

DISERTASI

PERAN SCUBE2 MELALUI JALUR HIPOKSIA DAN STRES OKSIDATIF PADA KEJADIAN *PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION* PADA AYAM *BROILER* YANG DIPAPAR *HEAT STRESS* KRONIS

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Oleh

DJOKO LEGOWO

NIM 061617117306

**PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI SAINS VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

**PERAN SCUBE2 MELALUI JALUR HIPOKSIA DAN STRES
OKSIDATIF PADA KEJADIAN *PULMONARY ARTERIAL*
HYPERTENSION PADA AYAM *BROILER* YANG
DIPAPAR *HEAT STRESS* KRONIS**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

DISERTASI

untuk memperoleh gelar Doktor dalam
Program Studi Sains Veteriner
pada Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga Surabaya

Oleh

DJOKO LEGOWO
NIM 061617117306

**PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI SAINS VETERINER
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Disertasi berjudul :

**Peran SCUBE2 Melalui Jalur Hipoksia Dan Stres Oksidatif
Pada Kejadian *Pulmonary Arterial Hypertension* Pada Ayam Broiler
Yang Dipapar *Heat Stress* Kronis**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Doktor di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 27 Mei 2022



Djoko Legowo

NIM 061617117306

Lembar pengesahan

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI

Tanggal 27 Mei 2022

Oleh:

Promotor



Prof. Dr. Widjiati, drh., M.Si

NIP. 1962091519900220001

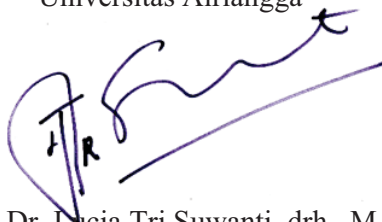
Ko-Promotor



Prof. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si

NIP. 196310021989032003

Mengetahui,
Ketua Program Studi Sains Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga



Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P

NIP. 196208281989032001

Usulan Penelitian ini telah diuji dan dinilai oleh Panitia Penguji Program Doktor
Universitas Airlangga
Pada Tanggal: 27 Mei 2022

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Sri Agus Sudjarwo, drh., Ph.D

Anggota :

1. Prof. DR. Fedik Abdul Rantam, drh
2. Prof. Dr. Aulanni'am., drh., DES.
3. Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.
4. Dr. Thomas V Widiyatno, M.Si., drh

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena berkat taufik dan hidayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Disertasi ini yang berjudul : **Peran SCUBE2 Melalui Jalur Hipoksia Dan Stres Oksidatif pada Kejadian *Pulmonary Arterial Hypertension* pada Ayam Broiler Yang Dipapar *Heat Stress Kronis*.**

Pada kesempatan ini perkenankanlah pertama-tama penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada: Prof. Dr. Muhammad Nasih, SE., MT., CMA., CA, selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya. Prof. Dr. Mirni Lamid., M.P., drh., selaku Dekan Fakultas kedokteran Hewan Universitas Airlangga, dan Prof. Dr. Lucia Tri Suwanti, drh., M.P, selaku Ketua Program Studi Sains Veteriner, atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan di Program Studi S3 Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Disertasi ini tidak mungkin dapat terwujud tanpa keterlibatan berbagai pihak yang telah banyak membantu dengan segenap dedikasinya, maka pada kesempatan ini perkenankanlah penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

Prof. Dr. Widjiati, drh., M.Si selaku promotor, dan Prof. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si selaku ko-promotor, yang dengan sepenuh hati telah memberikan dukungannya baik moril maupun materiel, serta atas segala kesabarannya telah memberikan bimbingan, arahan dan pendampingan yang sungguh-sungguh sehingga Desertasi ini dapat terselesaikan.

Ucapan terima kasih ini juga penulis sampaikan kepada segenap team penguji yaitu, Prof. Sri Agus Sudjarwo, drh., Ph.D., selaku ketua penguji, Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh., Prof. Dr. Aulanni'am., drh., DES., Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes., dan Dr. Thomas V Widiyatno, M.Si., drh., selaku anggota penguji. Kepada segenap team penguji perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya atas kesediaan waktu dan kerelaanya dalam memberikan koreksi dan sumbangsih pemikiran dengan keluasan pengetahuan yang dimiliki hingga Disertasi ini dapat terselesaikan. Pada kesempatan ini penulis juga mengucapkan terima kasih kepada seluruh Staf pengajar S3 Sains Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang telah memberikan ilmu dan kepakarannya yang sangat berharga dan menambah pemahaman penulis terhadap pengetahuan yang sangat dibutuhkan dalam menyelesaikan Disertasi ini.

Penulis juga tidak lupa menyampaikan terima kasih kepada segenap keluarga besar sejawat dosen di divisi Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes selaku kepala divisi, serta seluruh staf dosen dan karyawan. Kepada drh., Arimbi, Mkes., drh. Ajik Azmijah SU., drh., Dr. Thomas V Widiyatno, M.Si., drh., Rusno Darsono, M.Vet., drh (Alm), drh. Bilqisthi Ari Putra Msi., serta mas Jumawan, penulis mengucapkan terima kasih atas segala dukungan moril dan materiel, serta izin yang diberikan untuk menggunakan segala fasilitas yang sangat dibutuhkan dalam melaksanakan penelitian. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada drh. Septian Hakim Susantoputro, MSi., atas bantuannya dalam mengolah data statistik,

serta kepada drh. Galuh MKes., bapak Supardi, adik-adik mahasiswa yang telah membantu mulai dari penyiapan kandang hingga saat terminasi hewan coba. Kepada pihak-pihak lain yang telah membantu namun belum tersebut dalam ucapan terima kasih ini, penulis mengucapkan beribu-ribu terima kasih.

