

**Efektivitas Pemberian Fotobiomodulasi Laser /Low Level Laser Therapy
650nm Melalui Titik Akupunktur Paru pada Tikus *Sprague Dawley* yang
Mendapatkan Paparan Hipoksia Hipobarik Intermiten.
(Kajian Terhadap Sinyal Purinergik: Adenosin, CD73,
Rasio Mitokondria aktif/tidak aktif, Kadar ROS Dan HIF1- α)**

Flora Eka Sari

NIM:20/468108/SKU/00812

ABSTRAK

Latar Belakang: Penggunaan Fotobiomodulasi (PBM) LLLT/*Low Level Laser Therapy* mulai banyak digunakan termasuk dalam penanganan kasus berat Covid-19. Manfaat PBM LLLT sebagai biostimulator akan mengaktifkan Adenosin trifosfatase (ATPase) membentuk ATP intraseluler, mengurangi pemecahan ATP menjadi adenosin di bawah kondisi hipoksia, sehingga menyeimbangkan tingkat adenosin intraseluler. PBM laser juga membuat konversi ATP ekstraseluler proinflamasi menjadi Adenosin ekstraseluler protektif melalui ektonukleotidase CD73 yang merupakan bagian dari metabolisme purinergik dan berperan dalam perubahan seluler akibat hipoksia. Hipoksia hipobarik intermiten (HHI) merupakan kondisi hipoksia akibat menurunnya tekanan parsial oksigen jaringan yang diinduksi secara intermiten menggunakan paparan ruang udara bertekanan rendah (RUBR) yang dibuat secara berulang. Pada ketinggian RUBR 25.000 kaki (7620 m), 282 mmHg maka penelitian ini dilakukan untuk memahami respon terhadap hipoksia hipobarik intermiten dan perubahan respon akibat HHI plus PBM Laser 650 nm terhadap jaringan paru tikus yang berpotensi memperbaiki respon seluler hipoksia dan mencegah kerusakan lebih lanjut.

Tujuan: Untuk membandingkan respon hipoksia intermiten organ paru tikus yang diberikan paparan HHI 25.000 kaki saja dan HHI 25.000 kaki serta respon PBM laser 650 nm pada titik belakang akupunktur paru dan hati. Kajian utama respon rasio Pneumosit 2/Pneumosit 1, mitokondria, HIF-1 α , ROS dan sinyal purinergik pada kedua perlakuan.

Metode: Penelitian eksperimental *in vivo* pada 35 ekor tikus Sprague Dawley, jenis kelamin jantan usia 10 minggu, berat badan 175-200 gram yang dibagi menjadi 7 kelompok, masing-masing kelompok berisi 5 ekor tikus. Kelompok pertama kontrol normal tanpa perlakuan, kelompok PBMT laser 650 nm saja, kelompok kontrol negatif HHI 5x interval 7 hari serta 4 kelompok perlakuan frekuensi HHI 5x disertai laserpunktur setiap hari dengan permulaan berbeda yaitu kelompok dimulai minggu pertama, minggu kedua, minggu ketiga dan minggu keempat. Pola perlakuan berbeda hari adalah mengikuti urutan HHI-Laser-HHI-Laser-HHI-Laser-HHI, kemudian terminasi setelah HHI5x. Paparan pada ketinggian 25.000 kaki selama 5

menit, dengan kenaikan 3000kaki/menit. Parameter jaringan paru yang dievaluasi adalah makroskopis paru, edema paru, histologi jaringan paru rasio Pneumosit 2/pneumosit 1 dengan Hematoksilin Eosin (HE), mitokondria, Adenosin intraseluler, CD 73, HIF1 α , ROS dengan metode Imunohistokimia (IHK). Penelitian ini telah diawali dengan *preliminary study* 25.000 kaki dengan protocol yang sama dengan HHI 2X, 3X, dan 4X dan pemberian PBM laser.

