

POTENSI ROSUVASTATIN SEBAGAI AGEN ANTI FIBROTIK: KAJIAN IN VIVO STRUKTUR ALVEOLARIS PARU DAN JUMLAH SEL MAST TIKUS MODEL FIBROSIS

David Pakaya¹, Sarifuddin Anwar², Yuli Fitriana¹, Rais Trisiyambudi³, Dion Solli Ruruktipa³,
Muhammad Yoland Muliadi³, Farid Indra Gunawan³, dan Mohmmad Fiqri Novian Affandy³

¹Departemen Histologi Fakultas Kedokteran, Universitas Tadulako, Palu, Indonesia.

²Departemen Anatomi Fakultas Kedokteran, Universitas Tadulako, Palu, Indonesia.

³Program Studi Kedokteran, Universitas Tadulako, Palu, Indonesia.

*Corresponding author: Telp: +6281356377422, email: davidpakaya09@gmail.com

ABSTRAK

Inflamasi kronis menyebabkan terjadi proliferasi sel fibroblast dan penebalan dinding alveolus akibat deposisi kolagen. Rosuvastatin merupakan salah satu obat golongan statin diduga memiliki efek anti inflamasi sehingga dapat menjadi agen anti fibrotik. Penelitian ini bertujuan mengetahui efek rosuvastatin terhadap ketebalan septum inter alveolaris dan jumlah sel mast pada tikus model fibrosis paru. Penelitian eksperimental dengan rancangan *posttest only controlled group design*. Penelitian ini menggunakan tikus Wistar jantan, berusia 8 minggu, berat badan (BB) 200-250 gram, berjumlah 15 ekor. Tikus diberikan *amiodarone* dosis 40 mg/kgBB selama 28 hari. Tikus dibagi dalam 3 Kelompok Perlakuan; K1: kontrol normal; K2: model fibrosis; K3: model fibrosis + terapi Rosuvastatin 10mg/kgBB selama 28 hari. Dilakukan pengukuran BB secara berkala. Gambaran ketebalan septum inter alveolaris didapatkan dari pewarnaan hematoxilin eosin (HE), gambaran sel Mast didapatkan dari pewarnaan Toluidine biru pada jaringan hati tikus, dan dikuantifikasi menggunakan perangkat lunak *ImageJ*. Data dianalisis dengan *GrapPhad Prism 8.0.0* menggunakan uji non parametrik Kruskal-Wallis. Didapatkan Terapi rosuvastatin pada tikus model fibrosis paru menunjukkan perbedaan bermakna ketebalan septum inter alveolaris ($p=0,0001$) dan jumlah sel mast berbeda bermakna ($p=0,0009$). Disimpulkan bahwa Rosuvastatin mampu memperbaiki ketebalan septum inter alveolaris dan jumlah sel mast pada tikus model fibrosis paru.

Kata Kunci: Inflamasi, Fibrosis, Paru-paru, Amiodarone, Rosuvastatin.

ABSTRACT

Chronic inflammation can caused proliferation of fibroblast cells and thickening of the alveolar walls due to collagen deposition. Rosuvastatin is the statin drugs that have anti-inflammatory effects, it can be an anti-fibrotic agent. The aim of this study is to determine the effect of rosuvastatin on the interalveolar septum thickness and the number of Mast cells in pulmonary fibrosis rat model. This is an experimental research with a posttest only controlled group design. This research used 15 male Wistar rats, 8 weeks old, body weight (BW) 200-250 grams. Rats were given amiodarone dose of 40 mg/kgBW for 28 days. Rats were divided into 3 treatment groups; K1: normal control; K2: fibrosis model; K3: fibrosis model + Rosuvastatin therapy 10mg/kgBW for 28 days. BW measurements are carried out regularly. The interalveolar septum thickness was obtained from hematoxylin eosin (HE) staining, the image of Mast cells was obtained from Toluidine blue staining in rat lung tissue, and quantified using ImageJ software. Data were analyzed with GrapPhad Prism 8.0.0 using the Kruskal-Wallis non-parametric test. Rosuvastatin therapy in rat with a pulmonary fibrosis model showed a significant difference in

the interalveolar septum thickness ($p=0.0001$) and a significant difference in the number of mast cells ($p=0.0009$). In conclusion, rosuvastatin was able to increased the interalveolar septum thickness and the number of Mast cells in pulmonary fibrosis rat model.

