

# **APOPTOSIS PNEUMOSIT TIPE I & II PADA SYOK HIPOVOLEMIA PERDARAHAN YANG DIRESUSITASI DENGAN CPTD (Studi Eksperimental pada *Rattus Sprague Dawley*)**

SANTOSO, KOHAR HARI

Promotor : Prof. Dr. H.R.Eddy Rahardjo, dr. SpAn KIC.

**PNEUMOCYTE; HYPOVOLEMIC SHOCK**

**KKA KK Dis K 47/12 San a**

Copyright© 2011 by Airlangga University Library Surabaya

## **RINGKASAN**

### **APOPTOSIS PNEUMOSIT TIPE I & II PADA SYOK HIPOVOLEMIA PERDARAHAN YANG DIRESUSITASI DENGAN CPTD (Studi Eksperimental pada *Rat Sprague Dawley*)**

Syok hipovolemik perdarahan adalah kondisi syok yang disebabkan kurangnya volume darah akibat terjadinya perdarahan. Saat ini terapi cairan yang umum dipakai untuk resusitasi pada syok hipovolemik perdarahan pemberian infus *Ringer Lactate* (RL). Metode yang baru dalam mengatasi syok hipovolemik perdarahan dengan Cairan Salin Hipertonik. Metode baru ini dicari mengingat bahwa jenis cairan resusitasi dapat mempengaruhi jumlah sel yang mengalami apoptosis. Jumlah apoptosis sel epitel paru pada kasus yang diresusitasi dengan RL meningkat tiga kali lipat. Sel epitel paru berperan penting pada proses pengambilan oksigen oleh tubuh. CPTD (cairan pengganti transfusi darah) adalah salah satu varian salin hipertonik. Cairan Pengganti Transfusi Darah (CPTD) adalah salah satu alternatif yang dapat diberikan pada periode *pre hospital* dengan berbagai keuntungan yang dimiliki. CPTD telah diteliti penggunaannya untuk mengatasi perdarahan dan terbukti memberikan efek hemodinamik yang lebih baik. Komposisi CPTD terdiri dari Natrium 850 mEq/L, Dextran 70 sebesar 6% dengan osmolaritas 1500 mOsm/L. Sedangkan komposisi RL, Natrium 130 mEq/L, osmolaritas RL 273 mOsm/L, tanpa Dextran 70. Volume infuse untuk penggantian perdarahan satu liter membutuhkan RL 2- 4 liter, sedangkan dengan CPTD hanya membutuhkan sebanyak 0,25 liter. Sejauh ini CPTD belum digunakan secara klinis luas. Hal tersebut karena mekanisme pengaruh pemberian CPTD terhadap perbaikan klinis pada syok hipovolemik perdarahan dari aspek biomolekuler belum jelas. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian pengaruh pemberian CPTD pada aspek biomolekuler khususnya kejadian apoptosis pada sel epitel paru. Penelitian ini diarahkan ke sel epitel paru mengingat peran sel epitel paru dalam proses pengambilan oksigen oleh tubuh. Peran oksigen sangat penting untuk metabolisme tubuh berlangsung secara aerobik. Oksigen diperoleh dengan cara menghirup udara pernafasan masuk ke dalam paru. Pada saat di alveoli paru, oksigen akan pindah dari alveoli paru ke pembuluh darah pulmonal untuk disebarkan ke seluruh tubuh. Ketahanan sel epitel alveoli (pneumosit) sangat penting untuk difusi oksigen alveoli ke kapiler. Kerusakan maupun kematian dari pneumosit akan menyebabkan gangguan oksigenasi yang berakibat kesakitan hingga kematian. Sel epitel paru (pneumosit) terdiri dari pneumosit tipe I dan pneumosit tipe II. Tujuan penelitian ini ingin membuktikan bahwa proses kejadian apoptosis pneumosit tipe I dan II pada syok

