

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit kardiovaskular adalah penyebab utama kematian secara global. Organisasi Kesehatan Dunia (*World Health Organization*) memperkirakan 17,9 juta jiwa meninggal akibat penyakit kardiovaskular. Tiga kelompok manifestasi penyakit kardiovaskular tertinggi adalah penyakit jantung koroner, stroke, dan penyakit arteri perifer (WHO, 2018).

Prosedur pembuatan pintas atau *bypass* maupun penggantian pembuluh darah menggunakan *graft* adalah salah satu pilihan tindakan yang memiliki nilai terapeutik yang tinggi untuk kelainan koroner. Selain itu pembuatan pintas dengan *graft* juga memiliki nilai terapeutik yang tinggi pada penyakit arteri perifer. Di Amerika Serikat pintas arteri koroner merupakan prosedur yang paling sering dikerjakan, diperkirakan 200.000 kasus dan insidensi 62 per 100.000 penduduk di negara-negara Eropa Barat (Melly dkk., 2018).

Pada operasi *bypass* koroner diperlukan bahan pembuluh darah yang berfungsi sebagai konduit atau *graft*, guna mengalirkan darah melewati daerah pembuluh darah koroner yang mengalami pembuntuan. *Graft* autolog untuk pembuatan pintas arteri koroner (CABG) seperti arteri radialis, arteri mamaria interna dan vena safena magna merepresentasikan standar baku emas untuk *graft* pembuluh darah berdiameter kecil. Penelitian yang dilakukan Fiore dkk, menyatakan bahwa arteri mamaria interna paten beberapa tahun postoperatif (patensi 10 tahun >90%) karena fakta bahwa <4% arteri mamaria interna terbentuk atherosklerosis, dan hanya 1% yang terbentuk stenosis yang dinilai

signifikan terhadap gangguan hemodinamik. (Fiore dkk, 1990). Sementara vena safena magna, 10 tahun setelah CABG mencapai 50%-60% patensi (Bourassa dkk, 1985). Sayangnya pembuluh darah tersebut tidak selalu berada dalam kondisi yang baik pada pasien yang akan menjalani operasi *bypass* koroner disebabkan menderita penyakit vena insufisiensi atau aterosklerotik yang kebanyakan disebabkan karena penyakit endokrin dan metabolik seperti diabetes melitus. Selain itu proses mendapatkan bahan *graft* tersebut memerlukan prosedur pengambilan (*harvesting*) yang invasif, dan terkadang diameter *graft* tidak sesuai (Pashneh-Tala Samand dkk., 2015). Keterbatasan dari bahan konduit tersebut menyebabkan berbagai upaya dilakukan untuk mencari alternatif sumber bahan *graft* atau konduit lain selain bahan autolog. Bahan konduit atau *graft* yang berasal dari bahan *xenograft* maupun sintetis telah dilakukan sebagai bahan *graft* alternatif. Material sintetis seperti *polyethylene terephthalate* (PET) dan *expanded polytetrafluoroethylene* (ePTFE) menunjukkan keberhasilan ketika digunakan sebagai pengganti *graft* berukuran sedang-besar (diameter >6 mm) (Catto V dkk, 2013). Namun, ketika digunakan sebagai *graft* berukuran kecil atau <6 mm, patensi *graft* sintetis dilaporkan memiliki tingkat patensi yang rendah (XU dkk., 2017). Seperti yang dilaporkan patensi PTFE dalam 1 tahun hanya mencapai sekitar 60% dan menurun hingga 32% pada tahun kedua ketika digunakan sebagai bahan *graft* prosedur *coronary artery bypass graft* (CABG) (Pashneh-Tala Samand dkk., 2015).

Semakin kecil diameter maka semakin rendah aliran darah dan semakin tinggi tahanan intralumennya. Kondisi tersebut meningkatkan resiko beberapa komplikasi yakni, aneurisma, hiperplasia intimal, kalsifikasi, trombosis dan

infeksi. Komplikasi tersebut juga dihubungkan dengan regenerasi dari non-fungsional lapisan endotel dan ketidakcocokan antara karakteristik mekanikal dari *graft* dan pembuluh darah *host*. Jika dibandingkan dengan *graft* autolog, *graft* sintetik cenderung memiliki *compliance* yang lebih rendah atau sekitar seperlima *graft* autolog (Catto V dkk, 2013). *Graft* pembuluh darah yang ideal diharapkan memiliki kekuatan dan ketahanan mekanik jangka panjang terhadap beban hemodinamik, non-toksik, non-imunogenik, memiliki biokompatibel yang menyerupai *graft* autolog, tersedia dalam berbagai ukuran, dapat dijahit dan mudah digunakan oleh dokter bedah, trombogenik yang rendah saat diuji secara *in vivo*, resiko infeksi yang rendah, dapat ditolerir oleh *host* dan dapat bertumbuh ketika digunakan pada pasien pediatri (Chlupac J dkk, 2009).