Akhirnya pada kesempatan ini perkenankanlah penulis mengucapkan rasa terima kasih dan penghormatan yang setinggi-tingginya kepada kedua orang tua, Bapak Pelda (TNI-AL) Veteran Pejuang. Muhammad Said (Alm) dan Ibu Mistinah (Alm) atas segala upayanya untuk membesarkan serta mendidik dengan penuh kasih sayang dan pengorbanan yang tidak dapat terbalaskan. Kepada istri dan anak-anak tercinta, yang tiada henti-hentinya untuk mendoakan, dan terus menerus memberikan semangat. Kepada segenap anggota keluarga besar Mbah Karnawi (Alm) yang telah mendukung dan menyemangati demi terselesaikannya penulisan Disertasi ini.

Last but not least, kepada semua pihak yang telah membantu selama proses penelitian dan penyusunan naskah Disertasi ini, namun tidak sempat disebutkan satu-persatu, penulis mengucapkan banyak terima kasih serta mendoakan semoga Allah SWT memberikan balasan yang setimpal, Amin. Besar harapan penulis semoga karya ini, meskipun hanya merupakan potongan kecil, namun dapat menjadi pelengkap untuk mengungkapkan mozaik persoalan kesehatan yang sangat luas khususnya pada permasalahan dampak perubahan iklim pada kesehatan unggas dan industri perunggasan.

Surabaya, Juli 2022
Penulis

RINGKASAN

Peran SCUBE2 Melalui Jalur Hipoksia Dan Stres Oksidatif Pada Kejadian *Pulmonary Arterial Hypertension* Pada Ayam *Broiler* Yang Dipapar *Heat Stress* Kronis

Djoko Legowo

Latar Belakang: Hipoksia dan stres oksidatif, baik sebagai faktor tunggal atau bersama-sama, merupakan penyebab cedera endotel yang utama dan dapat memicu *remodeling* pembuluh darah. SCUBE2 (*signal peptide-CUB-EGF domain-containing protein 2*), merupakan protein permukaan membrane yang banyak ditemukan pada berbagai jenis sel, termasuk sel endotel. Pada sel endotel ekspresi SCUBE2 terlihat kuat dan konsisten ditemukan pada berbagai tahapan *remodeling* pembuluh darah penderita aterosklerosis dan kanker. Hal ini telah menjadikan SCUBE2 sebagai salah satu target gen yang banyak dieksplorasi, sebagai strategi pendekatan, untuk mendapatkan hasil terapi yang optimal pada penyakit kardiovaskuler dan aterosklerosis. Hiperventilasi yang terjadi akibat paparan *heat stress* (HS) pada ayam *broiler* merupakan kejadian awal yang penting dalam memicu *remodeling* vaskuler arterial paru-paru. Hiperventilasi mengakibatkan peningkatan kecepatan aliran darah pada mikrosirkulasi, hingga memicu hipoksia, akibat waktu difusi oksigen yang singkat, serta mengakibatkan peningkatan ROS akibat tingginya tegangan aliran (*shear stress*). Paparan HS dan sifat genetik ayam *broiler* modern, merupakan dua faktor predisposisi terpenting penyebab *Pulmonary Arterial Hypertension* (PAH) atau sindroma kematian mendadak [*sudden death syndrome* (SDS)], yang banyak menimbulkan kerugian ekonomi, terutama pada sektor industri *poultry breeding* ayam ras. **Tujuan :** Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap peran SCUBE2 pada kejadian PAH pada ayam *broiler* yang dipapar HS kronis, dengan cara menganalisis aktivitas berbagai protein yang terlibat dalam proses *remodeling* vaskuler arterial dan mikrosirkulasi paru-paru baik melalui jalur pensinyalan hipoksia maupun stres oksidatif, meliputi HIF-1 α (sebagai *biomarker* untuk hipoksia), isoprostane (sebagai *biomarker* untuk stres oksidatif), p38 dan NF κ B (sebagai faktor transkripsi) serta VEGF sebagai protein target dalam proliferasi miosit dan sel endotel. **Metode:** Sebanyak 36 ekor DOC (*Day Old Chicken*) ayam *straight run broiler strain* Cobb CP 700 dipilih secara acak dari 100 ekor, kemudian dipelihara hingga umur 20 hari. Pada umur 21 hari, dengan kisaran berat badan 600-700 g, ayam dibagi dalam dua (n=18) kelompok perlakuan, masing-masing yaitu kelompok kontrol (K), dimana ayam dipelihara pada ruangan dengan suhu dan kelembaban ideal (23°C + kelembaban 55-60%), sedangkan kelompok perlakuan (P), ayam diberi paparan HS kronis (suhu 37-38°C + kelembaban 75-80%) selama delapan jam/hari. Pada umur 42 atau setelah 21 hari masa perlakuan, ayam *broiler* dikorbankan dengan cara dislokasi cervical. Sampel organ paru-paru diambil dan diawetkan pada larutan fiksatif *buffer* formalin 10%, dan selanjutnya diproses menurut metode rutin atau parafin. Slide organ setebal 5 μ m, diwarnai dengan teknik pewarnaan HE dan IHC (*immunohistochemistry*) dengan antibodi primer SCUBE2, HIF-1 α , isoprostane, p38, NF κ B dan VEGF.

