

## **PERUBAHAN SUBSELULER SEL KONDROID NUKLEUS PULPOSUS PADA DEGENERASI DISKUS INTERVERTEBRALIS**

Komang Agung Irianto S.

**Promotor :** Prof., Dr.Djoko Roeshadi,dr.,SpOT.,FICS  
INTERVERTEBRAL; ADAPTATION  
KKA KK Dis K 01/12 Kom p  
Copyright© 2012 by Airlangga University Library Surabaya

### **ABSTRACT**

#### **Sub cellular Changes in Chondroid Cells of Nucleus Pulposus in Degenerative Intervertebral Disc**

**Komang Agung Irianto S**

**Back ground:** Degenerated intervertebral disc (IVD) has always been considered as the major cause of low back pain. These were aberrant cell-mediated response to progressive structural failure, combined with accelerated or advanced signs of aging. Eighty percent of the population ever experiencing such back pain once in the life time. The pathogenesis itself is remained unclear; intriguing to find out the starting point where the disc structures started to decrease the ability to resist the load. While these notochord-origin chondroid IVD cells lessen into 1% of population and mostly were forming clusters. Understanding the sub cellular changes would guide the right management of degenerative disc disease. **Objective:** the aim of this study is to show the sub cellular changes of chondroid cells in the degenerative disc.

**Method:** Fifty one discus specimens sampled from MED (Micro Endoscopic Discectomy) of Herniation Disc patients and two child discus specimens from scoliosis patients were looked into proportional of chondroid cell clustering. Immunohistochemistry evaluated for protein expressions of HSP70, CD68, Caspase-3, Collagen I and Collagen II. Data analyzed statistic with Paired t-test and Wilcoxon Sign Rank Test, and Pearson correlation test ( $p \leq 0.05$ ).

**Results:** Chondroid cell clustering was significantly higher than the single cells in degenerative disc. There was strong correlation of HSP70, CD68, Caspase-3, and Collagen II in chondroid cell cluster, but not for Collagen I. There was strong correlation of CD68 and Caspase-3 in cell cluster ( $p \leq 0,05$ ,  $r = 0,734$ )

**Conclusion:** The subcellular changes in IVD cell clustering showed adaptation and regeneration process by the expression of HSP70, CD68, and persist Collagen II. The Caspase-3 and Collagen I expressions showed degeneration process. The strong correlation of CD68 and Caspase-3 expressed equilibrium of adapting and apoptotic process.

**Key words:** Intervertebralis Disc,, CD68, Caspase3, Adaptation

**ABSTRAK**  
**Perubahan Subseluler Sel Kondroid Nukleus Pulposus**  
**pada Degenerasi Diskus Intervertebralis**  
**Komang Agung Irianto S**

**Latar Belakang Masalah:** Degenerasi diskus intervertebralis (DIV) selalu dianggap penyebab utama dari nyeri tulang belakang. Sekali dalam seumur hidupnya 80% orang pernah mengalaminya. Penanganan konservatif dan operatif belum memberikan hasil yang memuaskan. Proses degenerasi DIV merupakan perubahan struktur dan fungsi akibat perubahan sel kondroid di dalam diskus sebagai respon terhadap akselerasi beban progresif yang berlangsung terus menerus. Pada DIV degenerasi, sel kondroid yang berasal dari notokord hanya tersisa 1% dan banyak membentuk struktur klaster. Proses terjadinya perubahan subseluler dari sel kondroid ini belum jelas mekanismenya. Dengan memahami proses perubahan subseluler diskus degenerasi, diharapkan konsep penanganan nyeri tulang belakang akan lebih terarah sesuai dengan patologinya.

**Tujuan penelitian:** Menjelaskan perubahan subseluler sel kondroid nukleus pulposus pada degenerasi diskus intervertebralis.

**Bahan dan Metoda :** Lima puluh satu spesimen diskus dari bahan operasi penderita HNP dengan *Micro Endoscopy Discectomy* (MED) dan dua specimen diskus anak dengan scoliosis, dilakukan pemeriksaan Histopatologi untuk menilai jumlah struktur klaster sel kondroid dan Immunohistokimia untuk ekspresi HSP70, CD68, *Caspase-3*, Kolagen I dan Kolagen II. Analisis statistik menggunakan Uji t berpasangan dan *Wilcoxon Sign Rank Test* untuk uji beda dan Uji *Pearson* untuk analisis korelasi ( $p \leq 0,05$ ).

**Hasil Penelitian :** Sel kondroid NP berstruktur klaster mengekspresikan HSP70, CD68, *Caspase3*, dan Kolagen II secara bermakna ( $p \leq 0,05$ ), sedangkan Kolagen I tidak. Terdapat hubungan yang kuat antara ekspresi CD68 dengan *Caspase-3* pada sel berstruktur klaster ( $p \leq 0,05$ ,  $r = 0,734$ ).