Guna memenuhi harapan untuk ditemukannya sumber *graft* diameter kecil untuk prosedur pintas arteri koroner dengan karakteristik sebaik *graft* autolog, Weinberg dan Bell pada tahun 1986, mencoba untuk menerapkan konsep rekayasa jaringan (*tissue engineering*) pada sebuah media *non-viable* (tidak hidup), yakni *mesh* Dacron. Konsep rekayasa jaringan sendiri yakni diawali dengan isolasi sel dari suatu sumber (sumber alogenis, xenogenik, atau autologus), kemudian diperluas dalam sistem kultur sel atau bioreaktor (ekspansi *in vitro*) dan sel-sel yang diperluas ini kemudian dikombinasikan ke dalam matriks/pembawa yang kemudian memberikan dukungan struktural bersama dengan penambahan media yang tepat (kaya nutrisi dan faktor pertumbuhan) (Vasita & Katti, 2006).

Percobaan Weinberg dan Bell dengan *mesh* Dacron, diawali dengan melakukan kultur terhadap *stem cell* yang berasal dari sel endotel sapi, sel otot polos, dan fibroblast tersebut ditanamkan atau *seeding* pada lapisan kolagen yang

didukung oleh *mesh* Dacron untuk nantinya dapat menjadi lapisan endotel sehingga menyerupai *graft* autolog dengan sel-sel yang *viable*. Adapun pembentukan lapisan ini akan tercapai bila sel-sel tersebut terpapar dengan cukup protein pemicu diferensiasi dan pertumbuhan yang mana pada studi *in vivo*, protein-protein tersebut akan diperoleh dari aliran darah yang melewati *Scaffold*. Namun, dari hasil studi-studi ikutannya, hasil rekayasa jaringan dengan media *mesh* Dacron (studi *in vivo*) tidak menunjukkan hasil yang memuaskan (masih tingginya kejadian trombosis, hiperplasia pada hewan coba). Muncul dugaan bahwa *stem cell* yang telah ditanamkan tergerus oleh aliran darah berakibat *stem cell* tidak menempel dengan baik. Selain itu, *mesh* Dacron atau *Scaffold* bahan sintetik tidak memiliki fibronectin yang berperan untuk menjaga agar *stem cell* tetap menempel di permukaan *Scaffold* (Thottappillil, 2015).

Dengan semakin bertambahnya pemahaman mengenai *bio-engineering* dan relevansi *extracellular matrix* (ECM) pembuluh darah pada regenerasi jaringan pembuluh darah serta keberhasilannya pada studi-studi *in vivo*, maka telah mengarahkan pada sumber alternatif material *Scaffold*. *Graft* alogenik atau xenogenik yang dideselularisasi memiliki kemampuan menjaga integritas ECM dengan respon inflamasi yang minimal (Thottappillil, 2015). *Graft* arteri mesentrika *bovine* dilaporkan memiliki kelebihan berupa *compliance* anastomosis yang baik karena elastisitas dari pembuluh darahnya sehingga risiko hiperplasia intima yang rendah serta tingkat patensi yang dilaporkan mencapai 100% pada hari ke-35 terbukti melalui uji *tensile strength* (Lin dkk, 2018). *Graft tissue engineering* sejauh ini yang menyerupai *graft* autolog dengan berbagai detailnya. Kelemahan dari *graft* xenogenik deselularisasi ini adalah biayanya lebih tinggi

dibandingkan dengan *graft* sintesis. Dengan demikian, *graft* jenis ini belum banyak digunakan di klinik (Kumar dkk., 2011).