Perubahan histopatologis pada arteri interparabronkus, arteriol intraparakus, kapiler udara, serta pada parenkim parabrakus paru-paru disajikan secara diskriptif. Perubahan morfologis yang menunjukkan PAH ditentukan secara kualitatif menurut cara Stenmark, *et al.*, (2009) dan derajat hipertensi yang terjadi ditentukan menurut metode Heath and Edward (dalam: Humpath, 2008) yang telah dimodifikasi. Keterlibatan berbagai protein target diamati melalui ekspresi molekul yang terjadi pada jaringan yang dinilai dalam Indeks imunoreaktif (*immunoreactive score/IRS*) menurut metode Remmele yang sudah dimodifikasi. Perbedaan derajat hipertensi dan rerata IRS diantara kelompok perlakuan dianalisis dengan uji Mann-Whitney- U. Peran SCUBE2 dianalisis berdasarkan koefisien korelasi serta koefisien pengaruh SCUBE2 dengan protein target lainnya, yang masing-masing dianalisis dengan uji Spearman's, dan uji jalur (*path analysis*) dari Sobel. **Hasil Penelitian:** Paparan HS kronis pada ayam *broiler* terbukti mengakibatkan perubahan struktur (*remodeling*) pembuluh vaskuler paru-paru (meliputi a. interparabronkus, arteriol dan kapiler udara) serta lesi-lesi lain pada parenkim paru-paru. Berdasarkan bentuknya, lesi-lesi ini menunjukkan bentuk yang khas sebagai tanda PAH, dengan kategori hipertensi berat. Perubahan pada struktur vaskuler nampak lebih menonjol dibandingkan dengan perubahan pada parenkim paru-paru. Beberapa bentuk *remodeling* yang terjadi meliputi, hipertrofi dan atau hiperplasi kompleks intima-media (*remodeling* paling dominan), diikuti dengan lesi lain seperti lesi *plexiform*, fibrosis intima konsentris, arteritis nekrotikan dan thrombus arteri. Perubahan morfologi ini terbukti diikuti dengan peningkatan IRS ekspresi berbagai protein target yang terlibat dalam *remodeling* vaskuler. Penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p<0.05$) rerata IRS ekspresi SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF pada tiga area pengamatan yang berbeda diantara kelompok perlakuan. HS kronis terbukti berkontribusi nyata mengakibatkan PAH melalui peningkatan aktivitas SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF. Secara relatif rerata IRS ekspresi SCUBE2 adalah yang paling kuat (*overexpression*) dan cenderung konstan terekspresikan pada ketiga area pengamatan yang berbeda dibandingkan dengan protein target yang lain, dengan rerata IRS adalah 9.02, 8.33 dan 8.16 masing-masing pada kapiler udara, arteriol dan a. interparabronkus. Berdasarkan area pengamatannya, rerata IRS ekspresi SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF pada kapiler udara relatif lebih tinggi dibandingkan pada a. Interparabronkus dan arteriol, kecuali untuk VEGF yang lebih kuat diekspresikan pada arteriol dibandingkan pada area lainnya. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa nilai rerata IRS ekspresi HIF-1 α (yang digunakan sebagai *biomarker* untuk hipoksia), relatif lebih tinggi dibandingkan dengan isoprostane (yang digunakan sebagai *biomarker* untuk stres oksidatif), pada ketiga area pengamatan yang berbeda. Hasil uji korelasi Spearman's menunjukkan bahwa korelasi antara SCUBE2 dengan protein target lainnya adalah tidak konsisten pada area pengamatan yang berbeda. Pada arteri Interparabrokus rerata IRS ekspresi SCUBE2 terbukti nyata ($p<0.05$) berkorelasi positif dengan HIF-1 α , p38, dan VEGF, namun tidak dengan isoprostane dan NFKB. Pada arteriol, rerata IRS ekspresi SCUBE2 berkorelasi nyata ($p<0.05$) dengan HIF-1 α , isoprostane dan NFKB, namun tidak dengan p38 dan VEGF. Sementara itu pada kapiler udara