Hasil: Secara makroskopi pemberian PBM laser menurunkan kerusakan paru ditandai dengan menurunnya skor makroskopi kerusakan paru Anova $p=0,0042$ ($p<0,05$) dan indeks edema paru dibandingkan kelompok hipobarik. Kerusakan paru HHI (Hipoksia Hipobarik Intermiten) dengan pengecatan HE umumnya kerusakan sedang sampai berat pada dinding alveolus serta peradangan limfosit dan makrofag, terjadi perbaikan menjadi kerusakan ringan secara signifikan Anova $p=0,000$ ($p<0,0001$). Pemberian PBM laser minggu pertama paling menunjukkan hasil yang efektif dalam menurunkan ekspresi ROS pada paru akibat HHI Anova $p=0,000$ ($p<0,05$). Jika HHI mengurangi pneumosit tipe 2 dan menyempitkan ruang alveolar maka PBM laser akan mengurangi kerusakan paru, meningkatkan rasio Pneumosit tipe2/ pneumosit tipe 1 Anova $p= 0,016$ ($p<0,05$). Pemberian PBM laser pasca HHI menunjukkan perubahan yang signifikan terhadap sinyal purinergik (adenosin intraseluler maupun CD 73) ($p<0,001$). Hasil penelitian menunjukkan pemberian PBM laser pasca HHI meningkatkan HIF-1 α namun peningkatan lebih signifikan jika pemberian minggu ke 2 dan ke 3 ($p<0,001$) selanjutnya pemberian minggu 4 menunjukkan penurunan pada ekspresi HIF-1 mendekati kelompok hipobarik ($p<0,001$). Pemberian PBM laser menurunkan IL-6 Anova $p=0,000$ ($p<0,0001$) baik diberikan minggu pertama sampai keempat. Ekspresi (mitokondria aktif) yang ditampilkan dengan pendaran hijau menjadi lebih rendah pada semua kelompok dibandingkan dengan kelompok hipobarik diikuti penurunan adenosin intraseluler ($p<0,0001$).

Kesimpulan: Pemberian terapi PBM laser saat HHI dapat memperbaiki respon sel terhadap kondisi hipoksia, ditandai respon berkurangnya aktivitas mitokondria yang berlebihan, perbaikan proliferasi sel pneumosit tipe 2, respon mencegah gangguan sel akibat penumpukan HIF-1 α , ROS. Respon terhadap peningkatan berlebihan adenosin intraseluler dengan mengurangi pemecahan ATP menjadi adenosin intraseluler (mencegah penumpukan adenosin intraseluler) dan CD 73 turun (respon sinyal purinergik) sehingga membuat perlindungan atas dampak buruk akibat hipoksia dan iskemia reperfusi.

Kata kunci: Hipoksia hipobarik intermiten, Fotobiomodulasi laser, titik akupunktur, mitokondria, sinyal purinergik, HIF-1 α , jaringan paru.

Effectiveness of Laser Photobiomodulation / Low Level Laser Therapy 650nm Through Pulmonary Acupuncture Points in Sprague Dawley Rats Exposed to Intermittent Hypobaric Hypoxia. Study of Purinergic Signals (Adenosine, CD73), Active/Inactive Mitochondrial Ratio , ROS Levels and HIF1- α

Flora Eka Sari

NIM:20/468108/SKU/00812

ABSTRACT

Abstract

Background: The use of Photobiomodulation (PBM) LLLT/Low Level Laser Therapy is starting to be widely used including in the treatment of severe cases of Covid-19. The benefits of PBM LLLT as a biostimulator will activate Adenosine triphosphatase (ATPase) to form intracellular ATP, reduce the breakdown of ATP into adenosine under hypoxic conditions, thereby balancing intracellular adenosine levels. PBM laser also converts pro-inflammatory extracellular ATP into protective extracellular Adenosine through CD73 ectonucleotidase which is part of purinergic metabolism and plays a role in cellular changes due to hypoxia. Intermittent hypobaric hypoxia (HHI) is a condition of hypoxia due to decreased tissue oxygen partial pressure induced intermittently using repeated exposure to low-pressure airspaces (RUBR). and can be part of adaptation. At an altitude of RUBR 25.000 feet (7620m), 260 mmHg, this study was conducted to understand the response to intermittent hypobaric hypoxia and changes in response due to 650 nm Laser PBM on rat lung tissue that has the potential to improve cellular response to hypoxia and prevent further damage.