Keywords: Inflammation, Fibrosis, Lung, Amiodarone, Rosuvastatin.

PENDAHULUAN

Fibrosis paru merupakan kondisi patologis paru dengan karakteristik adanya inflamasi kronis pada jaringan interstitial paru. Kondisi ini menyebabkan terjadi proliferasi sel fibroblast dan penebalan dinding alveolus akibat deposisi kolagen (Lederer & Martinez, 2018). Fibrosis paru dapat disebabkan diantaranya oleh penyakit kelainan jaringan ikat seperti sklerosis sistemik, pneumokoniosis (asbestosis dan silikosis), agen obat seperti amiodarone dan methotrexate serta infeksi virus.¹ Salah satu agen virus yang dapat menyebabkan fibrosis paru adalah *Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus-2* (SARS CoV-2) melalui reseptor utamanya *Angiotensin Converting Enzim-2* (ACE-2).²

Mekanisme fibrosis paru pada infeksi SARS CoV-2 belum diketahui secara pasti. Beberapa teori menjelaskan bahwa infeksi ini mengakibatkan kerusakan epitel dan pneumosit tipe II yang berakibat pada pelepasan sitokin seperti *transforming growth factor- β* (TGF- β). Fibrosis paru yang diakibatkan oleh bahan kimiawi seperti amiodarone juga terkait dengan jalur TGF- β dalam proses inflamasi kronis yang berakibat deposisi kolagen.³ Sitokin tersebut meregulasi fibrogenesis melalui proliferasi fibroblast menjadi myofibroblast yang memiliki sifat kontraktil dan kemampuan memproduksi matriks ekstraseluler.²

Myofibroblast memproduksi matriks ekstraseluler untuk menggantikan jaringan yang rusak atau cedera. Pada keadaan kerusakan berulang pada epitel paru maka terjadi gangguan proses penyembuhan luka. Hal ini menyebabkan myofibroblast menetap secara persisten dan memproduksi matriks ekstraseluler berupa kolagen secara berlebihan. Deposisi kolagen berlebihan yang

terjadi di jaringan interstitial paru berdampak pada peningkatan ketebalan septum interalveolaris, jumlah sel mast, dan jumlah leukosit.²

Septum inter alveolaris berperan sebagai *air-blood barrier* dalam proses difusi oksigen. Adanya penebalan septum inter alveolaris pada kondisi fibrosis menyebabkan penurunan kelenturan paru akibat jaringan interstitial paru menjadi lebih kaku.⁴ Kondisi ini dapat mengakibatkan hipoksemia akibat difusi oksigen dan karbondioksida tidak adekuat serta dapat menyebabkan gagal nafas.⁵

Sitokin TGF- β menjadi salah satu target terapi anti fibrosis dari jalur inflamasi. Obat-obatan golongan statin dapat menjadi agen anti fibrotik dengan cara mensupresi TGF- β melalui penghambatan protein *suppressor of mothers against decapentaplegic* (smad) 2/3 pada jalur TGF- β /Smad signaling.^{3,6} Rosuvastatin merupakan salah satu obat golongan statin atau penghambat 3-Hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) reduktase. Penghambatan HMG-KoA reduktase ini menyebabkan penurunan *non-sterol isoprenoid* dalam jalur metabolisme kolesterol.⁷ Penurunan *non-sterol isoprenoid* ini diduga memiliki efek anti inflamasi melalui pengambatan jalur *Ras homolog family member A/Rho-associated protein kinase* (RhoA/ROCK).⁸

Berdasarkan uraian diatas, peneliti tertarik untuk meneliti potensi rosuvastatin sebagai agen antifibrotik melalui kajian *in vivo*, ketebalan septum interalveolaris paru dan jumlah sel Mast tikus model fibrosis.