paru-paru, rerata IRS ekspresi SCUBE2 nampak nyata ($p < 0.05$) berkorelasi positif dengan semua protein target. Pada arteriol dan kapiler udara, nilai rerata IRS ekspresi SCUBE2 nampak lebih kuat dan cenderung konsisten berhubungan dengan IRS isoprostane dibandingkan dengan HIF-1 α . Pada arteriol dan kapiler koefisien korelasi antara rerata IRS ekspresi SCUBE2 dengan isoprostane, masing-masing adalah 0.57 dan 0.484, yang relatif lebih kuat dibandingkan koefisien korelasi antara SCUBE2 dengan HIF-1 α . Hal ini mengindikasikan adanya keterlibatan yang lebih kuat isoprostane dalam proses *remodeling* pembuluh darah paru-paru pada ayam *broiler* yang dipapar HS kronis, dibandingkan dengan HIF-1 α , atau dapat dikatakan bahwa proses *remodeling* pembuluh darah tersebut lebih kuat terjadi melalui jalur pensinyalan stres oksidatif dibandingkan dengan jalur hipoksia. Berdasarkan hasil uji Sobel diketahui bahwa, SCUBE2 secara signifikan ($p < 0.05$) mempengaruhi secara langsung aktivitas VEGF dengan koefisien pengaruh (β) sebesar 0.510, sementara itu, baik HIF-1 α , dan isoprostane, tidak terbukti secara langsung mempengaruhi peningkatan aktivitas VEGF. Bersama-sama dengan HIF-1 α dan isoprostane, melalui mekanisme yang melibatkan aktivitas p38 dan NF κ B, terbukti bahwa koefisien pengaruh (β) SCUBE2 terhadap aktivitas VEGF turun menjadi 0.492. Sementara itu, secara simultan, diketahui bahwa SCUBE2 bersama-sama dengan HIF-1 α dan isoprostane melalui mekanisme yang melibatkan p38 dan NF κ B mempengaruhi aktivitas VEGF dengan koefisien determinasi sebesar 20.6%, atau dengan kata lain terdapat 79.4% variabel lain yang tidak diteliti dalam penelitian ini, yang terlibat dalam peningkatan aktivitas VEGF. Berdasarkan hasil analisis terhadap koefisien korelasi (ρ) dan koefisien pengaruh (β) antara variabel eksogen (SCUBE2, HIF-1 α dan isoprostane), dan variabel endogen (p38, NF κ B dan VEGF), diperoleh fakta bahwa terdapat korelasi yang nyata ($p < 0.05$) serta koefisien hubungan yang lebih kuat antara SCUBE2 dengan isoprostane, dibandingkan dengan antara SCUBE2 dengan HIF-1 α . **Kesimpulan** : Paparan HS kronis dapat mengakibatkan PAH pada ayam *broiler* yang ditandai dengan terjadinya *remodeling* vaskuler arterial paru-paru. *Remodeling* vaskuler yang terjadi terbukti berhubungan dengan peningkatan ekspresi SCUBE2, HIF-1 α , isoprostane, p38, NF κ B dan VEGF. Peran SCUBE2 dalam mempengaruhi aktivitas VEGF yang kemudian memicu *remodeling* pembuluh darah arterial paru-paru pada ayam *broiler* yang dipapar HS kronis, lebih kuat terjadi melalui jalur pensinyalan stres oksidatif dibandingkan dengan jalur hipoksia.

SUMMARY

The Role of SCUBE2 Through Hypoxia And Oxidative Stress Pathway in The Incidence of Pulmonary Arterial Hypertension of Chronic Heat Stress Exposed of Broilers Chicken

Djoko Legowo

Background: Hypoxia and oxidative stress, either as a single factor or together, are the main causes of endothelial injury and can trigger vascular remodeling. SCUBE2 (signal peptide-CUB-EGF domain-containing protein 2), is a membrane surface protein found in many types of cells, including endothelial cells. In endothelial cells, SCUBE2 expression was strong and consistently found at various stages of blood vessel remodeling in atherosclerosis and cancer patients. This has made SCUBE2 one of the most explored gene targets, as a strategic approach, to obtain optimal therapeutic outcomes in cardiovascular disease and atherosclerosis. Hyperventilation that occurs due to exposure to heat stress (HS) in broiler chickens is an important initial event that triggers remodeling of the pulmonary vasculature. Hyperventilation results in an increase in blood flow velocity in the microcirculation, thereby triggering hypoxia, due to the short period of time for oxygen diffusion into erythrocytes in the alveoli, as well as an increase in ROS due to shear stress. Exposure to HS and genetic characteristics of modern broilers are the two most important predisposing factors for Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) or sudden death syndrome (SDS), which causes a lot of economic losses, especially in the poultry breeding industry. **Objective:** This study aimed to reveal the role of SCUBE2 in the incidence of PAH in broiler chickens exposed to chronic HS by analyzing the activities of various proteins involved in arterial vascular and lung microcirculation remodeling through both hypoxic and oxidative stress signaling pathways, including HIF-1 α (as a biomarker for hypoxia), isoprostane (as a biomarker for oxidative stress), p38 and NF κ B (as a transcription factor) and VEGF as a target protein in myocyte and endothelial cell proliferation. **Methods:** A total of 36 DOC (Day Old Chicken) straight run broiler strain Cobb CP 700 were randomly selected from 100 chickens, then reared for 20 days. At the age of 21 days, with a body weight range of 600-700 g, the chickens were divided into two (n=18) treatment groups, each namely the control group (K), where the chickens were kept in a room with ideal temperature and humidity (23°C + humidity 55-60%), while the treatment group (P), chickens were exposed to chronic HS (temperature 37-38°C + humidity 75-80%) for eight hours/day. At the age of 42 or after 21 days of treatment, broiler chickens were sacrificed by cervical dislocation. Samples of lung organs were taken and preserved in 10% formalin buffer fixative solution, and then processed according to routine or paraffin methods. Organ slides, 5 μ m thick, were stained with HE and IHC (immunohistochemistry) staining techniques with primary antibodies SCUBE2, HIF-1 α , isoprostane, p38, NF κ B and VEGF. Histopathological changes in the interparabronchial arteries, intraparbonychial arterioles, air capillaries, as well as in the parabronchial parenchyma of the lungs are descriptively presented. Morphological changes

