

PENGARUH PEMBERIAN DARAPLADIB TERHADAP PENURUNAN KETEBALAN INTIMA-MEDIA AORTA TIKUS SPRAGUE-DAWLEY MODEL ATEROSKLEROSIS DENGAN KONDISI DISLIPIDEMIA

Wihastuti, Titin A¹., Heriansyah, Teuku²., Sarwono, Imam³., Wardhani, Fariza Astri Kusuma⁴,

¹Department of Biomedical, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Malang Indonesia.65145

²Department of Cardiology, Faculty of Medicine, Syah Kuala University, Banda Aceh Indonesia.23111

³Department of Pathology Anatomi, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Malang Indonesia.65145

⁴Bachelor Programme, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Malang Indonesia.65145

Abstrak

Disfungsi endotel yang disebabkan oleh dislipidemia, rokok dan lain-lain merupakan awal dari perkembangan aterosklerosis. Sekali deposit di dinding pembuluh darah arteri, lipoprotein bisa mendorong aterosklerosis secara langsung dengan mempengaruhi fungsi endotel. Sel-sel inflamasi seperti monosit, makrofag, sel T dan sel mast akan menyekresikan Lp-PLA2 yang kemudian akan berikatan dengan LDL teroksidasi. Kemudian, di dalam plak aterosklerosis, Lp-PLA2 akan menghidrolisa partikel LDL teroksidasi untuk membentuk LysoPC dan OxNEFA. LysoPC dan OxNEFA menyebabkan plak menjadi tidak stabil melalui pembentukan proses inflamasi terus menerus dan berkontribusi terhadap disfungsi endotel, nekrosis dan apoptosis. Telah diduga bahwa penebalan dinding arteri karena deposisi lipid dan kolesterol, proliferasi dari sel-sel otot polos dan formasi matriks jaringan ikat (collagen, elastic fibers dan proteoglycan) di dalam intima atau media dari dinding arteri. Darapladip adalah *inhibitor Lipoprotein-associated phospholipase A2* yang diduga dapat menghambat progresivitas lesi aterosklerosis. Untuk mengetahui efek darapladib dalam menurunkan ketebalan intima-media. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan disain *post test with control group* secara *invivo* dan terdiri dari 2 serial waktu yaitu 8 minggu dan 16 minggu. Setiap serial waktu dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok normal, kelompok dyslipidemia dan kelompok dyslipidemia dengan pemberian darapladib dengan dosis 20g. Parameter yang diukur dalam penelitian ini adalah ketebalan intima-media. Darapladib dapat menurunkan ketebalan intima-media dengan hasil yang signifikan ($p < 0.005$). Pada penelitian ini terbukti bahwa pemberian darapladib dapat menurunkan ketebalan intima-media aorta.

Kata kunci : Darapladib, Lp-PLA2, IMT, Dyslipidemia, ox-LDL

Introduction

Aterosklerosis adalah penyakit arteri berukuran besar maupun sedang yang terdiri dari arteri koroner, arteri karotis dan arteri elastistis besar yang meliputi aorta thorak dan aorta abdominal (1). Selain itu aterosklerosis ditandai oleh disfungsi endotel, inflamasi pembuluh darah, dan penumpukan dari lemak, kolesterol, kalsium, serta debris seluler di dalam intima dari dinding pembuluh darah. Penumpukan ini mengakibatkan pembentukan plak, remodeling pembuluh darah, gangguan aliran darah dan berkurangnya suplai oksigen ke target organ (2). Penyakit kardiovaskular akibat aterosklerosis merupakan penyebab utama kematian di dunia. (3). Data terakhir dari WHO (*World Health Organization*) menyebutkan 17.3 juta orang meninggal akibat penyakit jantung. WHO memprediksi jumlah penyakit jantung akan meningkat menjadi 23,6 juta orang pada tahun 2030 (4).