Hemokompatibilitas merupakan salah satu kriteria mayor yang harus dimiliki oleh material yang memiliki kontak erat dengan darah. Hemokompatibilitas yang baik menjamin tidak terjadinya hemolisis (rusaknya sel darah merah yang membawa oksigen) dan kecenderungan yang rendah untuk mengikat agen koagulasi dan molekul yang berkaitan dengan aktivasi komplement, yang dapat mengaktifkan respon imun saat digunakan secara *in vivo*. Berdasarkan acuan dari *International Organization of Standardization* (ISO,2000), terdapat lima kategori yang dievaluasi, yakni trombogenitas, koagulasi, platelet, hematologi dan imunologi. Berdasarkan pembagian ISO, *graft* pembuluh darah masuk ke dalam kategori *implant devices*. Pengujian hemokompatibilitas dilaporkan lebih baik dikerjakan secara *in vitro*, dikarenakan lebih mudah untuk melakukan kontrol terhadap aliran darah, faktor koagulasi dan faktor pengganggu lainnya. Analisa *in vitro* dapat dikerjakan dengan metode inkubasi atau dengan metode *shear stress*. Analisa hemokompatibilitas akan diperoleh informasi mengenai perubahan eritrosit, leukosit dan platelet; pembentukan produk koagulasi pada plasma; deposisi protein dan sel pada permukaan material (Weber M dkk., 2018).

Kegagalan *graft* pembuluh darah hingga saat ini masih dihubungkan dengan kejadian trombus akibat kerusakan lapisan endotel pada lumen *graft* pembuluh darah. Patensi 5 tahun ePTFE dilaporkan sekitar 40-50% pada *bypass* arteri popliteal proksimal dan patensi 3 tahun mencapai 20% ketika digunakan pada *bypass* infrapopliteal. Rendahnya *compliance* (karakteristik mekanikal) *graft*

sintetik dibandingkan *graft* autolog dan sedikitnya regenerasi sel endotel intralumen *graft* sintetik tersebut dianggap menjadi faktor signifikan yang berkontribusi terhadap kejadian trombosis. Kondisi tersebut menjadi dasar penanaman *stem cell* pada *graft* yang dikultur pada media *in vitro* sebelum nantinya diaplikasikan secara *in vivo*. Pada *graft* yang telah dilakukan *seeding stem cell* diharapkan mampu berdiferensiasi menjadi sel endotel. Arteri mesentrika *bovine* yang dideselularisasi tadi akan berperan sebagai cetakan dari *stem cell* yang akan berdiferensiasi menjadi lapisan endotel intraluminal atau yang selanjutnya dikenal dengan istilah *tissue-engineered vascular graft* (TEVG) (Pashneh-Tala S dkk, 2016).

Lapisan endotel memiliki peran krusial pada hemokompatibilitas pembuluh darah. Terapi berbasis *stem cell* dan rekayasa jaringan kini menjadi salah satu terobosan pada penyakit kardiovaskular. *Stem cell* memiliki karakteristik berupa *self-renewabilty*, *clonogenecity*, dan *plasticity* (kapasitas berdiferensiasi). *Endothelial Progenitor Cells* (EPCs) dan *Mesenchymal stem cells* (MSC) pada studi TEVG sebagai sumber angiogenik telah banyak dipelajari. Jika dibandingkan dengan EPC, MSC memiliki patensi diferensiasi menjadi *Endothelial Cell* (EC) yang lebih rendah, namun dapat berdiferensiasi menjadi *Smooth Muscle Cells* (SMC). MSC diperkirakan memiliki kualitas antitrombogenik, yang berpotensi untuk digunakan dalam TEVG *in vivo* (Melero-Martin dkk., 2008; Pashneh-Tala Samand dkk., 2015). La dkk melaporkan penggunaan MSC yang berasal dari *bone marrow* ditemukan bahwa MSC yang ditanamkan pada nanofibrous *vascular graft* menunjukkan tanda anti-trombogenik

baik secara *in vitro* maupun 60 hari pasca *in vivo* pada tikus (Ladik, 2018; Fedikadik, 2015).

Patensi dari TEVG bergantung pada keberhasilan proses kultur dan penanaman *stem cell* pada *Scaffold*. Salah satu faktor yang dinilai dalam menentukan patensi sebuah TEVG adalah keberadaan sel endotel yang tumbuh pada *Scaffold* yang telah dilakukan *seeding* dengan MSC dan/atau EPC dengan melakukan pengecatan imunohistokimia untuk vWF dan SM α -aktin (Zhang, 2006). Wurmser dkk di tahun 2004 menyatakan beberapa marker yang signifikan untuk endotel pembuluh darah seperti *vascular endothelial (VE) cadherin*, *von Willebrand factor (vWf)*, *isolectin GS-IB4* (lectin), CD 31, melalui *fluorescence imaging* dan *polymerase chain reaction (PCR)* (Wurmser dkk., 2004). Peran sel endotel pada permukaan lumen pembuluh darah penting, namun sel endotel tidak dapat berdiri sendiri. Matriks ekstraseluler (elastin, kolagen, fibronectin) mempunyai peran dalam proses fisiologis sel endotel yaitu pada proses adhesi dan proliferasi sel endotel itu sendiri dalam kultur sel. Selain itu, *graft* harus mengandung cukup kolagen sesuai tipenya dan protein untuk mencapai tingkat viskoelastisitas yang diharapkan. Matriks ekstraseluler (elastin, kolagen, fibronectin) mempunyai peran dalam proses fisiologis sel endotel yaitu pada proses adhesi dan proliferasi sel endotel itu sendiri dalam kultur sel (Chlupac et al, 2014).