indicating PAH were determined qualitatively according to the method of Stenmark, et al., (2009) and the degree of hypertension that occurred was determined according to the modified Heath and Edward method (in: Humpath, 2008). The involvement of various target proteins was observed through the expression of the molecules occurring in the tissue which were assessed in the immunoreactive score (IRS) according to the modified Remmele method. Differences in the degree of hypertension and the mean IRS between the treatment groups were analyzed by the Mann-Whitney-U test. The role of SCUBE2 was analyzed based on the correlation coefficient and the coefficient of influence of SCUBE2 with other target proteins, each of which was analyzed by Spearman's test, and path analysis of Sobel. **Research Results:** Chronic HS exposure in broilers has been shown to result in structural changes (remodeling) of the pulmonary vascular vessels (including the interparabronchial arteries, arterioles and air capillaries) as well as other lesions in the lung parenchyma. Based on their shape, these lesions show a characteristic shape as a sign of PAH, with the category of severe hypertension. Changes in the vascular structure appear more prominent than changes in the lung parenchyma. Several forms of remodeling that occur include, hypertrophy and/or hyperplasia of the intima-media complex (the most dominant remodeling), followed by other lesions such as plexiform lesions, concentric intimal fibrosis, necrotizing arteritis and arterial thrombus. These morphological changes were shown to be accompanied by increased IRS expression of various target proteins involved in vascular remodeling. This study showed significant differences ($p<0.05$) in the mean IRS expression of SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NF κ B, and VEGF in the three different observation areas between the treatment groups. Chronic HS has been shown to significantly contribute to PAH through increased activity of SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NF κ B, and VEGF. In relative terms, the IRS expression of SCUBE2 was the strongest (overexpression) and tended to be constantly expressed in the three different observation areas compared to other target proteins, with the mean IRS being 9.02, 8.33 and 8.16, respectively, in air capillaries, arterioles and a. interparabronchus. Based on the observation area, the mean IRS expression of SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NF κ B, and VEGF in air capillaries was relatively higher than in a. Interparabronchus and arterioles, except for VEGF which is more strongly expressed in arterioles than in other areas. The results of this study also showed that the mean IRS value of HIF-1 α expression (which was used as a biomarker for hypoxia), was relatively higher than that of isoprostane (which was used as a biomarker for oxidative stress), in the three different observation areas. The results of the Spearman's correlation test showed that the correlation between SCUBE2 and other target proteins was inconsistent in different observation areas. In the Interparabroccal artery the mean IRS expression of SCUBE2 was shown to be significantly ($p<0.05$) positively correlated with HIF-1 α , p38, and VEGF, but not with isoprostane and NF κ B. In arterioles, the mean IRS expression of SCUBE2 was significantly correlated ($p<0.05$) with HIF-1 α , isoprostane and NF κ B, but not with p38 and VEGF. Meanwhile in the pulmonary capillaries, the mean IRS expression of SCUBE2 was significantly ($p<0.05$) positively correlated with all target proteins. In arterioles and air capillaries, the mean IRS expression of

SCUBE2 appears to be stronger and tends to be consistently associated with IRS isoprostane compared to HIF-1 α . In arterioles and capillaries the correlation coefficient between the mean IRS expression of SCUBE2 and isoprostane was 0.57 and 0.484, respectively, which was relatively stronger than the correlation coefficient between SCUBE2 and HIF-1 α . This indicates a stronger involvement of isoprostane in the pulmonary vascular remodeling process in broiler chickens exposed to chronic HS, compared to HIF-1 α , or it can be said that the vascular remodeling process occurs more strongly through oxidative stress signaling pathways compared to HIF-1 α hypoxic pathway. Based on the results of the Sobel test, it was found that SCUBE2 significantly ($p < 0.05$) directly affected VEGF activity with a coefficient of effect (β) of 0.510, meanwhile, both HIF-1 α , and isoprostane, were not shown to directly affect the increase in VEGF activity. Together with HIF-1 α and isoprostane, through a mechanism involving p38 and NF κ B activity, it was proven that the coefficient of influence (β) of SCUBE2 on VEGF activity decreased to 0.492. Meanwhile, simultaneously, it is known that SCUBE2 together with HIF-1 α and isoprostane through a mechanism involving p38 and NF κ B affect VEGF activity with a coefficient of determination of 20.6%, or in other words there are 79.4% of other variables not examined in this study, which is involved in increasing VEGF activity. Based on the results of the analysis of the correlation coefficient (ρ) and the coefficient of influence (β) between exogenous variables (SCUBE2, HIF-1 α and isoprostane), and endogenous variables (p38, NF κ B and VEGF), it was shown a significant correlation ($p < 0.05$)) and a stronger correlation coefficient between SCUBE2 and isoprostane, compared to between SCUBE2 and HIF-1 α . **Conclusion :** Chronic HS exposure can cause PAH in broiler chickens which is characterized by pulmonary arterial vascular remodeling. Vascular remodeling has been shown to be associated with increased expression of SCUBE2, HIF-1 α , isoprostane, p38, NF κ B and VEGF. The role of SCUBE2 in influencing VEGF activity which then triggers pulmonary arterial vascular remodeling in broiler chickens exposed to chronic HS, was more strongly via the oxidative stress signaling pathway than the hypoxic pathway

ABSTRACT

The Role of SCUBE2 Through Hypoxia And Oxidative Stress Pathway In The Incidence Of Pulmonary Arterial Hypertension of Chronic Heat Stress Exposed of Broiler Chickens