Dislipidemia adalah peningkatan dari kolesterol plasma, trigliserida atau keduanya atau rendahnya high-density lipoprotein level yang berkontribusi terhadap perkembangan dari aterosklerosis (5). Dislipidemia secara langsung dapat menstimulasi terjadinya disfungsi endotel. Apabila dislipidemia terjadi kronis akan menyebabkan akumulasi lipoprotein pada tempat jejas yaitu pada lokasi terjadinya disfungsi endotel (6). Akumulasi lipid menghasilkan reactive oxygen species (ROS) yang menyebabkan peningkatan permeabilitas sehingga dapat mendorong migrasi lipoprotein lebih banyak (7). LDL menjadi teroksidasi yang akan merangsang terjadinya aterosklerosis (6). Pembentukan oxLDL akan memicu respon inflamasi dan menghasilkan sitokin proinflamasi yang menyebabkan ekspresi molekul adhesi. Molekul adhesi tersebut akan menarik monosit dan limfosit T ke dalam tunika

intima. Monosit berdiferensiasi menjadi makrofag dan berikatan dengan oxLDL sehingga terbentuk sel busa.

Selanjutnya terbentuk matriks ekstraseluler dengan migrasi dan proliferasi sel otot polos yang di stimulasi oleh *platelet derived growth factor* (PDGF), *fibroblast growth factor-2* dan *transforming growth factor- β* (TGF- β) serta sintesis kolagen oleh otot polos yang menyebabkan pembentukan kerak lemak. Proses ini terus berlanjut menjadi plak fibrosa dengan pembentukan kapsul fibrosa yang membatasi lesi dengan lumen. Pada tahap ini plak aterosklerosis yang stabil berubah menjadi labil dan ruptur oleh karena oxLDL mempunyai efek sitotoksik pada sel busa makrofag dan sel otot polos yang menyebabkan terbentuknya inti nekrotik, Lp-PLA2 berperan pada toksisitas oxLDL (8). Lp-PLA2 diproduksi oleh makrofag, limfosit dan sel mast. Reseptor Lp-PLA2 ditemukan dalam oxLDL dan Lp-PLA2 akan berikatan dengan reseptornya dan menghidrolisis gugusan asil pendek dari oxLDL membentuk 2 mediator lipid yang bioaktif yaitu lysophosphatidylcholine (Lyso PC) dan asam lemak teroksidasi (oxFA) yang berperan penting dalam proses aterosklerosis (8).

Terbentuknya sejumlah sel busa pada lapisan sub-intima dan bertambahnya jumlah monosit/makrofag di intima menyebabkan penebalan adaptif dinding pembuluh arteri, yang dikenal sebagai lesi tipe 1 (lesi inisial), dan merupakan perubahan paling dini yang dapat dideteksi secara mikroskopik dan kimiawi. Selanjutnya, sel busa akan terakumulasi dan bergabung dengan sel miosit membentuk garis lemak (*fatty streak*). Lebih lanjut terjadi akumulasi lipid ekstra sel yang massif, sehingga menyebabkan penebalan dinding arteri secara nyata, disorganisasi dan deformitas dinding pembuluh darah,

hingga menimbulkan berbagai komplikasi (9).

Darapladib adalah *inhibitor* selektif *lipoprotein-terkait fosfolipase A2* (Lp-PLA2) yang sedang diselidiki potensinya untuk menstabilkan risiko tinggi plak aterosklerotik dan berpotensi mengurangi kejadian kardiovaskuler (10). Pada suatu penelitian menunjukkan bahwa *inhibitor* Lp-PLA2 dengan darapladib mencegah ekspansi inti nekrotik, penentu utama dari kerentanan plak. Temuan ini menunjukkan bahwa *inhibitor* Lp-PLA2 mungkin merupakan pendekatan terapi baru (11).

Bahan dan Metode

Darapladib

Darapladib diberikan kepada hewan coba setiap hari per oral selama 8 minggu dan 16 minggu. *High Fat Diet* diberikan pada tikus selama penelitian.

Study Group

30 Tikus Sprague-Dawley yang digunakan berbobot 150-160 gram, usia 6-7 minggu, jantan, sehat ditandai dengan pergerakan aktif, bulu dan mata bersih diperoleh dari Institut Pertanian Bogor. Tikus ini dibagi dalam 3 kelompok: kelompok normal, kelompok dyslipidemia, dan kelompok dyslipidemia yang diberikan darapladib secara oral dengan dosis 20 mg. Setiap kelompok dibagi menjadi 2 serial waktu yaitu 8 minggu dan 16 minggu.

Pengukuran Ketebalan Intima-media

Observasi dari Intima-media diawali dengan slide preparation. Jaringan di block dan di potong dan di paraffin. Setelah itu dilakukan pengecatan menggunakan hematoxylin-eosin (HE). Penelitian dimulai dengan scanning

histopatological slides menggunakan mikroskop dengan magnification 400x, dilihat dan selanjutnya diukur menggunakan *Dot Slide Microscope software OlyVia* dengan cara menarik garis tegak lurus garis terdalam tunika intima dan garis terluar tunika media. Pengukuran dilakukan pada bagian aorta sebanyak 8 kali, kemudian diambil rata-ratanya.