hipovolemik perdarahan yang diresusitasi dengan CPTD lebih rendah daripada diresusitasi dengan RL. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni menggunakan 30 hewan coba tikus *Sprague Dawley*. Dilakukan tusukan jarum pada *Canthus Medialis* sehingga berdarah dan mengalami syok selama 30 menit. Dilakukan randomisasi menjadi tiga kelompok, masing-masing 10 subyek penelitian. Kelompok perdarahan sebagai data kontrol pra resusitasi atau kelompok kontrol perdarahan. Dua kelompok lainnya sebagai kelompok pasca resusitasi yaitu Kelompok RL dan Kelompok CPTD. Kelompok CPTD mendapatkan resusitasi dengan CPTD sebanyak 0.4 ml/gramBB secara intra vena secepatnya. Kelompok RL mendapatkan resusitasi sebanyak 2 ml/gram BB secara intra vena secepatnya. Sedangkan kelompok kontrol perdarahan adalah kelompok yang tidak mendapat resusitasi sehingga langsung dilakukan *euthanasia* dan diambil jaringan parunya. Pengambilan jaringan paru untuk kelompok CPTD dan RL dilakukan tiga jam setelah pemberian resusitasi. Selanjutnya jaringan paru diproses untuk diamati *Caspase 9*, *AIF*, dan *MDA* dengan metode Imunohistokimia. Sedangkan untuk pemeriksaan apoptosis menggunakan metode *Tunnel*. Hasil penelitian baik pada pneumosit tipe I maupun pneumosit tipe II perlakuan syok hipovolemik perdarahan pada tikus meningkatkan aktivitas *caspase cascade* yang diukur dengan ekspresi *caspase 9*. Demikian juga ekspresi *AIF* pada kelompok tikus yang tidak diresusitasi mendapatkan hasil tertinggi bila dibandingkan dengan yang diresusitasi RL maupun CPTD. Sehingga dapat dikatakan bahwa jalur *caspase* maupun jalur non *caspase* menuju apoptosis lebih rendah bila diresusitasi dengan CPTD. Bila diamati ekspresi *MDA* pada pneumosit tipe I kelompok yang diresusitasi dengan CPTD lebih rendah dibandingkan kelompok yang diresusitasi dengan RL ( $p=0,000$ ). Sedangkan bila diamati ekspresi *MDA* pneumosit tipe II pada kelompok yang diresusitasi dengan CPTD lebih rendah dibandingkan kelompok yang diresusitasi dengan RL. Namun perbedaan ini secara statistik tidak bermakna ( $p=0,090$ ). Jalur iskemia reperfusi yang diukur dengan ekspresi *MDA* pada syok perdarahan yang diresusitasi dengan CPTD lebih rendah dibandingkan resusitasi dengan RL. Penelitian ini membuktikan bahwa pada syok hipovolemik perdarahan pemberian resusitasi dengan CPTD lebih mencegah peningkatan apoptosis pneumosit tipe I. Terdapat perbedaan antara kelompok yang diresusitasi dengan CPTD dan yang diresusitasi menggunakan RL ( $p=0,000$ ). Kelompok yang diresusitasi dengan CPTD menghasilkan apoptosis pneumosit tipe II yang terendah. Begitu pula syok hipovolemik perdarahan yang diresusitasi dengan CPTD dapat menurunkan kejadian apoptosis pneumosit tipe II, walaupun antara pemberian CPTD dengan RL secara statistik tidak bermakna ( $p=0,090$ ). Penelitian ini membuktikan bahwa pneumosit tipe II lebih tahan terhadap stres syok hipovolemik perdarahan baik itu penanganan menggunakan RL maupun CPTD. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu kelompok yang diresusitasi dengan CPTD menunjukkan hasil yang signifikan lebih rendah pada apoptosis, dengan *caspase cascade*, *AIF* dan ekspresi *MDA* dibandingkan yang diresusitasi dengan RL. Ini merupakan fakta baru yang dapat membuka kesempatan untuk pengobatan pasien perdarahan dengan komposisi cairan yang baru untuk mencapai hasil yang lebih baik pada komplikasi paru.

## SUMMARY

### **Apoptosis Pneumocyte Type I & II On CPTD Resuscitated Haemorrhagic Hypovolemic Shock**

(Experimental Study on *Rat Sprague Dawley*)