Djoko Legowo

The purpose of this study was to determine the role of SCUBE2 in pulmonary arterial hypertension (PAH) through hypoxia and oxidative stress pathways in chronic heat stress exposed broiler chickens. A total of 36 straight run broiler chickens of Cobb CP 700 strain, 21 days old, body weight range of 600-700 g were divided into two (n=18) treatment groups. The control group (K) of chickens was placed in a room with ideal temperature and humidity (23°C + humidity 55-60%), and the treatment group (P) was exposed to chronic heat stress (HS) (temperature 37-38°C + humidity 75-80%) eight hours/day for 21 days. At the age of 42 days, the experimental animals were terminated and the lung organ samples were observed using HE staining for histopathological changes and IHC staining techniques for the expression of SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NF κ B, and VEGF. The results showed that chronic HS exposure had resulted in the occurrence of PAH with a severe degree in broiler chickens. Hypertrophy and or hyperplasia of the intimal-medial complex were the common lesion that occurred in interparabronchial arteries, arterioles, and air capillaries. There were several other forms of vascular remodeling that occurred with a lower percentage including plexiform lesions, concentric intimal fibrosis, necrotizing arteritis, and arterial thrombus. These morphological changes were shown related to significantly difference ($p < 0.05$) the IRS mean level of SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NF κ B, and VEGF between treatment groups. The results of the Spearman's correlation test, and the Sobel path analysis showed that SCUBE2 significantly ($p < 0.05$) directly affected VEGF activity with a coefficient of effect (β) of 0.510, meanwhile, both HIF-1 α , and isoprostane, were not shown to directly affect the increase in VEGF activity. Simultaneously, it is known that SCUBE2 together with HIF-1 α and isoprostane through a mechanism involving p38 and NF κ B affect VEGF activity with a coefficient of determination of 20.6%. **Conclusion:** The role of SCUBE2 in influencing VEGF activity which then triggers pulmonary arterial vascular remodeling in broiler chickens exposed to chronic HS, was more strongly via the oxidative stress signaling pathway than the hypoxic pathway.

Keyword : *Broiler Chickens, Chronic heat stress, vascular remodeling, PAH, SCUBE2*

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL DALAM.....	i
PRASYARAT GELAR.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
PERSETUJUAN	iv
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xii
ABSTRACT	xv
DAFTAR ISI.....	xvi
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxiv
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xxv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
Latar belakang penelitian.....	1
Rumusan permasalahan	7
Tujuan penelitian	8
.....	Umum 8
.....	Khusus 9
Manfaat penelitian	10
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
Sistem pernafasan unggas	11
Anatomi dan fisiologi sistem pernafasan pada ayam.....	12
Sistem peredaran darah paru-paru unggas	22
<i>Pulmonary arterial hypertension (PAH) dan bentuk remodeling</i>	
pembuluh darah paru-paru pada ayam <i>broiler</i>	25

Patogenesis PAH pada ayam <i>broiler</i>	30
<i>Heat stress</i> (HS).....	36
Dampak HS terhadap gangguan DAFTAR ISI thermoregulasi dan performa unggas.....	36
Patofisiologi stres oksidatif pada unggas terpapar HS.....	41
<i>Hypoxia-inducible factor -1alpha</i> (HIF-1 α)	45
<i>Signal Peptide, CUB Domain, EGF-Like Protein2</i> (SCUBE2).....	49
<i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF).....	54
Ekspresi VEGF pada jaringan hipoksia.....	59
p38 <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>	61
NF- κ B	63
(<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)	
Isoprostane.....	66
 BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	69
Kerangka konseptual	69
Hipotesis	70
 BAB 4 MATERI DAN METODE	73
Jenis dan rancangan penelitian	73
Sampel (unit eksperimen), besar sampel dan teknik pengambilan sampel	73
Sampel	73
Besar sampel dan teknik pengambilan sampel	74
Variabel penelitian.....	75
Variabel bebas	75
Variabel tergantung	75
Variabel kendali.....	75
Definisi operasional variabel.....	75
Variabel bebas	75
Variabel tergantung.....	76
Bahan penelitian	77
Instrumen penelitian	78
Tempat dan waktu penelitian.....	79
Prosedur pengambilan dan pengumpulan data	79
Persiapan hewan coba	79
Pelaksanaan penelitian	80
Teknik Pengambilan data	80
Cara pengolahan dan analisis data	83
Bagan kerangka operasional.....	85
 BAB 5 HASIL PENELITIAN	86
Perubahan histopatologi vaskuler paru-paru dan derajat hipertensi pada ayam <i>broiler</i> setelah mendapat paparan <i>heat stress</i> kronis.....	86
Perubahan histopatologi dan karakteristik <i>remodeling</i> pembuluh darah arterial paru-paru ayam <i>broiler</i> setelah mendapat paparan <i>heat stress</i> kronis.....	86
Perbandingan derajat hipertensi arterial paru (pulmonary	

arterial hypertension atau PAH) diantara kelompok perlakuan	91
Perbandingan <i>immunoreactive score</i> (IRS) ekspresi scube2, HIF-1 α , isoprostane, p38, NF κ B, dan VEGF pada area vaskuler yang berbeda pada paru-paru ayam broiler diantara kelompok perlakuan	93
Perbandingan IRS ekspresi SCUBE2, HIF-1 α , isoprostane, p38, NF κ B, dan VEGF pada arteri interparabronkus diantara kelompok perlakuan	93
5.2.2. Perbandingan IRS ekspresi SCUBE2, HIF-1 α , isoprostane, p38, NF κ B, dan VEGF pada arteriol diantara kelompok perlakuan	96
5.2.3 Perbandingan IRS ekspresi SCUBE2, HIF-1 α , isoprostane, p38, NF κ B, dan VEGF pada kapiler udara diantara kelompok perlakuan	98
Peran SCUBE2 pada kejadian <i>pulmonary arterial hypertension</i> (PAH) ayam <i>broiler</i> yang terpapar <i>heat stress</i> kronis melalui jalur hipoksia dan stres oksidatif.....	102
Hubungan antara SCUBE2 dengan HIF-1 α , Isoprostane, p38, NF κ B, dan VEGF pada <i>remodeling</i> vaskuler paru-paru ayam <i>broiler</i> yang terpapar HS kronis.....	102
Pengaruh SCUBE2 terhadap <i>remodeling</i> vaskuler arterial paru-paru ayam <i>broiler</i> yang terpapar HS kronis.....	105
BAB 6 PEMBAHASAN	108
Pengaruh HS kronis terhadap <i>remodeling</i> vaskuler paru-paru dan kejadian PAH pada ayam <i>broiler</i>	108
Peran SCUBE2 pada <i>remodeling</i> vaskuler paru-paru dan kejadian PAH pada ayam broiler yang terpapar HS kronis	109
Temuan Baru Penelitian	115
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	119
Kesimpulan	119
Saran.....	120
DAFTAR PUSTAKA	121
LAMPIRAN.....	130