**Kesimpulan:** Pada penderita degenerasi DIV terjadi perubahan subseluler pada sel kondroid klaster yang menunjukkan adanya kemampuan beradaptasi dan beregenerasi. Kemampuan ini ditunjukkan oleh ekspresi HSP70, CD68, dan Kolagen II. Sedangkan ekspresi *Caspase-3* dan Kolagen I menunjukkan sel kondroid menuju proses degenerasi. Adanya hubungan ekspresi *Caspase-3* dan CD68 menunjukkan keseimbangan adaptasi dan apoptosis.

**Kata kunci:** diskus intervertebral, sel kondroid, CD68, *Caspase3*, proses adaptasi.

RINGKASAN

Herniasi diskus intervertebralis (DIV) yang paling banyak dikaitkan dengan nyeri tulang belakang, cenderung untuk dibuang saat tindakan operasi karena dianggap sudah degenerasi. Kenyataannya angka kekambuhan operasi berkisar 28%, bahkan 15% memerlukan operasi ulangan karena nyeri semakin hebat. Penanganan yang hanya bersifat simptomatis saja tanpa didasarkan pada perubahan struktur biologi dan biokimia sel yang terjadi pada *Nucleus*

*Polposus* (NP) disebabkan belum jelasnya masalah mekanisme proses transformasi subseluler pada degenerasi DIV.

Proses degenerasi DIV sampai sekarang belum seluruhnya jelas; sesungguhnya keseluruhan proses tersebut telah dimulai sejak janin 35 minggu. Proses dimulai dengan berkurangnya vaskularisasi pada *end plate*, dan sel notokord berkurang hingga menghilang pada awal usia pertumbuhan. Sel kondroid pada NP yang secara embriologis berasal dari sel notokord, pada perkembangan selanjutnya mengalami perubahan fenotip dan morfologi. Sel notokord beradaptasi terhadap keadaan keseimbangan baru menjadi sel kondroid yang lebih kecil, kehilangan vakuola pada sitoplasma dan cenderung mengelompok membentuk klaster.

Perubahan bentuk sel diduga ada kaitan dengan penyesuaian terhadap lingkungan mikro. Sel kondroid pada DIV telah terbiasa dalam keadaan hipovaskular, hiponutrisi dan hiperosmotik mempunyai mekanisme pertahanan diri melalui signal-signal sel dan matriks subseluler yang ada. Sifat dan keadaan unik ini disebabkan tidak adanya vaskular sehingga reaksi radang yang memicu kerusakan jaringan menjadi terbatas, kemampuan pemulihan juga lambat dan terbatas.

Proses perubahan subseluler membentuk struktur klaster belum sepenuhnya dapat dijelaskan. Pembentukan struktur klaster pada proses degenerasi merupakan proses menuju kematian segera (apoptosis), ataukah berubah sifat, beradaptasi menjadi menyerupai sifat sel lain (mengekspresikan CD68 seperti sifat fibroblast) untuk menghasilkan matriks yang lebih sesuai.

Penelitian ini bertujuan untuk mengungkap perubahan subseluler sel kondroid NP penderita HNP pada degenerasi DIV. Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian observasional dengan rancangan *cross sectional* dengan menggunakan jaringan DIV penderita HNP. Masing masing spesimen dilakukan pemeriksaan jumlah sel kondroid yang membentuk struktur klaster (pulasan H&E), yang mengekspresikan HSP70 (petanda adaptasi), CD 68 (petanda fagosit atau fibroblas), *Caspase-3* (petanda apoptosis), Kolagen I dan Kolagen II melalui metoda imunohistokimia. Untuk CD68 dan *Caspase-3* dilakukan pulasan ganda melihat kedua ekspresi tersebut bersamaan dalam satu sediaan sehingga tergambarkan keadaan sel yang akan apoptosis dan sel yang telah berubah sifat menjadi mengekspresikan CD68.

Penelitian ini telah mendapat persetujuan Komisi Etik Penelitian LPPM UNAIR. Hasil penelitian dianalisis secara statistik deskriptif dan analitik dengan Uji t-berpasangan dan *Wilcoxon Sign Rank test* untuk uji beda dan Uji *Pearson* untuk analisis korelasi ( $p \leq 0,05$ ,  $r=0.734$ )

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada sel klaster terdapat dua macam ekspresi yaitu *Caspase-3* (eksekutor apoptosis) dan CD68 (petanda fagosit dan fibroblast), sedangkan sel tunggal tidak menunjukkan ekspresi ganda. Ekspresi HSP70 lebih banyak pada sel berstruktur klaster menunjukkan kecenderungan terjadinya proses adaptasi dengan membentuk klaster. Ekspresi Kolagen II pada sel klaster lebih banyak daripada kolagen I menunjukkan matriks ekstraseluler yang masih sesuai untuk diskus. Pada DIV anak dengan *scoliosis* yang diamati, hampir tidak tampak sel berstruktur klaster, sebagian besar mengekspresikan *Caspase-3* dan tidak terdapat sel mengekspresikan CD68. Karenanya pendapat bahwa ekspresi CD68 pada sel chondroid dewasa merupakan respons fagosit terhadap adanya ekspresi *Caspase-3* tidak tepat. Fenotip sel tersebut lebih menyerupai fibroblast daripada fagosit.



