama migrasi dan proliferasi sel endotel. Transkripsi dan sekresi VEGF-A terjadi sepanjang peningkatan VEGFR pada luka akut. Pada saat cedera trombosit akan mengeluarkan VEGF-A, sedangkan oleh makrofag selama masa pemulihan di samping merilis TNF- α yang menginduksi ekspresi VEGF-A pada keratinosit dan fibroblast.²⁵

Penelitian oleh Saputro DS dan Noer MS pada luka bakar derajat II superfisial menunjukkan bahwa kecepatan epithelisasi oleh amnion lebih unggul dibandingkan terapi konvensional menggunakan tulle.²⁰ Talmi dkk melakukan penelitian menggunakan membran amnion segar untuk menutup luka operasi, luka bakar, ulkus dan dikatakan bahwa membran amnion bermanfaat sebagai *biological dressing* yang memfasilitasi penyembuhan luka.⁸ Gomes dan Hamann juga menunjukkan bahwa hialuronat mampu meningkatkan migrasi dan proliferasi sel epitel invitro sehingga penutupan luka terjadi lebih cepat.¹⁰ Ozgenel GY, 2004, menemukan penggunaan amnion bersamaan dengan hialuronat pada *repair* tendo mampu mencegah dispersi yang cepat dari hialuronat. Hal ini menyebabkan konsentrasi hialuronat bertahan lebih lama pada luka sehingga kerja hialuronat lebih efektif.

KESIMPULAN

Penambahan hialuronat LMW pada penggunaan amnion *freeze-dried* sebagai *dressing* menghasilkan onset yang lebih cepat pada angio-

genesis dan maturasi pembuluh darah dimana dapat terlihat pada penurunan jumlah pembuluh darah dan ekspresi VEGF sel endotel kapiler pembuluh darah.

DAFTAR PUSTAKA

1. Singer J, Adam, Dagum B, Alexander. Current Management of Acute Cutaneous Wound. *N Eng J Med. New York.*2008;359: 1037-46.
2. Thomasen H, Pauklin M, Steuhl KP, Meller D. Comparison of Cryopreserved and Freeze-Dried Amniotic Membrane for ophthalmologic applications. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*2009; 50:1792.
3. Wolbank S, Hildner F, Redl H, Griensven MV, Gabriel C, et al. Impact of human amniotic membrane preparation on release of angiogenic factor. *J Tissue Engineering and Regenerative medicine.*2009;3:651-4.
4. Koizumi N, Inatomi T, Sotozono C, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth Factors mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res.*2000;20: 173-7.
5. Sri Subekti E, Yogiandoro D, Suhendro G. The Difference of TGF β 2 Concentration between Fresh Amniotic Membrane and Freeze-Dried Amniotic Membrane. Surabaya: Koleksi Literatur Pusat Biomaterial/Bank Jaringan RSUD. Dr. Soetomo. 2009.
6. Ihsan M. Perbedaan kadar EGF pada Membran Amnion Segar dan Membran Amnion Kering Beku (Freeze-dried). Surabaya; Koleksi Literatur Pusat Biomaterial/Bank Jaringan RSUD. Dr. Soetomo.2009.
7. Pasaribu IA, Hoesin RG, Suhendro G. Pengaruh Kriopreservasi -80°C terhadap Kadar basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) pada Membran Amnion. Surabaya: Koleksi Literatur Pusat Biomaterial/Bank Jaringan RSUD. Dr. Soetomo. 2008.
8. Talmi YP, Finkelstein Y, Zohar Y. Use of Human Amniotic Membrane as a Biological Dressing. *Eur J Plast Surg.*1990;13:160-2.
9. Jenkins RH, Williams JD, Steadman R. Fibroblasts Transformed to a Wound Healing Phenotype Accumulate a Hyaluronan-Rich Extracellular Matrix Through Reduced Degradation. *Eur Cell Mater.*2005; 10:69.
10. Gomes JAP, Amankwah R, Richards AP, Dua HS. Sodium Hyaluronate (Hyaluronic Acid) promotes migration of Human Corneal Epithelial Cells in vitro. *Br Ophthalmology.*2004;88: 821-5.
11. Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions & turnover. *J Internal Medicine.*1997;242:27-33.
12. Senger E, Donald, Van De Water Livingstone. VEGF Expression by Epithelial and Stromal Cell Compartment. Beth Israel Deconees Medical Centre; Boston; 2000.
13. Li Jie, Chen Juan, Robert Kirsner. Pathophysiology of Acute Wound Healing. *J Clin dermatol.*2007;25:9-18.
14. Lo V, Pope E. Amniotic Membrane use in Dermatology. *Int J Dermatol.*2009;48:935-40
15. Dai Guang *et al.* Chronic Ultraviolet B Irradiation Causes Loss of Hyaluronic Acid from Mouse Dermis Because of Down-Regulation of Hyaluronic Acid Synthases. *The Am J of Pathol.*2007;1:1451-9.
16. Yung Sue, Thomas Gareth, Davies Malcolm. Induction of hyaluronan metabolism after mechanical injury of human peritoneal mesothelial cells in vitro. Correspondence; Email:daviesm6@cf.ac.uk; Hongkong; 2000.
17. Ohkawara Y, Tamura G, Iwasaki T, Tanaka A. Activation and TGF β Production in Eosinophils by Hyaluronan. *Am J Resp Cell Mol Biol.*2000;23:444-51.
18. Philips GO, Kennedy JF, Williams PA. Hyaluronan. Cambridge England: Woodhead Publishing.2002.p.133-511.
19. Stephan Barrientos, Olivera Stojadinovic, Michael S. Golinko, Harold Brem, Marjana Tomic-Canic. Growth factor and cytokine in wound healing. Perspective article, New York, 2008.
20. Saputro ID, Noer MS. Aplikasi Amnion pada Perawatan Luka Bakar derajat II Superficial di Lab/SMF. Bedah Plastik RSUD. Dr. Soetomo Surabaya, Karya Akhir Penelitian. Surabaya: Lab/SMF. Bedah Plastik RSUD Dr. Soetomo.2008.