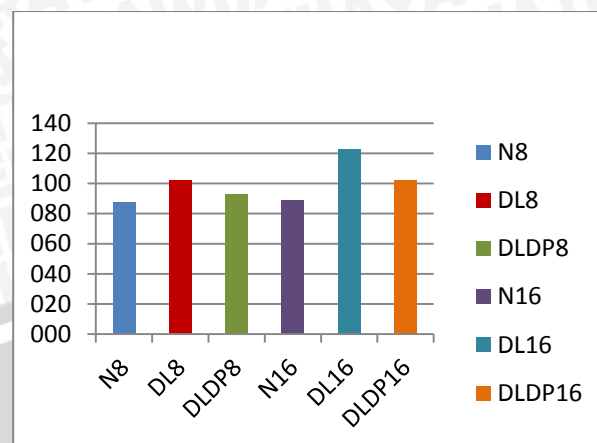
Analisis Statistik

Analisa data menggunakan Oneway ANOVA untuk menentukan efek dari darapladib terhadap ketebalan Intima-media. Selanjutnya dilakukan analisis post-hoc dengan metode Tukey untuk mendeteksi perbedaan parameter setiap kelompok perlakuan. Software SPSS, versi 16 digunakan dalam menganalisis data.

Hasil

Berdasarkan uji Oneway ANOVA diperoleh nilai $p=0.000$ ($p<0.05$). Dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan ketebalan intima-media aorta setidaknya antara dua kelompok yang berbeda. Dari table 1 dapat dilihat bahwa Darapladib dapat menurunkan rata-rata Ketebalan Intima-media tikus. Rata-rata ketebalan intima-media pada kelompok tikus Dislipidemia 8 minggu dengan pemberian Darapladib adalah sebesar 92.82 ± 2.18

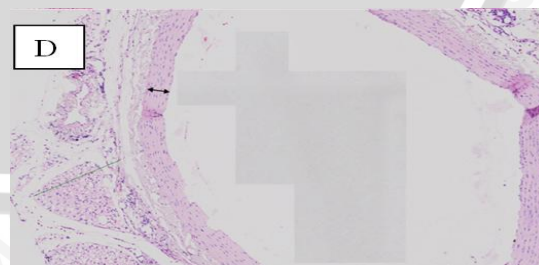
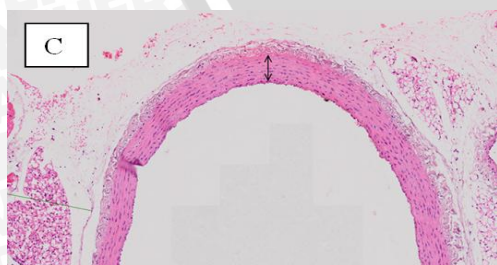
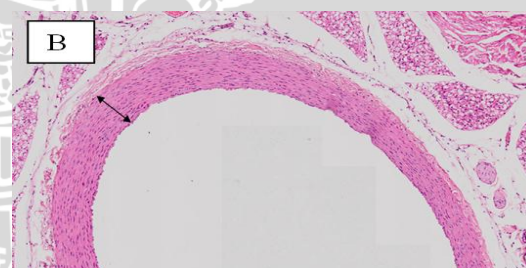
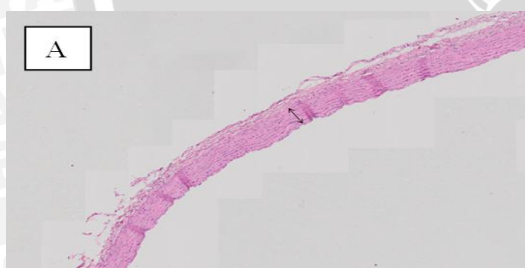
μm memiliki rata-rata Ketebalan Intima-media yang lebih rendah dibandingkan dengan rata-rata kelompok tikus Dislipidemia 8 minggu tanpa pemberian Darapladib dengan rata-rata sebesar $102.41 \pm 6.57 \mu\text{m}$. Sedangkan pada kelompok tikus Dislipidemia dengan pemberian Darapladib selama 16 minggu dengan rata-rata Ketebalan Intima-media sebesar $101.94 \pm 6.87 \mu\text{m}$ memiliki rata-rata Ketebalan Intima-media yang lebih rendah dari kelompok Dislipidemia 16 minggu tanpa pemberian Darapladib yaitu sebesar $122.47 \pm 6.53 \mu\text{m}$