Kesimpulan penelitian ini adalah, bahwa tidak semua sel kondroid menyusun klaster akan menjadi apoptosis seperti yang diperkirakan dalam proses degenerasi selama ini. Terdapat peluang 76,47% sel beradaptasi, sedangkan kemampuan regenerasi pada sel berstruktur klaster sebesar 71%. Kenyataan ini menunjukkan sel kondroid NP mempunyai kemampuan beradaptasi dan regenerasi tidak hanya degenerasi yang mengarah pada penuaan dan kematian.

Temuan baru mengenai kemampuan DIV yang beradaptasi dan regenerasi akan mengubah pandangan bahwa tindakan pembedahan yang ekstensif membuang bagian diskus yang mengalami herniasi merupakan tindakan yang berlebihan. Seleksi penderita serta teknik pembedahan dengan tujuan mengembalikan fungsi DIV melalui pendekatan Mekano-Bio-Kimia merupakan pilihan prosedur penanganan penderita HNP pada degenerasi DIV.

### SUMMARY

Degeneration of the intervertebral disc (IVD) which is defined as a process characterized by a cascade of cellular, biochemical, structural and functional changes; remains strongly impacted as a cause of low back pain. Referring to the fact that 80% adult will, at sometime in their lives, have back pain that impairs activity, render a significant socioeconomics loss. Current treatment strategies for disc degeneration typically address the symptoms without really treating the underlying cause or restoring mechanical function.

In cases which surgical intervention is warranted; either open surgery or using endoscopic splitting the muscle instead of cutting; are tending to do resection of the herniated portion in understanding that the degenerated IVD was useless, dying, and source of the pain. The recurrent cases afterward are 28 %, and 15 % needing another surgery. Therefore, there is a strong need of therapies that both alleviate painful symptoms and restore disc structure and mechanical function by directly addressing the underlying biological causes of disc degeneration. The process of the degeneration has started as early as 35 weeks gestation hen the vascular in endplates begin to recede, eventually leaving the disc as completely avascular, so resident cell must survive and function in an environment that is low nutrients and oxygen. These are unique condition of the largest avascular tissue in human body. The low nutrient environment might therefore induce the notochord-like cells into became apoptotic or transformed towards smaller, loss the vacuolated cytoplasm, bearing the chondrocyte like appearance. Concurrently the chondroid cells forming more clustering cells; which the process still unrevealed. The aim of this study is to unveil the sub cellular changes in the chondroid cells of degenerative IVD in Hernia Nucleus Pulposus (HNP) patients. The study is cross sectional observational, using excised IVD tissue specimens obtained from HNP patient underwent Micro Endoscopic Discectomy (MED). For each specimen we evaluated the chondroid cells clustering, the protein expressions of HSP70 (the cellular adaptation marker), CD 68 (the fibroblast marker), Caspase-3 (the apoptotic marker), Collagen I, and Collagen II by Immunohistochemistry technique. We looked into the CD 68 protein as phagocyte also as the fibroblast cell marker (The fact is, normal usual chondrocyte cells and chondroid cells in young Nucleus Pulposus do not express CD68). Attempt to do the double staining with two protein in one Immunohistochemistry run showed two different cell morphologies, the non apoptotic one express CD68 and the apoptotic one expressed Caspase-3; both in one cluster of chondroid cells. This study has been approved by the Ethical Commission of Airlangga University. The study result was analyzed descriptive and analytic

using Paired t-test and Wilcoxon Sign Rank Test, and Pearson correlation test ( $p < 0.05$ ,  $r = 0.734$ ). The result of this study showed significant correlation on these findings; cell clusters were significantly higher than the single formation. HSP70 expressed more in cluster assuming the adaptation process supervene the clustering changes. Both CD68 and Caspase-3 protein were expressed in the same clusters, both higher in cluster than in the single cells. Collagen II still higher than Collagen I correlate to the suitable extracellular matrix. There are 76,47% risk prevalence that the chondroid cells might lead to adaptation and 71% chances of regeneration for the chondroid cell cluster. The evaluation of child IVD from scoliosis patient showed few cells clustering, do not expressed the CD68, but dominantly expressed Caspase-3. Hence the thinking that these CD68 chondroid cell in adult IVD expressed phagocyte as response to the apoptotic condition remained unanswered. The phenotype and the matrix they produced signifying the fibroblast line. These study results open a new paradigm of degeneration process in NP cells; the CD 68 Caspase-3 protein expressions concurrency in chondroid cells of nucleus pulposus do not indicating a degenerate of praecox dying or a morphological changes only, yet these protein expressions in cell clustering persuade an adaptation changes into more tolerant cell in the different cell micro system. According to these findings, the surgical resection seems over treated. A strict patient selection and shifting in surgical procedure should be aroused as the initial choice of surgery in the endeavor of restoring the disc function through mechanobiochemistry approach.