Haemorrhagic is discharge of blood from blood vessel so that the volume of blood in circulation is reduced (hypovolemic). Commonly used liquid for haemorrhagic hypovolemic shock correction is Ringer's Lactate (RL). The new method in dealing haemorrhagic hypovolemic shock is with fluid hypertonic saline. The new method was sought given that the type of resuscitation fluid may affect the number of cells undergoing apoptosis. The number of lung epithelial cell apoptosis in cases that have resuscitated with RL increased threefold. Lung epithelial cells has an important role in the uptake of oxygen for the body. *Cairan Pengganti Transfusi Darah* (CPTD) is one variant of hypertonic saline and it's one alternative that can be given fluids in pre hospital period with various benefits. CPTD was investigated its used to overcome bleeding and was proven to provide better hemodynamic effect. Especially when viewed in the composition, NaCl composition in RL was 0,8% when compared to CPTD was 5%. Natrium composition in RL was 130 mEq/L, whereas in CPTD was 850 mEq/L. Osmolaritas level RL was 273 mOsm/L and in CPTD was 1500 mOsm/L. RL with no Dextran 70, whereas in CPTD had Dextran 70 as big as 6% and 15 grams/L. Even when viewed from the injection volume to replace one liter bleeding RL needed 2-4 liters, whereas in CPTD only needed 0,25 liters. In this case CPTD has not been used clinically widely. So because of the effect of haemorrhagic hypovolemic shock especially for biomoleculer aspect is unclear. This study aimed to remember the role of lung epithelial cells pulmonary in the process of oxygen uptake by the body. Oxygen is essential for aerobic metabolism takes place and it's obtained by inhaling air into the lungs breathing. At the time of the alveoli of the lungs, oxygen will move from the alveoli of the lungs to the pulmonary blood vessels to spread throughout the body. The integrity of epithelial cells alveoli (pneumocyte) is very important for the diffusion of oxygen into the alveoli capillary. Failure or death will cause a disruption of pneumocyte oxygenation resulting in pain until death. Lung epithelial cells (pneumocyte) consists of pneumocyte type I and type II. Purpose of the research explaining the process of apoptosis pneumocyte type I and II toward CPTD resuscitated haemorrhagic hypovolemic shock is lower than RL resuscitation. This true experimental research with 30 guinea pigs *Rat Sprague Dawley*. Needle puncture performed on *Canthus Medialis*, suffered and got shock in 30 minutes. There were randomized three groups with 10 subjects for each research. Tested bleeding group for pre resuscitation control data or control bleeding group. Two other groups as a post resuscitation were RL group and CPTD group. CPTD group got 0,4 ml/kgBB resuscitated fast intra vena. RL group got 20 ml/kgBB intravenous resuscitation quickly. While bleeding control group was group with no resuscitation and was performed directly euthanasia to lung tissue. Intake of lung tissue for the CPTD and RL group performed on three hours after completion of resuscitation. Then lung tissue could be examined by *Caspase 9*, *AIF*, and *MDA* with immunohistochemical method. As for the examination of apoptosis using *tunnel* method.

Result of the research in pneumocyte type I and type II haemorrhagic hypovolemic shock in rats increased activity of the caspase cascade as measured by the expression caspase 9. Similarly, AIF expression in the rats was no resuscitation had the highest value when compared with RL and resuscitated with CPTD. So, it means that the way of caspase or non caspase toward apoptosis is lower with resuscitated CPTD. MDA expression on pneumocyte type I while resuscitated with CPTD is lower than resuscitated RL ( $p=0,000$ ). Whereas in MDA expression pneumocyte type II while resuscitated CPTD is lower too than resuscitated RL. But there was no different statistic significant on that ( $p=0,090$ ). From the research showed that ischemia-reperfusion way as measured by the expression of MDA in resuscitated haemorrhagic shock with CPTD is lower than RL. Result of the research evidenced that haemorrhagic hipovolemic shock with CPTD resuscitated is more prevent increasing apoptosis pneumocyte type I. There was difference ( $p=0,000$ ) between CPTD resuscitated group and RL resuscitated group. CPTD resuscitated group was lowest produce on apoptosis pneumocyte type II. As well for CPTD resuscitated haemorrhagic hipovolemic shock can reduce the pneumocyte apoptosis type II. Although there was not a different ( $p=0,090$ ) significant statistic. This research showed that pneumocyte type II more resistant to stress from haemorrhagic hipovolemic shock with RL or CPTD. This research found that CPTD resuscitation showed significant beneficial result on the lower apoptosis rate, supported by both caspase cascade, AIF and MDA expression compared to Ringer Lactate. This new fact may open new opportunity to treat shocked hemorrhagic patients with a new fluid composition to achieve better result with less pulmonary complications.

## ABSTRACT

### Apoptosis Pneumocyte Type I & II On CPTD Resuscitated Haemorrhagic Hypovolemic Shock

(Experimental Study on *Rat Sprague Dawley*)

**Background:** Commonly used liquid to correct the haemorrhagic hypovolemic shock is *Ringer Lactate* (RL). However the number of lung cell apoptosis in cases resuscitated with RL increased three-fold. *Cairan Pengganti Transfusi Darah* (CPTD) is one of the alternative fluid that can be given in the pre hospital period with promising advantages. The objective of this research was to verify whether apoptosis of pneumocyte type I and type II cells after resuscitation using CPTD is lower than those resuscitated with RL. **Method:** True Experimental Design on 30 *Sprague Dawley Rat* were done. Hemorrhagic shock were induced by needle puncture on *canthus medialis* and sustained for 30 minutes. Rats were randomized into three groups, 10 subjects each, i.e. Group CPTD received CPTD 4ml/kg body weight as the resuscitation fluid, Group RL received Ringer Lactate 20ml/kg body weight and Group Bleeding which received no resuscitation fluid. Lung tissue samples were taken three hours after the completion of resuscitation for analysis of *Caspase 9*, *AIF*, and *MDA* using immunohistochemical method. Tunnel method was used to demonstrate apoptosis.