METODOLOGI

Sampel Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan tikus putih galur Wistar jantan, berusia 10-12 minggu, berat badan (BB) 180 - 220 gram, dan berjumlah 15 ekor. Tikus dibagi dalam 3 kelompok Perlakuan; K1: kontrol normal dengan pemberian NaCl 0,9% 3 ml/hari per oral selama 28 hari; K2: kontrol positif dengan pemberian amiodaron 40 mg/kgBB/hari per oral selama 28 hari (Fouad & Mousa, 2021); K3: kelompok perlakuan dengan pemberian amiodaron 40 mg/kgBB/hari secara per oral dan Rosuvastatin 10 mg/kgBB/hari per oral. Dilakukan pengukuran BB secara berkala pada setiap minggu sampai hari ke-28. Penelitian ini telah memperoleh izin dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Tadulako dengan nomor: 6415/UN 28.1.30/KL/2022.

Pewarnaan Histologi

Tikus diterminasi pada hari ke-28 dan dilakukan nekropsi organ paru. Paru dibuat dalam blok paraffin dan dipotong dengan ketebalan 4 μm . Pewarnaan jaringan menggunakan *Hematoksilin eosin* dan Toluidin biru. Pengamatan dilakukan pada 5 lapang pandang dipilih secara acak dan tidak tumpang tindih dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus CX23* perbesaran 40 $\times$ dan 400 $\times$ dan *numerical aperture* (NA):1,25 dengan perangkat lunak *optilab*. Hasil gambar akan dianalisis secara kuantitatif menggunakan perangkat lunak *ImageJ*.

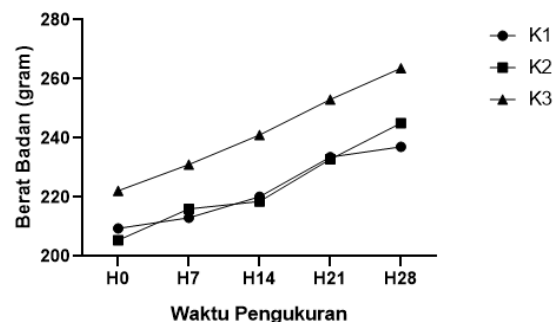
Analisis Statistik

Data histologis paru dianalisis secara kuantitatif dengan menilai ketebalan septum interalveolaris dan jumlah sel mast serta dianalisis dengan menggunakan *Grapphad Prsima 8.0.0* menggunakan uji nonparametrik *Kruskal Walis*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL

Berikut data berat badan tikus yang di bagi dalam tiga kelompok perlakuan yang dirawat hingga hari ke 28 pasca pemberian amiodarone dan terapi rosuvastatin. Data berat badan dapat dilihat pada gambar 1.

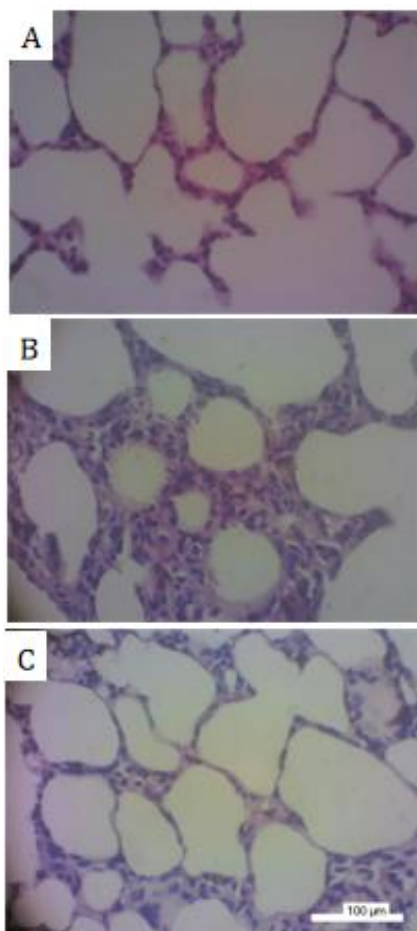


Gambar 1. Grafik rerata berat badan tikus perkelompok perlakuan.