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Beberapa metode thermoregulasi pada unggas	40
Gambaran umum perubahan tingkah laku ayam dewasa yang terpapar suhu lingkungan yang berbeda.....	42
Jenis-jenis dan fungsi VEGF	58
Jenis Lesi histopatologis pada area pengamatan yang berbeda	81
Metode Skoring <i>Immunoreactive Score</i> (IRS) Remmele.....	83
Perbandingan Frekuensi Kejadian (%) Berbagai Bentuk Perubahan Histopatologi Paru-Paru Ayam <i>Broiler</i> Diantara Kelompok Perlakuan.....	89
Rerata skor $\pm$ simpangan baku (SD) dan hasil uji statistik derajat hipertensi paru diantara kelompok perlakuan	91
Rerata <i>Immunoreactive Score</i> (IRS) $\pm$ Simpangan Baku (SD) Ekspresi SCUBE2, HIF-1 α Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF Pada Arteri Interparabronkus Diantara Kelompok	93
Rerata <i>Immunoreactive Score</i> (IRS) $\pm$ Simpangan Baku (SD) Ekspresi SCUBE2, HIF1, Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF Pada Arteriol Diantara Kelompok Perlakuan.....	96
Rerata <i>Immunoreactive Score</i> (IRS) $\pm$ Simpangan Baku (SD) Ekspresi SCUBE2, HIF1, Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF Pada Kapiler Udara Diantara Kelompok Perlakuan	98
Koefisien Korelasi (ρ) dan Signifikasi Hubungan Diantara Variabel (SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF) Pada Arteri Interparabronkus Paru-Paru Ayam <i>Broiler</i> Yang Mendapat Paparan HS Kronis.....	103
Koefisien korelasi (ρ) dan signifikasi hubungan diantara variabel (p38, SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF) Pada Arteriol paru-paru ayam broiler yang mendapat paparan HS kronis.....	103
Koefisien korelasi (ρ) dan signifikasi hubungan diantara variabel (SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF) pada kapiler Udara paru-paru ayam broiler yang mendapat paparan HS kronis	103

Koefisien jalur pengaruh langsung, tidak langsung dan pengaruh total Ekspresi SCUBE2, HIF-1 α , dan Isoprostane, terhadap VEGF pada kapiler udara paru-paru ayam <i>broiler</i> yang mendapat paparan HS kronis	106
Koefisien determinasi (Rsquare) pengaruh antar variabel	106

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Model umum transport oksigen pada golongan vertebrata	12
Struktur anatomi sistem pernapasan pada unggas	14
Foto rongga hidung kanan ayam tampak lateral	15
A. Potongan melintang rongga hidung ayam	
B. Folikel limfoid longgar pada <i>concha nasalis medial</i>	
C. NALT pada celah <i>choanal</i>	
D. NALT pada septum hidung	16
Saluran pernafasan bagian atas ayam dewasa	17
1. Paru-paru kiri pada golongan unggas, tampak lateral	18
2. Gambar skematik saluran udara dari <i>trachea</i> hingga <i>bronchus</i> sekunder	18
2.8. Preparat lateks paru-paru dan kantung udara unggas domestik	
<i>Gallus gallus variant domesticus</i>	20
A. Saluran udara tampak medial paru-paru ayam domestik	
B. Gambar transparan saluran udara paru-paru ayam	21
Jalur aliran udara pada sistem pernapasan unggas fase inspirasi dan ekspirasi	22
Hilus paru-paru kanan ayam (tampak ventral)	23
Gambar skematik parabronchus	24
Suplai darah pada parabrochus ayam	24
Percabangan arteri <i>pulmonalis</i> pada bagian <i>parabronchus</i>	25
Menunjukkan berbagai bentuk lesi pada pembuluh darah pada pasein penderita PAH	28
Foto dari paru-paru ayam broiler umur tujuh hari menunjukkan lesi <i>pleksiform</i> yang belum	29
Skema pola aliran darah dan aliran udara pada parabronkial paru-paru unggas	33
Skema patogenesis <i>remodeling</i> pembuluh vaskuler pada paru-paru unggas penderita PAH	34
Pengaruh suhu lingkungan terhadap cara menghilangkan panas tubuh dan persentase kehilangan panas pada ungags	40
Dampak paparan suhu lingkungan terhadap suhu tubuh dan rerata respirasi/menit pada ayam <i>broiler</i> terpapar HS	41