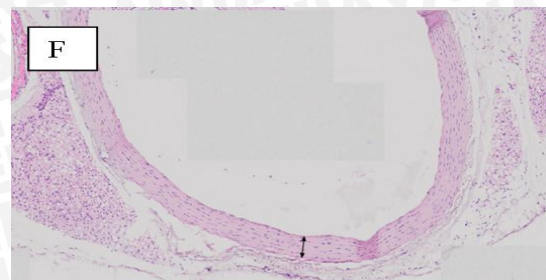
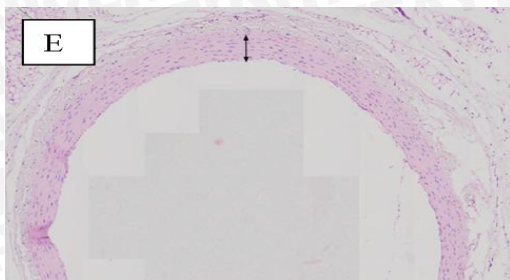


Grafik *Intima-media Thickness* tikus *Sprague Dawley*

Parameter	Kelompok						P ANOVA P<0,05
	Normal 8 minggu	Dislipidemia 8 minggu	Dislipiemia + Darapladib 8 minggu	Normal 16 minggu	Dislipidemia 16 minggu	Dislipiemia + Darapladib 16 minggu	
IMT (µm)	87.50 ± 13.21	102.41± 6.57	92.82± 2.18	88.56 ± 6.85	122.47± 6.53	101.94± 6.87	0.000

Tabel pengukuran IMT dan Analisis menggunakan ANOVA





Pembahasan

LDL rentan ter oksidasi karena hampir separuh komponen lipidnya terdiri dari asam lemak tak jenuh ganda (PUFA), yang bila bertemu dengan ROS akan membentuk LDL teroksidasi. LDL teroksidasi mudah menempel dan menumpuk pada dinding pembuluh darah dan akan direspons sebagai suatu benda asing. Sel endotel yang mengalami disfungsi akan menampilkan molekul adhesi tertentu, yang akan mengadesi lekosit, monosit dan limfosit. Permeabilitas endotel meningkat dan menjadi bersifat prokoagulan. Setelah monosit, lekosit dan limfosit melekat pada endotel, kemudian akan menembus ke dalam intima dengan bantuan *monosit chemoattractant protein-1* (MCP-1) dan *T-cell chemoattractant*. Monosit akan berdiferensiasi menjadi makrofag dan mengalami aktivasi. Makrofag teraktivasi mensekresi berbagai sitokin pro-inflamasi, kemokin (*chemoattractant cytokine*), faktor-faktor pertumbuhan, enzim proteolitik, dan enzim-enzim hidrolitik yang lain. Sel T teraktivasi juga mensekresikan sitokin yang dapat kembali menstimulasi makrofag, sel endotel dan sel otot polos, sehingga semakin memperkuat respons inflamasi. Selain itu, makrofag dan sel T juga memproduksi faktor-faktor *sitotoksik*, yang berperan dalam apoptosis. Makrofag akan menjadi sel busa yang berisi lipid in mengoksidasi lipoprotein (9).

Terbentuknya sejumlah sel busa pada lapisan sub-intima dan bertambahnya jumlah monosit/makrofag di intima menyebabkan penebalan adaptif dinding pembuluh arteri, yang dikenal sebagai lesi tipe 1 (lesi inisial), dan merupakan perubahan paling dini yang dapat dideteksi secara mikroskopik dan kimiawi. Selanjutnya, sel busa akan terakumulasi dan bergabung dengan sel mioisit membentuk garis lemak (*fatty streak*). Lebih lanjut terjadi akumulasi lipid ekstra sel yang massif, sehingga menyebabkan penebalan dinding arteri secara nyata, disorganisasi dan deformitas dinding pembuluh darah, hingga menimbulkan berbagai komplikasi (9).