Tissue Engineered Vascular Graft (TEVG) harus mampu menghasilkan *nitric oxide*. *Nitric oxide* merupakan molekul protektif penting dalam vaskular. Endothelial *Nitric oxide Synthase* (eNOS) berperan penting dalam produksi *nitric oxide* oleh pembuluh darah. Endothelial *Nitric oxide Synthase* adalah enzim yang

diekspresikan secara konstitutif yang memodulasi sebagian besar fungsi endotel dan diekspresikan di seluruh endotelium arteri dari arteri yang besar hingga arteri berukuran kecil dan tidak diekspresikan kapiler (Wei Qiao dkk, 2010).

Sifat viskoelastisitas pada TEVG harus diuji untuk melihat kekuatan *graft* bertahan pada kondisi dinamik aliran darah dan mendapatkan *compliance* yang paling optimal. Uji kekuatan mekanik yang pernah dilaporkan antara lain *burst test*, *tensile test*, *stress strain relation*, *pressure diameter relation test*, *flow impedance*, dan *suture retention test* (Ku & Han, 2006). Salah satu uji yang paling sering digunakan untuk menilai kemampuan biomekanik pembuluh darah buatan adalah dengan pengukuran *burst pressure*. *Burst pressure* paling baik diukur dengan metode pengukuran langsung, namun dapat juga dihitung dengan menggunakan rumus Barlow untuk *burst pressure* pada tabung silinder (Geelhoed dkk., 2019)

Berdasarkan latar belakang tersebut, dimana *graft* autolog prosedur pintas arteri koroner (CABG) yang ideal seperti vena safena magna dan arteri mamaria interna memiliki keterbatasan berupa jumlahnya yang terbatas dan membutuhkan metode *invasive* dalam prosedur pengambilannya, serta *graft* berupa material sintetik seperti PET dan ePTFE menunjukkan angka keberhasilan yang kurang pada *graft* <6 mm, sehingga diperlukan penemuan sumber *graft* autolog lainnya yang memenuhi standar. Salah satu *graft* pembuluh darah yang direkomendasikan adalah tissue-engineered *vascular graft* untuk menghasilkan *graft* autolog yang memiliki *compliance* serta elastisitas yang baik dan resiko hiperplasi intima yang rendah serta dapat menghasilkan tingkat patensi yang tinggi. Untuk itu maka peneliti merasa perlu untuk membuat studi lebih lanjut yang membandingkan

pembentukan *graft* pembuluh darah yang telah dideselerisasi (*acellular*) yang telah dilakukan *seeding* dengan EPC dan MSC. Arteri mesenterika *bovine* yang dilakukan *harvesting* dapat dideselerisasi dengan metode berbasis deterjen sehingga menghasilkan *acellular vascular graft*. Berbagai penelitian yang kebanyakan belum menggunakan *seeding* EPC dan lebih sering dengan *Endothelial Cells* (ECs) namun belum ada yang melakukan *seeding* pada arteri mesenterika *bovine* (Pashneh-Tala S dkk, 2016).

Penelitian ini diharapkan memberikan temuan ilmu baru tentang penggunaan arteri mesenterika *bovine* sebagai prototipe dan sebagai tahap awal dari penemuan *graft* pembuluh darah berdiameter kecil alternatif untuk prosedur pintas arteri coroner (CABG) dengan kualitas mendekati *graft* autolog dengan menggunakan konsep rekayasa jaringan dan menjadi terobosan yang cukup baru untuk diteliti yaitu *seeding* dengan menggunakan EPC untuk endotelialisasi, sehingga melalui hasil penelitian ini yakni dengan pengaplikasian rekayasa jaringan pada materi *Scaffold* organik diharapkan mampu meningkatkan kualitas *graft* yang selama ini sulit diperoleh dari *graft* sintetik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan hal-hal tersebut di atas, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah *Scaffold graft* pembuluh darah dari arteri mesenterika *bovine* yang *diseeding Endothelial Progenitor Cell* (EPC) memiliki prognostik potensi yang lebih baik dibandingkan dengan *acellular vascular graft* pembuluh darah arteri mesenterika *bovine* yang tidak

dilakukan *seeding* dengan *stem cell*, ditinjau dari pemeriksaan imunohistokimia yang mengukur ekspresi eNos, elastin, kolagen tipe 1, kolagen tipe 4, dan pemeriksaan biomekanikal uji *tensile strength*, *modulus elastisitas Young* serta *calculated burst pressure* pembuluh darah?