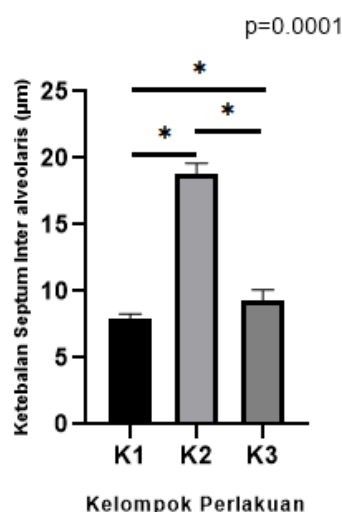
Berdasarkan gambar 1 dapat dilihat bahwa terdapat nilai berat badan awal yang berbeda pada tiap kelompok perlakuan. Berat badan pada keseluruhan kelompok tampak meningkat dengan stabil hingga akhir penelitian.

Ketebalan Septum Interalveolaris

Gambar histologi ketebalan septum interalveolaris paru dapat dilihat pada gambar 2 dan Grafik rerata ketebalan septum interalveolaris paru dapat dilihat pada gambar 3.



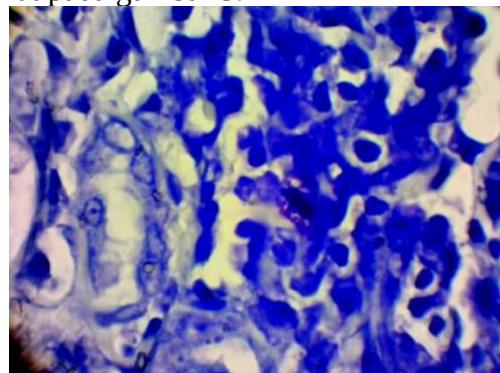
Gambar 2, Histologi septum inter alveolaris tikus model fibrosis paru dengan pewarnaan HE. Perbesaran 400x. (A) K1: kontrol normal; (B) K2: kontrol negatif (model fibrosis); (C) K3: model fibrosis + terapi Rosuvastatin 10mg/kgBB selama 28 hari.



Gambar 3. Diagram rerata ketebalan septum interalveolaris tikus model fibrosis paru.

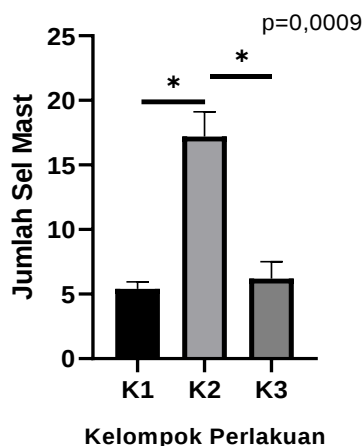
Jumlah Sel Mast

Gambar jumlah sel Mast dapat dilihat pada gambar 4 dan grafik jumlahnya dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 4, Histologi Sel Mast dengan pewarnaan Toluidine Biru. Perbesaran 1000x.

Pada pengukuran rerata ketebalan septum interalveolaris paru tikus didapatkan hasil uji statistik menggunakan *Kruskal-Wallis* menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada setiap kelompok perlakuan ($p=0,0001$). Pada kelompok K2 yaitu kelompok model fibrosis paru tanpa terapi memiliki rerata ketebalan septum interalveolaris paru paling tebal dibanding kelompok lainnya dengan rerata $18,85 \pm 0,75$ µm. Hal ini selaras dengan penelitian sebelumnya,⁹ yang menyatakan bahwa pada tikus yang diinduksi amiodarone memiliki rerata ketebalan septum interalveolaris paling tebal dibanding kelompok lainnya. Hasil serupa juga ditemukan pada penelitian lain terhadap septum interalveolaris mencit yang diinduksi amiodarone.¹⁰



Gambar 5. Diagram jumlah sel Mast tikus model fibrosis paru.