Darapladib adalah *inhibitor* selektif *lipoprotein-terkait fosfolipase A2* (Lp-PLA2) yang sedang diselidiki potensinya untuk menstabilkan risiko tinggi plak aterosklerotik dan berpotensi mengurangi kejadian kardiovaskuler (10). Pada suatu penelitian menunjukkan bahwa *inhibitor* Lp-PLA2 dengan darapladib mencegah ekspansi inti nekrotik, penentu utama dari kerentanan plak. Temuan ini menunjukkan bahwa *inhibitor* Lp-PLA2 mungkin merupakan pendekatan terapi baru (11).

Profil lipid yang tikus telah diberikan High Fat Diet untuk kelompok 8 minggu dan 16 minggu menunjukkan level lipid yang signifikan untuk mengindikasikan kondisi dyslipidemia berdasarkan level LDL dan level HDL. Berdasarkan uji *Post Hoc Duncan* didapatkan bahwa tidak

terdapat perbedaan pada kelompok dislipidemia 8 minggu dan dislipidemia dengan pemberian darapladib 8 minggu hal ini menunjukkan bahwa kelompok ini masih memiliki KIM masih tinggi. Namun pada analisa deskriptif menunjukkan adanya penurunan KIM dengan pemberian terapi darapladib. Sedangkan pada kelompok normal 16, dislipidemia 16 dan dislipidemia dengan darapladib 16 didapatkan hasil yang signifikan. Hal ini menunjukkan pemberian darapladib dapat menurunkan KIM aorta.

Kesimpulan

Darapladib memiliki kemampuan untuk menghambat Lp-PLA2 yang mana mampu menurunkan ketebalan intima-media tikus Sprague-Dawley pada kondisi Dyslipidemia. Dibutuhkan penelitian lebih jauh tentang efek darapladib pada parameter lain dari aterosklerosis.

Daftar Pustaka

1. Abdelhalim, M.A.K., Al-Ayed, M.S.(2007) Effect of High Cholesterol and Saturated Fat Diet on The Aortic Wall Structure of New Zealand White Male Rabbits. Saudi Journal of Biological Sciences: 14 (2); 227-236.
2. Boudi, F.Brien., Ahsan, Chowdury H. Noncoronary atherosclerosis overview of atherosclerosis. Advanced searching: Medscape. online [www.medscape.com].April;2014. <http://emedicine.medscape.com/article/1950759-overview>. [accessed 7 Januari 2017].
3. PERKI. 2013. *Pedoman Tatalaksana Dislipidemia*.
4. World Health Organization. (2015). Cardiovascular Disease. Available from : http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/en/. Accessed September 10, 2015.
5. Goldberg, Anne Carol., *Advanced Searching:Merck Manual. Dyslipidemia*.Online [www.merckmanuals.com]. 2015.
6. Baniar, V.I.,Suwarsa, O.,Farenia R. (2015). Pengaruh Pemberian Suplementasi Asam Lipoat Alfa terhadap Profil Lipid dan Ketebalan Dinding Aorta Abdominalis pada Tikus Hiperlipidemia. Retrieved from Pustaka Ilmiah Uiversitas Padjajaran. website : <http://pustaka.unpad.ac.id/archives/133476/> diakses tanggal 1 januari 2016.
7. Wang W, Zhang J, Wu W, Li J, Ma Y, Chen W. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 ameliorates inflammation and decrease atherosclerotic plaque formation in apoE-deficient mice. Plos One. 2011; 6(8): 1-7.
8. Immanuel, Suzanna., Tjiptaningrum, Agustyas., *Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 (Lp-PLA2) sebagai Petanda Penyakit Jantung Koroner. Majalah Kedokteran Indonesia*. 2010;60(1), 32-39.6(1).
9. Nasution, Lailan Safina.(2013) Pengaruh Pemberian Likopen terhadap Perkembangan Lesi Aterosklerotik pada Tikus Hiperkolesterolemia.Retrieved from fkkumj website:[fkkumj website:fkkumj.ac.id/jurnal/main/Jurnal/Jurnal%202013/edisi_jan_2013.pdf](http://fkkumj.ac.id/jurnal/main/Jurnal/Jurnal%202013/edisi_jan_2013.pdf) diakses tanggal 1 januari 2016.
10. Berger, J.S. et al., 2011. Peripheral Artery Disease, Biomarkers, and Darapladib. *Am Heart J*, 161(5), pp.972–978.

11. Serruys, P.W. et al., 2008. Effects of the direct lipoprotein-associated phospholipase A2 inhibitor darapladib on human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation*, 118(11), pp.1172–1182.