**Result:** Body weight, hemoglobin, natrium, lactate and base deficit of the three groups of rats were homogenous. Both pneumocyte I and pneumocyte II showed significant

increased activity of the caspase cascade as measured by the expression caspase 9 and AIF after RL more than CPTD ( $p= 0,000$ ). MDA expression among pneumocyte II showed no difference between CPTD and RL groups ( $p= 0,090$ ). While significant difference was found among pneumocyte I between CPTD and RL, with higher MDA expression in the RL group ( $p= 0,000$ ). Tunnel method to measure the apoptosis rate of pneumocyte I showed significant difference in favor of CPTD ( $p=0,000$ ) but not of pneumocyte II ( $p=0,090$ ).

**Conclusion:** CPTD resuscitation showed significant beneficial result on the lower apoptosis rate, supported by both Caspase Cascade, AIF and MDA expression compared to Ringer Lactate. This new fact may open new opportunity to treat shocked hemorrhagic patients with a new fluid composition to achieve better result with less pulmonary complications.

**Key Words:** pneumocyte I, pneumocyte II, CPTD, hypovolemic shock, apoptosis

## ABSTRAK

### APOPTOSIS PNEUMOSIT TIPE I & II PADA SYOK HIPOVOLEMİK PERDARAHAN YANG DIRESUSITASI DENGAN CPTD (Studi Eksperimental pada *Rat Sprague Dawley*)

**Latar Belakang:** Saat ini cairan yang umum dipakai untuk mengoreksi syok hipovolemik perdarahan adalah *Ringer Lactate* (RL), namun jumlah sel paru yang mengalami apoptosis meningkat tiga kali lipat. Cairan Pengganti Transfusi Darah (CPTD) adalah salah satu alternatif cairan yang dapat diberikan pada periode *pre hospital* dengan berbagai keuntungan yang dimiliki. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan kejadian apoptosis pneumosit tipe I dan II pada syok hipovolemik perdarahan yang diresusitasi dengan CPTD jumlahnya lebih rendah daripada diresusitasi dengan RL.

**Metode Penelitian:** Eksperimental murni menggunakan 30 *Rat Sprague Dawley*. Dilakukan tusukan jarum pada *Canthus Medialis* sehingga berdarah dan mengalami syok selama 30 menit. Subyek penelitian dikelompokkan secara random dalam tiga kelompok, masing-masing 10 subyek penelitian. Kelompok CPTD mendapatkan resusitasi sebanyak 4 ml/kgBB secara intra vena secepatnya. Kelompok RL mendapatkan resusitasi sebanyak 20 ml/kgBB secara intra vena secepatnya dan kelompok perdarahan adalah kelompok kontrol pra resusitasi yang mengalami syok hipovolemik perdarahan namun tanpa dilakukan tindakan resusitasi. Pengambilan jaringan paru untuk kelompok CPTD dan RL dilakukan tiga jam setelah selesai pemberian resusitasi kemudian diproses untuk diperiksa *Caspase 9*, *AIF*, dan *MDA* dengan metode Imunohistokimia. Sedangkan untuk pemeriksaan apoptosis menggunakan metode *tunnel*.

**Hasil Penelitian:** Data berat badan, hemoglobin, natrium, laktat dan *base deficit* ketiga kelompok tikus adalah homogen. Penelitian syok hipovolemik perdarahan ini membuktikan bahwa CPTD menurunkan ekspresi caspase 9 dan AIF ( $p=0,000$ ) pada pneumosit tipe I maupun pneumosit tipe II. Hasil penelitian menunjukkan ekspresi MDA pada pneumosit tipe II kelompok pasca resusitasi tidak ada perbedaan yang bermakna ( $p=0,090$ ). Sedangkan pada pneumosit tipe I terdapat perbedaan yang bermakna ( $p=0,000$ ). Metode *tunnel* untuk mengukur tingkat apoptosis pneumosit tipe I menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan CPTD ( $p=0,000$ ), tetapi tidak pada pneumosit tipe II ( $p=0,090$ ).

**Kesimpulan:** Resusitasi CPTD menunjukkan hasil yang signifikan lebih rendah pada apoptosis, dengan *caspase cascade*, AIF dan ekspresi MDA yang dibandingkan yang diresusitasi dengan RL. Ini merupakan fakta baru yang dapat membuka kesempatan untuk pengobatan pasien perdarahan dengan komposisi cairan yang baru untuk mencapai hasil yang lebih baik pada komplikasi paru.

**Kata Kunci:** pneumosit tipe I, pneumosit tipe II, CPTD, syok hipovolemik, apoptosis