PEMBAHASAN

Amiodarone menyebabkan cedera alveolar dan menyebabkan pelepasan ROS, peroksidasi lipid dan infiltrasi sel-sel inflamasi.¹¹ Kondisi tersebut dapat menginduksi kematian sel dan mensekresi berbagai sitokin seperti TNF- α dan IL-33.¹² Sitokin TNF- α dapat mengaktifasi Angiotensin II yang selanjutnya mengaktifasi TGF- β melalui jalur smad2/3, sedangkan sitokin IL-33 akan menstimulasi sel limfosit Th-2 yang mampu mengeluarkan IL-33 untuk mengaktifasi TGF- β .¹³ Sitokin TGF- β merupakan regulator fibrogenesis dengan mentransisi fibroblast menjadi myofibroblast. Myofibroblast mengekspresikan α -SMA yang bersifat kontraktile serta dapat mensekresi matriks ekstraseluler berupa kolagen.¹⁴ Cedera persisten akibat amiodarone mengganggu re-epitelisasi dan menyebabkan deposisi kolagen berlebih pada septum interalveolar.¹⁵ Hal ini sesuai dengan penelitian lain yang menyatakan bahwa terdapat peningkatan bermakna pada kadar α -SMA pada tikus yang mengalami fibrosis paru.¹⁴

Pada uji lanjut *Mann-Whitney* terdapat perbedaan bermakna secara statistik antar kelompok K1 dan K2, K1 dan K3, serta K2 dan K3 dengan nilai $p=0,0001$. Meskipun demikian, pada kelompok K1 dan K3 hal

tersebut tidak bermakna secara klinis. Rerata ketebalan septum interalveolaris pada kelompok K3 adalah $9,31 \pm 0,79 \mu\text{m}$. Nilai ini cenderung mendekati nilai rerata ketebalan pada kelompok kontrol K1 yaitu $7,96 \pm 0,34 \mu\text{m}$. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian lain yang menemukan rerata ketebalan septum interalveolaris pada kelompok statin memiliki nilai yang cenderung mendekati kelompok kontrol.⁹ Hal ini diperkuat dengan penelitian lain yang menyatakan bahwa statin mampu menurunkan kadar α -SMA pada tikus model fibrosis paru.¹⁶

Obat golongan statin seperti rosuvastatin mampu menghambat enzim HMG-KoA reduktase yang mengubah HMG-KoA menjadi *mevalonate* pada jalur metabolisme kolesterol. Penghambatan tersebut juga menyebabkan terhambatnya senyawa-senyawa turunan dari *mevalonate* seperti senyawa RhoA yang bersifat proinflamasi dengan mengaktifasi NF κ B.¹⁷ Aktivasi NF κ B dapat menginduksi kematian sel abnormal yang menghasilkan sitokin seperti IL-33 dan berperan dalam aktivasi sel limfosit Th-2. Sel ini dapat mengubah makrofag *naive* M0 ataupun makrofag M1 yang bersifat proinflamasi menjadi makrofag M2 yang menghasilkan TGF- β .^{13,18} *Transforming growth factor- β* (TGF- β) menyebabkan transisi fibroblast menjadi myofibroblast yang bersifat kontraktile oleh adanya α -SMA.¹⁴ Myofibroblast berperan dalam mendeposisi kolagen sehingga menyebabkan fibrosis paru yang ditandai dengan penebalan septum interalveolaris.⁹

KESIMPULAN

Rosuvastatin mampu memperbaiki rerata ketebalan septum inter alveolaris dan jumlah sel mast pada tikus model fibrosis paru.