2. Apakah *Scaffold graft* pembuluh darah dari arteri mesenterika *bovine* yang *diseeding Mesenchymal Stem cell* (MSC) memiliki prognostik potensi yang lebih baik dibandingkan dengan *acellular vascular graft* pembuluh darah arteri mesenterika *bovine* yang tidak dilakukan *seeding* dengan *stem cell*, ditinjau dari pemeriksaan imunohistokimia yang mengukur ekspresi eNos, elastin, kolagen tipe 1, kolagen tipe 4, dan pemeriksaan biomekanikal uji *tensile strength*, *modulus elastisitas Young* serta *calculated burst pressure* pembuluh darah?
3. Apakah *Scaffold graft* pembuluh darah dari arteri mesenterika *bovine* yang *diseeding Endothelial Progenitor Cell* (EPC) memiliki prognostik potensi yang lebih baik dibandingkan *Scaffold graft* pembuluh darah dari arteri mesenterika *bovine* yang *diseeding Mesenchymal Stem cell* (MSC), ditinjau dari pemeriksaan imunohistokimia yang mengukur ekspresi eNos, elastin, kolagen tipe 1, kolagen tipe 4, dan pemeriksaan biomekanikal uji *tensile strength*, *modulus elastisitas Young* serta *calculated burst pressure* pembuluh darah?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menjelaskan potensi dari *graft* pembuluh darah berdiameter kecil (<6 mm) dari *graft* arteri mesenterika *bovine* yang tidak *diseeding stem cell (acellular)*, *graft* arteri mesenterika *bovine* yang dilakukan *seeding Endothelial Progenitor Cell (EPC)* dan *graft* arteri mesenterika *bovine* yang dilakukan *seeding Mesenchymal Stem cell (MSC)*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisa perbedaan *Scaffold graft* pembuluh darah dari arteri mesenterika *bovine* yang dilakukan *seeding Endothelial Progenitor Cell (EPC)* dengan *graft* arteri mesenterika *bovine* yang tidak *diseeding stem cell (acellular)*, ditinjau dari pemeriksaan imunohistokimia yang mengukur ekspresi eNos, elastin, kolagen tipe 1, kolagen tipe 4, dan pemeriksaan biomekanikal uji *tensile strength, modulus elastisitas Young* serta *calculated burst pressure* pembuluh darah.
2. Menganalisa perbedaan *Scaffold graft* pembuluh darah dari arteri mesenterika *bovine* yang dilakukan *seeding Mesenchymal Stem cell (MSC)* dengan *graft* arteri mesenterika *bovine* yang tidak *diseeding stem cell (acellular)*, ditinjau dari pemeriksaan imunohistokimia yang mengukur ekspresi eNos, elastin, kolagen tipe 1, kolagen tipe 4, dan pemeriksaan biomekanikal uji *tensile strength, modulus elastisitas Young* serta *calculated burst pressure* pembuluh darah.

3. Menganalisa perbedaan *Scaffold graft* pembuluh darah dari arteri mesenterika *bovine* yang dilakukan *seeding Endothelial Progenitor Cell* (EPC) dengan *graft* arteri mesenterika *bovine* yang dilakukan *seeding Mesenchymal Stem cell* (MSC), ditinjau dari pemeriksaan imunohistokimia yang mengukur ekspresi eNos, elastin, kolagen tipe 1, kolagen tipe 4, dan pemeriksaan biomekanikal uji *tensile strength*, *modulus elastisitas Young* serta *calculated burst pressure* pembuluh darah.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Pengembangan Ilmu

Bila tujuan penelitian tercapai, maka akan memberi informasi ilmiah tentang perbedaan potensi penambahan *Endothelial Progenitor Cell* (EPC) dan *Mesenchymal Stem cell* (MSC) terhadap kualitas *graft* vaskular diameter kecil pada proses pengembangan pembuatan *graft* atau pengganti pembuluh darah diameter kecil.

1.4.2 Manfaat Terapan

Bila tujuan penelitian tercapai, maka akan memberi informasi dasar pengembangan pembuatan *graft* atau pengganti pembuluh darah diameter kecil.