Rantai transpor elektron pada mitokondria dan patofisiologi stres oksidatif akibat stres panas	44
Tampak depan struktur kompleks protein HIF-1 α	48
Structure HIF-1 α alpha C terminal transactivation domain	48
Struktur domain SCUBE2 manusia.....	50
Perbandingan ekspresi mRNA SCUBE2 pada arteri. <i>Carotis</i> tikus model <i>ischemia</i> pada waktu yang berbeda.....	53
Aktivasi Faktor transkripsi pada jalur sinyal Hh.....	52
<i>Cleave alternative splicing</i> gen VEGF	58
Berbagai tipe VEGF dan reseptornya.....	59
Perbandingan ekspresi CD68 pada parenkim paru-paru tikus model Hipoksia yang diinjeksi dengan HMF	60
Jalur sinyal interaktif p38- <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> MAPK.....	62
Diagram skematik dari struktur protein NF- κ B	64
Mekanisme aksi NF- κ B.....	65
Mekanisme pembentukan Isoprostane (F2-IsoPs) non-siklooksigenase dari asam arakidonat.....	67
Bagan rancangan penelitian	73
Model diagram jalur hubungan antar variabel	84
Perbedaan gambaran histopatologi pada parabronkus paru-paru ayam <i>broiler</i> diantara kelompok perlakuan	87
Berbagai bentuk <i>remodeling</i> vaskuler arterial paru-paru ayam <i>broiler</i> setelah terpapar HS kronis.....	88
Histogram frekuensi kejadian (%) berbagai bentuk <i>remodeling</i> vaskuler pada area pembuluh darah berbeda dan parenkim paru-paru	90
Boxplot Skor Derajat Hipertensi Paru Diantara Kelompok Perlakuan	91
Berbagai bentuk remodeling arteriol yang menjadi penentu derajat keparahan hipertensi arterial	92
Histogram perbandingan rerata <i>Immunoreactive Score</i> (IRS)ekspresi berbagai variabel pada arteri interparabronkus diantara kelompok perlakuan	94
Boxplot rerata rank ekspresi dari SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF pada arteri Interparabronkus diantara kelompok perlakuan	94
Perbandingan ekspresi berbagai variabel pada arteri interparabronkus	

diantara kelompok perlakuan	95
Perbandingan ekspresi berbagai variabel pada arteriol diantara kelompok perlakuan	96
Histogram perbandingan rerata <i>immunoreactive score</i> (IRS) ekspresi berbagai variabel pada arteriol diantara kelompok perlakuan.....	97
Boxplot rerata rank ekspresi SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF pada arteriol diantara kelompok perlakuan.....	97
Perbandingan ekspresi berbagai variabel pada kapiler udara diantara kelompok perlakuan yang	98
Histogram perbandingan rerata IRS ekspresi berbagai variabel pada kapiler udara diantara kelompok perlakuan.....	99
Boxplot rerata rank ekspresi dari SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF pada Kapiler Udara diantara kelompok perlakuan	99
Perbandingan Rerata IRS SCUBE2, HIF-1 α , Isoprostane, p38, NFKB, dan VEGF Diantara Kelompok Perlakuan Pada Area Pengamatan yang Berbeda.....	100
Koefisien korelasi (ρ) dan koefisien jalur (β) hubungan diantara variabel	105

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Keterangan Kelaikan Etik (ethical clearance)	131
2. Prosedur Histopatologi: dari pengambilan sampel jaringan hingga evaluasi histopatologis	132
3. Tabel nilai Z	133
4. Hasil pemeriksaan histopatologi	
Frekuensi Kejadian Lesi Histopatologis Pada Area Pengamatan Berbeda diantara Kelompok Kontrol (K) dan Perlakuan (P)	134
Hasil skoring derajat hipertensi	135
Hasil skoring IHC	137
5. Hasil uji statistic	144
Hasil uji Mann-Whitney derajat hipertensi	145
Hasil uji Mann-Whitney rerata IRS Ekspresi SCUBE2, HIF-1 α , p38, NFKB, isoprostane dan VEGF pada a. interparabronkus, arteriol, dan kapiler udara diantara kelompok perlakuan	145
Hasil Uji Korelasi Spearmans diantara kelompok Perlakuan	153
Hasil Uji Regresi diantara kelompok perlakuan	157
Hasil Uji Transformasi data Ordinal ke Interval	158
Scatterplot	159

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

Ci	= <i>Cubitus interruptus</i>
ET	= <i>Endothelin 1</i>
GLI-1	= <i>Glioma Associated Oncogene I-1</i>
HIF-1 α	= <i>hipoksia inducible factor-1α</i>
Hh	= <i>Hedgehog</i>
HRE	= <i>Hypoxia Response Element</i>
HS	= <i>Heat Strees</i>
HUVECs	= <i>Human Umlical Endothelial Cells</i>
HVP	= <i>Hipertensi Vena Pulmonalis</i>
iPAH	= <i>Arterial Hypertension Idiopathic</i>
NF- κ B	= <i>Nuclear Factor Kappalight-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i>
SDS	= <i>Sudden Death Syndrome</i>
PAH	= <i>Pulmonary Arterial Hypertension</i>
Patche-1 (PTCH-1)	= <i>Protein Patched Homolog 1</i>
PH	= <i>Pulmonary Hypertension</i>
PHD	= <i>Prolyl Hydroxylase Domain-Containing Protein</i>
PAP	= <i>Pulmonary Arterial Pressure</i>
PVC	= <i>Pulmonary Vascular Capacity</i>
PVOD	= <i>Pulmonary Veno-Occlusive</i>
PVR	= <i>Pulmonary Vascular Resistence</i>
p38	= <i>p38 mitogen activated protein kinases (MAPKs)</i>
Rac1	= <i>Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1</i>
ROS	= <i>Reactice Oxygen Species</i>
RNS	= <i>Reactice Nitrogen Species</i>
RNT	= <i>Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>
SCUBE2	= <i>Signal peptide CUB domain EGF (Epidermal growth factor)-like protein2</i>
SMO	= <i>Smoothened</i>
STAT3	= <i>Signal Transducer And Activator Of Transcription 3</i>
TP	= <i>prostanoid TP receptor atau thromboxane receptor</i>
VEGF	= <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>