DAFTAR PUSTAKA

- Lederer, D. J., & Martinez, F. J. (2018). Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.*, 378(19):1811–1823.
- John, A. E., Joseph, C., Jenkins, G., & Tatler, A. L. (2021). COVID-19 and pulmonary fibrosis: A potential role for lung epithelial cells and fibroblasts. *Immunol Rev.*, 302(1):228–240.
- Ma, W., Shi, H., Wei, G., Hua, M., Ma, J., Cui, J., & Yu, H. (2020). Loureirin B attenuates amiodarone-induced pulmonary fibrosis by suppression of TGF β 1/Smad2/3 pathway. *Trop J Pharmacol.*, 19(7):1371–1376.
- Le, T., Hwang, W., Muralidhar, V., White, J. A., & Moore, M.S. (2017). First aid for the basic sciences : Organ systems (3rd Ed.). New York: *Mc Graw Hill Education*.
- Wijsenbeek, M., & Cottin, V. (2020). Spectrum of fibrotic lung diseases. *N Engl J Med.*, 383(10):958–968.
- Yang, T., Chen, M., & Sun, T. (2013). Simvastatin attenuates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human alveolar epithelial cells. *Cell Physiol Biochem.*, 31(6):863-74.
- Katzung, B. G. (2012). Basic and clinical pharmacology. (12th Ed.). New York: *McGraw-Hill Education*.
- Nohria, A., Prsic, A., Liu, P., Okamoto, R., Creager, M. A., Selwyn, A., *et al.*, (2009). Statin inhibit Rho Kinase activity in patients with atherosclerosis. *Atherosclerosis.*, 205(2):517-521.
- El-Mohandes, E. M., Moustafa, A. M., Khalaf, H. A., & Hassan, Y. F. (2017). The role of mast cells and macrophages in amiodarone induced pulmonary fibrosis and the possible attenuating role of atorvastatin. *Biotech Histochem.*, 92(7):467–480.
- Mahavadi, P., Henneke, I., Ruppert, C., Knudsen, L., Venkatesan, S., Liebisch, G., *et al.* (2014). Altered surfactant homeostasis and alveolar epithelial cell stress in amiodarone-induced lung fibrosis. *Toxicol scien.*, 142(1):285-297.
- Darisan, K. N., Zaini, J., & Yuniadi, Y. (2013). Amiodarone and its pulmonal toxicity. *J Kardiologi Indones.*, Vol. 34(2):113-125.
- Fang, T., Wang, M., Xiao, H., & Wei, X. (2019). Mitochondrial dysfunction and chronic lung disease. *Cell Biol Toxicol.*, 2019(35): 493-502.
- Perez, F., Ruera, C. N., Miculan, E., Carasi, P., Dubois-Camacho, K., Garbi, L., *et al.* (2020). IL-33 Alarmin and its active proinflammatory fragments are released in small intestine in celiac disease. *Front Immunol.* 11(2020):581445.
- Li, X., Shen, Y., Lu, Y., & Yang, J. (2015). Amelioration of bleomycin-induced pulmonary fibrosis of rats by aldose reductase inhibitor, epalrestat. *Korean J Physiol Pharmacol.*, 41:401-411.
- Totzke, J., Gurbani, D., Raphemot, R., Hughes, P. F., Bodoor K., Carlson, D. A., *et al.* (2017). Takinib, a selective TAK1 inhibitor, broadens the therapeutic efficacy of TNF- α inhibition for cancer and autoimmune disease. *Cell Chem Biol.*, 24(8):1029–1039.
- Santos, D.M., Pantano, L., Pronzati, G., Grasberger, P., Probst, C.K., Black, K.E., *et al.* (2020). Screening for YAP inhibitors identifies statin as modulators of fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 62(4):479-492.
- Jeong, A., Suazo, K. F., Wood, W. G., Distefano, M. D., & Li, L. (2018). Isoprenoids and protein prenylation: Implications in the pathogenesis and therapeutic intervention of alzheimer's disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 53(3):279-310.
- Pradeu, T., & Cooper, E. L. (2012). The danger theory: 20 years later. *Front Immunol.*, 3(287):1-9.