Aim: To see the response to intermittent hypoxia in the lungs of rats exposed to 25.000 feet HHI alone and 25.000 feet HHI and the response of 650 nm laser PBM at the back of the lung and liver acupuncture points. The main study of the response of the Pneumocyte 2/Pneumocyte 1 ratio, mitochondria, HIF-1 α , ROS and purinergic signals in both treatments.

Method: In vivo experimental study on 35 male Sprague Dawley rats, 10 weeks old, weighing 175-200 grams divided into 7 groups, each group containing 5 rats. The first group was a normal control without treatment, the PBMT group with 650 nm laser only, the negative control group HHI 5x interval 7 days and 4 treatment groups with 5x HHI frequency accompanied by laserpuncture every day with different beginnings, namely the first week, second week, third week and fourth week groups. The treatment pattern for different days is to follow the sequence HHI-Laser-HHI-Laser-HHI-Laser-HHI, then terminate after HHI5x. Exposure at an altitude of 25.000 feet for 5 minutes, with an increase of 3000 feet / minute. The parameters of lung tissue evaluated were macroscopic lung, pulmonary edema, lung

tissue histology ratio of Pneumocytes 2/pneumocytes 1 with Hematoxylin Eosin (HE), mitochondria, intracellular Adenosine, CD73, HIF1 α , ROS with Immunohistochemistry (IHK) method. This study began with a preliminary study of HHI 2X, 3X, 4X

Results: Macroscopically, the administration of laser PBM reduced lung damage indicated by a decrease in the macroscopic score of lung damage Anova $p = 0.0042$ ($p < 0.05$) and the pulmonary edema index compared to the hypobaric group. Lung damage HHI (Intermittent Hypobaric Hypoxia) with HE staining is generally moderate to severe damage to the alveolar walls and inflammation of lymphocytes and macrophages, there was significant improvement to mild damage Anova $p = 0.000$ ($p < 0.0001$). The first week of laser PBM administration showed the most effective results in reducing ROS expression in the lungs due to HHI Anova $p = 0.000$ ($p < 0.05$). If HHI reduces type 2 pneumocytes and narrows the alveolar space, laser PBM will reduce lung damage, increasing the ratio of type 2 pneumocytes / type 1 pneumocytes Anova $p = 0.016$ ($p < 0.05$). The administration of laser PBM after HHI showed significant changes in purinergic signals (intracellular adenosine and CD 73) ($p < 0.001$). The results showed that the administration of laser PBM after HHI increased HIF-1 α but the increase was very significant if given in the 2nd and 3rd weeks ($p < 0.001$) then administration in the 4th week showed a decrease in HIF-1 expression approaching the hypobaric group ($p < 0.001$). The administration of laser PBM decreased IL-6 Anova $p = 0.000$ ($p < 0.0001$) both given in the first to fourth weeks. Green fluorescence expression (active mitochondria) was lower in all groups compared to the hypobaric group followed by a decrease in intracellular adenosine ($p < 0.0001$).

Conclusion: PBM laser therapy during HHI can improve cellular response to hypoxic conditions, marked by a response of reduced excessive mitochondrial activity, adaptation of improved proliferation of type 2 pneumocyte cells, response to prevent cell disruption due to accumulation of HIF-1 α , ROS. Response to overexpression intracellular adenosine reducing the breakdown of ATP into intracellular adenosine (preventing accumulation of intracellular by adenosine) and CD73 decreased (purinergic signal response) thus providing protection against the adverse effects of hypoxia and ischemia reperfusion.

Keywords: Intermittent hypobaric hypoxia, Laser photobiomodulation, acupuncture points, mitochondrial, purinergic signals, HIF-1 α , lung tissue.